

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN  
SCIENCES DE LA VIE,  
SANTÉ ET ENVIRONNEMENT  
LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE  
ET D'ÉTUDE DES PLANTES  
MÉDICINALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

CENTRE FOR RESEARCH AND  
DOCTORAL TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN  
LIFE SCIENCES, HEALTH AND  
ENVIRONMENT SCIENCES  
LABORATORY FOR  
PHYTOBIOCHEMISTRY AND  
MEDICINAL PLANTS STUDIES

**ACTIVITES ANTI-VIH ET ANTIPLASMODIALE  
DES EXTRAITS ET FRACTIONS DE TROIS  
PLANTES DE LA FAMILLE DES ANNONACEAE**

Thèse

Présentée et soutenue comme requis partiel en vue de l'obtention du  
Diplôme de Doctorat/PhD en Biochimie

Par : NGOUTANE MFOPA ALVINE

Msc Biochimie

Sous la direction de  
FEKAM BOYOM Fabrice  
Professeur, Université de Yaoundé I

Année Académique : 2017 - 2018



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace-Work-Fatherland Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE

P.O BOX 812 Yaoundé, Cameroun



REPUBLIQUE DU CAMEROUN

UNIVERSITE DE YAOUNDEI  
FACULTE DES SCIENCES

B.P. 812, Yaoundé, Cameroun

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

### ATTESTATION OF CORRECTION

We, the undersigned members of the Jury of the Doctorat/PhD thesis in Biochemistry defended the 22th May 2018 by Mrs NGOUTANE MFOPA Alvine, registration number:07Y129, entitled «Anti-HIV and antiplasmodial activities of extracts and fractions from three plants of Annonaceae family)», attests that the candidate has edited the thesis following the remarks and recommendations of the jury.

In witness whereof, this attestation is issued to serve with the privileges there auto pertaining.

Yaoundé, the **11.1 JUN 2018**

President of Jury

*Dr. Wilfred Mbacham*  
**Dr. Wilfred Mbacham, ScD**  
Public Health Biotechnologist

Members of Jury

*NJAYOM Richard*  
*Bigoga Jude*

The head of Department of Biochemistry



*Aboundipa Favour Paul*  
**Professor**  
Enzymology-Toxicology

<b>UNIVERSITE DE YAOUNDE</b> <b>I</b> <b>FACULTE DES SCIENCES</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>The University of Yaoundé I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>	<b>LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF</b>	

**ANNEE ACADEMIQUE 2016/2017**  
(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION : 15 Novembre 2017**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN : AWONO ONANA, Professeur**

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

**VICE-DOYEN / DSSE : OBEN Julius ENYONG, Professeur**

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

**Chef Division Affaires Académiques, Sclolarité et Recherche : ABOSSOLO Monique,**  
Chargée de cours

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

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

18	AZANTSA Boris	Chargé de Cours	En poste
19	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
20	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIDJE NGOUNOU Marcelline	Chargé de Cours	En poste
22	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
23	EVEHE BEBANDOUE Marie – Solange	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>
24	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
25	KOTUE TAPTUE 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	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
29	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
30	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
32	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
33	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
34	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
35	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
36	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
37	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
38	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistant	En poste
39	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste
<b>2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (44)</b>			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	<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 Vernyuy	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. /Diplomation FS</i>
12	DJIETO Lordon Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	MONY NTONE Ruth	Maître de Conférences	En poste
20	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. /MINSUP</i>
21	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste

22	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
23	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
24	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
25	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
26	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	En poste
27	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
28	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
29	MOUGANG NGAMENI Luciane	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
31	NGOULATEU KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEGUIM TSOFACK Florence	Chargé de Cours	En poste
33	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
34	NJUA Clarisse YAFI	Chargé de Cours	En poste
35	TADU Zéphirin	Chargé de Cours	En poste
36	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
37	YEDE	Chargé de Cours	En poste
38	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
39	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
40	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
41	METCHI DONGFACK Mireille Flore	Assistant	En poste
40	NOAH E. O. Vivien	Assistant	En poste
41	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste

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

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

24	GONMADGE Christelle	Assistant	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste

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

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

#### 5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)

1	DONGO Etienne	Professeur	<b>Vice-Doyen/ DPSSA</b>
2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	<i>Directeur I.B.A. Foumban</i>
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	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	<b>Chef de Département</b>
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur /UN</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	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>Vice-Recteur/ UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	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	Chef Cell/ MINRESI
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	CEA/MINESUP
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	ZONDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

### 6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (30)

1	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
2	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<b>Chef de Département</b> <i>Chef Division MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
11	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
12	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
13	AMINOUE Halilou	Assistant	En poste
14	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
15	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
16	EBELE Serge	Assistant	En poste
17	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
18	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste

19	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
20	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
21	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
22	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
23	MONTHE DJIADEU Valery Martial	Assistant	En poste
24	NKONDOCK MI BAHANACK Nicolas	Assistant	En poste
25	OLE OLE David Claude	Assistant	En poste
26	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste

### 7-DEPARTEMENT DE MATHEMATIQUES (MA) (33)

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

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

1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UDO/ <b>Chef de Département</b>
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste

7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
<b>9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (41)</b>			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
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	<b>Chef de Département</b>
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épouse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	EYEBE FOU DA Jean Sire	Maître de Conférences	En poste
14	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
15	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
17	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
18	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
19	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
20	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
21	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
22	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
23	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
24	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
25	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
26	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINADER</i>
27	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
28	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
29	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
30	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
31	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>
32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste

39	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
40	MEL'I Jorelle Larissa	Assistant	En Poste
41	MVOGO Alain	Assistant	En Poste
<b>10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (44)</b>			
1	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<b>Chef de Department</b>
2	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
3	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	Doyen FASA/ U D
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	Conseiller Technique/UYII
7	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
10	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
11	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
12	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
13	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef de Divi/ MINTP</i>
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR FS/UYI
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir.Projet Barage Memve'ele</i>
17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
19	EYONG John TAKEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Serv D'ETAT /MINMIDT</i>
21	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
22	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
23	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
24	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
26	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
27	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
29	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
30	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste
31	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
33	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
34	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>DG ART</i>
35	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	<i>En Poste</i>
37	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	<i>En Poste</i>
38	METANG Victor	Assistant	<i>En poste</i>
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
40	SABABA Elisé	Assistant	En Poste
41	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département  
(15 Novembre 2017)**

Département	Nombre d'enseignants				
	Pr	MC	CC	ASS	Total
<b>BC</b>	05 (1)	9 (3)	18 (9)	08 (4)	<b>40 (18)</b>
<b>BPA</b>	10 (0)	10 (1)	18 (6)	6 (4)	<b>44 (11)</b>
<b>BPV</b>	3 (0)	6 (4)	13 (3)	5 (5)	<b>33 (9)</b>
<b>C.I.</b>	9 (1)	7 (0)	15 (3)	4 (1)	<b>35 (5)</b>
<b>C.O.</b>	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	<b>33 (6)</b>
<b>IN</b>	2 (0)	1 (0)	8 (0)	15 (2)	<b>26 (2)</b>
<b>MA</b>	3 (0)	4 (0)	18 (1)	5 (0)	<b>30 (1)</b>
<b>MB</b>	1 (0)	6 (1)	4 (2)	2 (0)	<b>13 (3)</b>
<b>PH</b>	8 (0)	14 (1)	15 (2)	4 (1)	<b>41 (5)</b>
<b>ST</b>	3 (0)	10 (1)	22 (4)	7 (0)	<b>44 (5)</b>
<b>Total</b>	<b>59 (2)</b>	<b>80 (14)</b>	<b>139 (33)</b>	<b>67 (18)</b>	<b>345 (67)</b>

Soit un total de : 345 (67) dont

- Professeurs 59 (2)
- Maîtres de Conférences 80 (14)
- Chargés de Cours 139 (33)
- Assistants 67

Le Doyen de la Faculté des Sciences

# DEDICACE

Je dédie ce travail :

**A la famille MFOPA**

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements les plus sincères :

A **Dieu** Tout Puissant, pour m'avoir fortifié, m'avoir pourvu spirituellement matériellement, et financièrement à la réalisation de ce travail.

Au Professeur **FEKAM BOYOM Fabrice, Chef de l'Unité des Agents Antimicrobiens et de Biocontrôle du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales** pour avoir accepté de superviser ce travail. Son accueil chaleureux, sa disponibilité, ses encouragements pendant les moments difficiles, ses connaissances en matière des recherches scientifiques et ses multiples conseils ont motivé la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect.

Au Professeur **MOUNDIPA PAUL Chef du Département de Biochimie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et les enseignants de ce Département,** pour leurs différents enseignements et conseils.

Au Professeur **CABONI Pierluigi, du Département des Sciences de la Vie et Environnementales de l'Université de Cagliari (Italie)** qui a bien voulu diriger une partie de ce travail à travers sa contribution pour l'analyse chimique des composés et ses enseignements durant mon stage effectué dans ce Département. Je vous en suis pleinement reconnaissante.

Au Professeur **ENZO Tramontano et Dr ANGELA Corona du Département des Sciences Technologiques Biomédicales et du laboratoire de Virologie et de Biologie moléculaire de l'Université de Monserrato (Italie)** qui nous a accueillis dans leur équipe de recherche et nous a permis d'effectuer les tests anti-VIH1 sur la transcriptase inverse.

Au Professeur **TOCCO Graziela, du Département des Sciences de la vie et Environnementales de l'Université de Cagliari (Italie),** pour sa collaboration, son expertise, sa disponibilité et sa rigueur scientifique dans la réalisation et la conception du protocole du fractionnement bioguidé des extraits potentiels anti-transcriptase inverse du VIH1.

Au Docteur, **GOUNOUE Raceline, du laboratoire de Physiologie Animale du Département de Biologie et de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I** pour son dynamisme, sa persévérance et sa collaboration dans la réalisation des tests antiplasmodiaux *in vivo*.

Aux **Membres du jury** qui ont accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail.

Aux **Laboratoires de Division des Maladies Infectieuses, Département de Médecine de l'Université de Californie San Francisco (USA)** et celui de **Recherche sur le**

**Paludisme «International Centre for genetic Ingeneering and Biotechnology »** dirigés respectivement par **Professeur ROSENTHAL Philip Jon**, et **Dr Dinkar Sahal** pour la réalisation des tests antiplasmodiaux *in vitro*.

Au **Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèse Organique** dirigé par Pr **NGOUELA Silvere** pour sa contribution dans le fractionnement des extraits par chromatographie sur colonne.

Au **Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de la Faculté de Médecines et des Sciences Biomédicales** de L'Université de Yaoundé I pour la réalisation des tests antipaludiques *in vivo*.

Au Docteur **NGOUANA Vincent**, pour son assistance, l'esprit de solidarité qui nous a toujours animés et pour ses encouragements.

Au Docteur **TSOUH FOKOU Valère** pour sa disponibilité et ses multiples conseils pour l'amélioration de la qualité de ce travail.

Aux Docteurs, **ZEUKO'O MENKEM Elisabeth**, **TCHOKOUAHA YAMTHE Lauve Rachel**, **BARKANGA via Issakou**, **DONKENG Valérie**, et **HZOUNDA Jean Baptiste** pour leurs multiples efforts, réconforts et encouragements.

Aux Docteurs **NJIMOU Romain Jacques** et **MBUNWE Eric** pour leurs soutiens moraux à travers leurs conseils.

A **M. TOGHUEO Rufin**, **SIMO Marguerite**, **EKE Pierre**, **TAFFOU** et **KENGI Hubert** pour leurs constantes assistances, soutiens, conseils et Dr **TCHUENMOGNE TCHUENTE Marthe Aimée** qui m'a assisté au laboratoire pendant l'expérience de l'analyse chimique par chromatographie sur colonne.

A **M. JIATSA Cédrick** et **M. KEUMOE Rodrigue** qui n'ont cessé de ménager leurs efforts pour l'assistance au laboratoire.

A tous les aînés et cadets de l'équipe de recherche de l'Unité des Agents Antimicrobiens pour leur soutien.

A mes grands parents paternels et maternels pour avoir toujours été là à travers vos encouragements, votre assistance morale et vos prières à mon endroit.

A Madame **COWAN Véronique** et Monsieur **COWAN Michael**, de n'avoir cessé de m'encourager à atteindre mes objectifs.

A **M. KENDEK André** pour son assistance morale et ses multiples encouragements.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, je vous dis merci.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICACE</b> .....	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>xx</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xxii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>xxiv</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>xxv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xxvii</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>4</b>
<b>I-1 GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)</b> .	<b>4</b>
I-1-1 Classification et caractéristiques des virus .....	<b>4</b>
I-1-2 Epidémiologie de l'infection du VIH-SIDA .....	<b>4</b>
I-1-3 Pathogénèse du virus .....	<b>5</b>
I-1-3-1 Structure morphologique du virus VIH .....	<b>5</b>
I-1-3-2 Cycle de multiplication du virus du VIH1 .....	<b>6</b>
I-1-3-3 Structure et fonction de la Transcriptase Inverse (TI) .....	<b>8</b>
I-1-3-4 Mécanisme catalytique de l'ARNase H .....	<b>8</b>
I-1-4 Stades évolutifs du VIH .....	<b>10</b>
I-1-5 Thérapie du VIH et mode d'action.....	<b>11</b>
I-1-5-1 Les inhibiteurs de la TI .....	<b>12</b>
I-1-5-2 Les inhibiteurs de l'ARNase H .....	<b>14</b>
I-1-6- Résistance aux antiretroviraux .....	<b>16</b>
<b>I-2 GENERALITES SUR LE PALUDISME</b> .....	<b>16</b>
I-2-1 Définition du paludisme .....	<b>16</b>

I-2-2 Répartition géographique et Epidémiologie en Afrique et au Cameroun .....	17
I-2-3 Physiopathologie .....	18
I-2-3-1 Espèces plasmodiales humaines .....	18
I-2-3-2 Cycle de vie de <i>Plasmodium</i> spp .....	19
I-2-4 Différentes formes de paludisme.....	21
I-2-4-1 L'accès palustre simple.....	21
I-2-4-2 Le paludisme viscéral évolutif.....	22
I-2-4-3 La fièvre bilieuse hémogloburinique .....	22
I-2-4-4 L'accès palustre grave à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	22
I-2-5 Thérapie antipaludique.....	22
I-2-5-1 Les schizontocides érythrocytaires .....	22
I-2-5-2 Les gamétocytocides .....	23
I-2-5-3 Les antipaludiques naturels.....	23
I-2-5-4 Les associations d'antipaludiques.....	24
I-2-6 Les cibles potentielles des médicaments antipaludiques.....	25
I-2-6-1 La vacuole digestive .....	25
I-2-6-2 Le cytoplasme .....	25
I-2-6-3 La membrane cytoplasmique .....	25
I-2-6-4 Les protéases parasitaires à <i>Plasmodium</i> .....	26
I-2-7 Résistances aux médicaments antipaludiques .....	26
I-3 GENERALITES SUR LES ANNONACEAE .....	28
I-3-1 <i>Polyalthia suaveolens</i> (Engl et Diels) .....	28
I-3-1-1 Description botanique et répartition géographique.....	28
I-3-1-2 Etude ethnobotanique et ethnopharmacologique .....	29

I-3-1-3 Travaux antérieurs .....	30
I-3-2 <i>Monodora tenuifolia</i> Benth .....	31
I-3-2-1 Description botanique et répartition géographique.....	31
I-3-2-2 Etude ethnobotanique.....	31
I-3-2-3 Travaux antérieurs .....	32
I-3-3 <i>Uvaria angolensis</i> (Engl. et Diels) .....	32
I-3-3-1 Description botanique et répartition géographique.....	32
I-3-3-2 Etude ethnobotanique.....	33
I-3-3-3 Travaux antérieurs .....	33
I-3-4 Bref aperçu sur les activités biologiques des métabolites secondaires des Annonaceae .....	34
<b>CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
II-1 Préparation des extraits de plantes .....	37
II-1-1 Justification de la sélection des plantes .....	37
II-1-2 Matériel végétal .....	37
II-1-3 Préparation des extraits aqueux, méthanoliques, éthanoliques et des fractions.....	37
II-1-3-1 Préparation des extraits bruts aqueux et au méthanol.....	37
II-1-3-2 Préparation des extraits bruts éthanoliques et partition liquide-liquide.....	38
II-2 Fractionnement des extraits les plus actifs et caractérisation des fractions .....	40
II-2-1 Fractionnement par épuisement de l'extrait brut méthanolique des écorces de <i>Uvaria angolensis</i> le plus actif sur la transcriptase inverse du VIH1. ....	40
II-2-3 Criblage phytochimique et fractionnement de l'extrait méthanolique de brindilles de <i>P. suaveolens</i> le plus actif sur <i>Plasmodium falciparum</i> par chromatographie sur colonne .....	42
II-2-3-1 Criblage phytochimique de l'extrait méthanolique des brindilles de <i>P.</i> <i>suaveolens</i> le plus actif par chromatographie colonne.....	42

II-2-3-1-1 Tests des alcaloïdes .....	42
II-2-3-1-2 Test des flavonoïdes .....	43
II-2-3-1-3 Mise en évidence des saponines.....	43
II-2-3-1-4 Test des tannins .....	43
II-2-3-1-5 Test des composés phénoliques.....	43
II-2-3-1-6 Caractérisation des terpènes .....	43
II-2-3-1-7 Test des glucosides.....	43
II-2-3-1-8 Test de mise en évidence des stérols .....	44
II-2-3-1-9 Caractérisation des composés lactoniques .....	44
II-2-3-2 Fractionnement de la fraction méthanolique des brindilles de <i>P. suaveolens</i> le plus actif par chromatographie sur colonne .....	45
II-3 Evaluation des activités inhibitrices des extraits et des fractions de la transcriptase inverse (TI) associée à la fonction ADN polymérase-ARN dépendant et l'ARNase H VIH1. 47	
II-3-1 Préparation des solutions tests des extraits et des fractions .....	47
II-3-2 Test d'inhibition des extraits de la TI associée à la fonction de l'ARNase H .....	48
II-3-3 Test d'inhibition <i>in vitro</i> des extraits sur la TI associée à la fonction de l'ADN polymérase ARN dépendant.....	49
II-3-4 Evaluation de l'activité cytotoxique des fractions actives de <i>U. angolensis</i> sur la lignée cellulaire A549 .....	50
II-4 Détermination de l'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> des extraits bruts, des fractions et subfractions .....	52
II-4-1 Test de susceptibilité des érythrocytes sains aux extraits .....	52
II-4-2 Culture du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	52
II-4-3 Synchronisation de stade parasitaire .....	53
II-4-4 Tests d'inhibition de <i>P. falciparum</i> des extraits bruts, des fractions et sous fractions de <i>P. suaveolens</i> , <i>M. tenuifolia</i> et <i>U. angolensis</i> .....	53

II-4-5 Test de cytotoxicité de la fraction la plus active méthanolique des brindilles et ses sous-fractions actives de <i>P. suaveolens</i> sur les cellules HFF.....	55
II-4-5-1 Activation des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast) en culture .....	55
II-4-5-2 Test de cytotoxicité sur les cellules HFF en culture .....	55
II-5 Etude de l'activité antiplasmodiale <i>in vivo</i> de la fraction méthanolique de <i>P. suaveolens</i> chez la souris .....	57
II-5-1 Etude de la toxicité aigüe de la fraction méthanolique riche en acétogénines des brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	58
II-5-2 Etude de l'activité antipaludique <i>in vivo</i> de la fraction méthanolique de brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	58
II-5-2-1 Amplification de la souche de <i>P. berghei</i> ANKA .....	58
II-5-2-2 Evaluation de l'activité <i>in vivo</i> en traitement suppressif pendant 4 jours de la fraction méthanolique des brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	59
<b>CHAPITRE III- RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>61</b>
III-1 Rendement d'extraction des plantes sélectionnées .....	61
III-2 Activités inhibitrices de la transcriptase inverse VIH 1 des extraits et des fractions de <i>P. suaveolens</i> , <i>M. tenuifolia</i> et <i>U. angolensis</i> .....	62
III-2-1 Evaluation de l'activité des extraits bruts aqueux et méthanoliques de <i>P. suaveolens</i> , <i>U. angolensis</i> et <i>M. tenuifolia</i> sur l'ADN polymérase ARN-dépendant (RDDP) de la TI .....	62
III-2-2 Activité inhibitrice des fractions issues du fractionnement de l'extrait méthanolique des écorces de <i>U. angolensis</i> sur la TI du VIH 1 .....	66
III-2-3 Analyse chromatographique LC-QTOF des fractions aqueuses, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide actives sur la TI du VIH1 .....	67
III-2-4 Cytotoxicité des fractions obtenues de l'extrait potentiel des écorces de <i>U. angolensis</i> sur les cellules A549 .....	70
III-3 Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> contre la souche chloriquinorésistante de <i>Plasmodium falciparum</i> K1 .....	71
III-3-1 Susceptibilité des érythrocytes aux extraits et fractions .....	71

III-3-2	Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> des extraits et des fractions .....	71
III-3-3	Résultats du criblage phytochimique et fractionnement de la fraction méthanolique de brindilles de <i>P. suaveolens</i> par chromatographie sur colonne.....	76
III-3-4	Susceptibilité <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> aux sous fractions issues des brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	77
III-3-5	Cytotoxicité des fractions FPSbr(MeOH), et PS7-PS8 sur les cellules HFF .....	79
III-3-6	Extraits et fractions inhibiteurs de la TI possédant une activité antiplasmodiale sur la souche K1 de <i>P. falciparum</i> .....	79
III-3	Essais <i>in vivo</i> de la fraction potentielle riche en acétogénines des brindilles de <i>P.</i> <i>suaveolens</i> .....	81
III-3-1	Etude de la toxicité aigüe.....	81
III-3-2	Activité antimalariale suppressive de la fraction méthanolique active des brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	82
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>88</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>a</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A549</b>	Lignée de cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain
<b>ACT</b>	“Artemisinin- based combination Therapy”
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>bw</b>	“Body weight”
<b>CDC</b>	“Center for Disease Control”
<b>CD4</b>	“ Cluster of Differentiation 4”
<b>CI<sub>50</sub></b>	“ Concentration Inhibitrice 50 ”
<b>DDPP</b>	“ DNA DNA-dependant Polymerase ”
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>DELI</b>	Double-site enzyme linked
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HAART</b>	“High Active and antiretroviral Therapy”
<b>HEPES</b>	4- (2- hydroxyethyl)- 1- pipérazine ethanesulfonic acid
<b>IsNNTI</b>	“Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse”
<b>IsNTI/IsNtTI</b>	“Inhibiteurs Nucléosidiques/Nucléotidiques de la transcriptase inverse”
<b>LCQTOF/MS</b>	“Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight/MassSpectrometry”
<b>MST</b>	Maladie Sexuellement Transmissible

<b><i>M. tenuifolia</i></b>	<i>Monodora tenuifolia</i>
<b>MTT</b>	3- [4,5- diméthyl thiazol-2- yl]- 2,5- diphényltétrazolium bromide
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit
<b>NIST98</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b><i>P. falciparum</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b><i>P. suaveolens</i></b>	<i>Polyalthia suaveolens</i>
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Salin
<b>PIB</b>	Produit Intérieur Brut
<b>pLDH</b>	Lactate Déshydrogénase Parasitaire
<b>PMS</b>	Phénazine Méthosulfate
<b>RDDP</b>	RNA DNA dependant Polymerase
<b>RPMI</b>	“Roswell Park Memorial Institute Medium”
<b>SIDA</b>	Syndrome de l’Immunodéficience Acquise
<b>SRF/CAM</b>	Service de Recherche Forestière au Cameroun
<b>TI</b>	Transcriptase inverse
<b><i>U. angolensis</i></b>	<i>Uvaria angolensis</i>
<b>VIH</b>	Virus de l’Immunodéficience Humaine

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH-SIDA en 2016 .....	5
Figure 2: Structure de la particule virale du VIH.....	6
Figure 3 : Cycle de multiplication du VIH1 .....	7
Figure 4 : Site d'action de l'ARNase H .....	9
Figure 5: Etapes du processus de la dégradation de l'ARNase H transcriptase inverse du VIH1 .....	9
Figure 6: Sites d'action des agents antiretroviraux .....	12
Figure 7 : Mécanisme d'action des inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la TI du VIH1 .....	13
Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs potentiels de l'ARNase H.....	15
Figure 9 : Distribution du paludisme dans le monde de 2000-2016 .....	17
Figure 10 : Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> sp: .....	20
Figure 11 : Partie feuillée de <i>P. suaveolens</i> .....	29
Figure 12 : Partie feuillée de <i>Monodora tenuifolia</i> .....	31
Figure 13 : Partie feuillée de <i>Uvaria angolensis</i> .....	33
Figure 14 : Différents noyaux alcaloïdiques chez les Annonaceae.....	35
Figure 15 : Procédure d'extraction des fractions enrichies en Acétogénines.....	39
Figure 16 : Fractionnement par épuisement de l'extrait méthanolique des écorces de <i>U. angolensis</i> le plus actif sur la transcriptase inverse.....	41
Figure 17 : Principe de la dégradation de l'ARNase.....	48
Figure 19 : Principe du test au MTS .....	56
Figure 20 : Profil chromatographique du résidu solide de <i>U. angolensis</i> .....	69
Figure 21 : Structure des composés identifiés du résidu 4 solide par analyse chromatographique LC-TOF/MS .....	69
Figure 22 : Courbe sigmoïdale dose-réponse de l'activité de FPSbrMeOH (brindilles de <i>P. suaveolens</i> ) sur K1 de <i>P. falciparum</i> en culture.....	75
Figure 23: Variation des poids moyens des animaux observée pendant 14 jours.....	82
Figure 24 : Effets de FPSbr(MeOH) à différentes doses sur la parasitémie des souris infectées à <i>P. berghei</i> . .....	83
Figure 25 : Pourcentages d'inhibition de FPSbrMeOH sur l'infection à <i>P. berghei</i> .....	84

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Structures chimiques de quelques inhibiteurs nucléosidiques (IsNTTI) et des inhibiteurs non nucléosidiques (IsNNTI) de la transcriptase inverse approuvés .....	14
Tableau II: Chromatogramme de la fraction méthanolique des brindilles de <i>P.suaveolens</i> ...	46
Tableau III: Rendements d'extraction des extraits bruts et fractions de <i>P. suaveolens</i> , <i>M. tenuifolia</i> et <i>U. angolensis</i> .....	61
Tableau IV : Inhibition de l'ADN polymérase ARN-dépendant (RDDP) de TI VIH1 par les extraits bruts de <i>P. suaveolens</i> , <i>U. angolensis</i> et <i>M. tenuifolia</i> .....	63
Tableau V: Activité inhibitrice des extraits de <i>P. suaveolens</i> , <i>U. angolensis</i> et <i>M. tenuifolia</i> sur l'activité de l'ARNase H de TI VIH1 .....	64
Tableau VI: Activité inhibitrice de la TI des fractions issues de l'extrait méthanoliques des écorces de <i>U. angolensis</i> .....	66
Tableau VII : Analyse chromatographique des fractions actives de UvAec MeOH par HPLC/ESI-MS .....	67
Tableau VIII : Inhibition de la croissance cellulaire de la lignée A549 par les fractions de l'extrait méthanolique des écorces de <i>U. angolensis</i> .....	70
Tableau IX: Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> ) des extraits bruts de <i>P. suaveolens</i> , <i>U. angolensis</i> , et <i>M. tenuifolia</i> .....	72
Tableau X : Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> ) des fractions de <i>P.suaveolens</i> , <i>U. angolensis</i> , et <i>M. tenuifolia</i> .....	73
Tableau XI : Analyse phytochimique qualitative de la fraction méthanolique la plus active des brindilles de <i>P. suaveolens</i> :.....	76
Tableau XII : Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> des sous-fractions des brindilles de <i>P. suaveolens</i> .....	78
Tableau XIII : Cytotoxicité de la fraction active FPSbr(MeOH) et des sous fractions.....	79
Tableau XIV : Manifestations comportementales observées chez les souris, 24h, 7 jours et pendant 14 jours après administration de la fraction active des brindilles de <i>P. suaveolens</i> ...	81

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Composition du milieu de culture RPMI 1640.....	a
Annexe 2: Préparation des réactifs et de la solution du mélange réactionnel nécessaires pour les tests enzymatiques Transcriptase inverse VIH1 .....	b
Annexe 3: Pourcentages d'inhibition des extraits bruts actifs de <i>M. tenuifolia</i> et <i>U. angolensis</i> , fractions aqueuses, au chlorure de méthylène, hexanique et le résidu 4 solide sur l'activité de ARNase H et ADN polymérase .....	c
Annexe 4 : Graphe du pourcentage de viabilité cellulaire des cellules A549 en fonction des concentrations des fractions aqueuses, hexaniques, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide de l'extrait méthanolique de <i>U. angolensis</i> .....	g
Annexe 5: Chromatogramme des fractions aqueuses et au chlorure de méthylène de l'extrait méthanolique des écorces de <i>Uvaria angolensis</i> .....	h
Annexe 6: Structures de quelques antipaludiques.....	i

## RESUME

Les pandémies du VIH-SIDA et du paludisme constituent des problèmes de santé publique majeurs car elles sont responsables d'une morbidité et de mortalité élevées particulièrement en Afrique sub-Sahérienne. De plus, le phénomène de baisse d'efficacité aux combinaisons médicamenteuses observé chez les pathogènes responsables de ces pandémies stimule la recherche de nouvelles substances actives contre la réplication du VIH et possédant une activité sur *Plasmodium*. Ainsi, le présent travail vise à évaluer les activités inhibitrices de la transcriptase inverse du VIH 1 et du *Plasmodium falciparum* de *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis* et *Monodora tenuifolia*.

Les extraits aqueux, éthanoliques et méthanoliques des feuilles, des brindilles et des écorces ont été préparés par macération. Les extraits bruts éthanoliques ont été fractionnés par partition liquide-liquide pour l'obtention des fractions aqueuses, et interfaces chlorure de méthylène/eau ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ ). Les extraits méthanoliques les plus actifs sur la transcriptase inverse ont été fractionnés par épuisement et les fractions obtenues ont été soumises à une analyse qualitative par chromatographie LC-QTOF/SM d'une part. D'autre part, un criblage phytochimique qualitatif et un fractionnement par chromatographie sur colonne de la fraction méthanolique active sur *Plasmodium falciparum* ont été réalisés. Le potentiel inhibiteur de la transcriptase inverse associée à l'ADN polymérase ARN-dépendant et l'ARNase H du VIH1 a été mesurée par fluorométrie. La cytotoxicité des fractions actives a été évaluée sur la lignée cellulaire cancéreuse du poumon humain A549. L'activité antiplasmodiale *in vitro* contre la souche K1 de *Plasmodium falciparum* a été déterminée par le test de fluorescence au SYBR green I. Enfin, la toxicité aigüe et l'activité antiplasmodiale suppressive *in vivo* de la fraction la plus active ont été évaluées chez les souris infectées par le modèle plasmodial des rongeurs *Plasmodium berghei*.

Des 18 extraits bruts testés contre l'activité de l'ARNase-H et l'ADN polymérase ARN dépendant, 6 obtenus de *U. angolensis* ont montré une bonne activité inhibitrice avec des concentrations inhibitrices à 50% comprises entre  $1,0 < \text{CI}_{50} < 53 \mu\text{g/ml}$  et  $0,62 < \text{CI}_{50} < 46,5 \mu\text{g/ml}$  respectivement. L'extrait brut méthanolique de l'écorce de *U. angolensis* était le plus actif avec des  $\text{CI}_{50}$  de  $0,62 \mu\text{g/ml}$  et  $1,00 \mu\text{g/ml}$  sur l'ADN polymérase ARN-dépendant et l'ARNase-H, respectivement. Après le fractionnement, le résidu 4 et la fraction aqueuse ont présenté une très bonne activité sur l'ARNase H avec des  $\text{CI}_{50}$  de  $0,10 \mu\text{g/ml}$  et  $0,29 \mu\text{g/ml}$  respectivement. L'analyse chimique de ces fractions actives a permis d'identifier les chalcones tels que l'angolétine et les glycérolipides (le stearoyl glycérol et palmitoyl

glycérol). La fraction aqueuse et le résidu solide ont présenté une selectivité d'action sur les cellules A549.

D'autre part, 54 extraits/fractions ont été testés *in vitro* contre la souche K1 de *P. falciparum*. A l'issue de ce test, 6 extraits bruts éthanoliques de *P. suaveolens* ont présenté une bonne activité avec des  $CI_{50}$  variant de 4,53 à 10,00  $\mu\text{g/ml}$ . La fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* a montré une très bonne activité antiplasmodiale avec une  $CI_{50}$  de 3,24  $\mu\text{g/ml}$ . Cette dernière a été sélectionnée pour un screening phytochimique qualitatif. Les alcaloïdes, les composés phénoliques et les composés lactoniques ont été identifiés comme les principaux groupes de métabolites secondaires présents. Après fractionnement, la sous-fraction PS8 a montré une bonne inhibition et selectivité contre *P. falciparum* relativement à la fraction mère avec une  $CI_{50}$  de 4,42  $\mu\text{g/ml}$ . De plus, cette dernière a montré une dose létale 50 ( $DL_{50}$ ) supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel lorsque administrée par voie orale chez les souris. Le pourcentage de suppression de la parasitémie de *P. berghei* chez les souris infectées était de 79,39 % à la dose de 400 mg/kg. La dose permettant la suppression de 50% de parasites ( $DS_{50}$ ) était de 71,39 mg/kg.

Les résultats qui découlent de ce travail indiquent *P. suaveolens* et *U. angolensis* comme des sources potentielles de métabolites secondaires dotés de propriétés inhibitrices du *P. falciparum* et de la transcriptase inverse du VIH1. Les fractions ainsi actives devraient être étudiées en détail, avec pour objectif ultime d'isoler les principes actifs comme bases du développement de nouveaux médicaments contre le VIH/Sida et le paludisme.

**Mots clés :** *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis*, *Monodora tenuifolia*, antiplasmodiale, transcriptase inverse, VIH/Sida, paludisme.

## ABSTRACT

HIV-AIDS and malaria pandemics are considered as major public health concerns with high rate of mortality and morbidity particularly in sub-Saharan Africa. In addition, the spread of resistance to combination therapies reported for these pathogens stimulated the need to search for new active substances on the replication of HIV and *Plasmodium*. Thus, this work aimed to evaluate the inhibitory activity of extracts from *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis* and *Monodora tenuifolia* on reverse transcriptase HIV 1 and *Plasmodium falciparum*.

Aqueous, ethanolic and methanolic crude extracts of leaves, twigs and bark were prepared by maceration. The ethanolic crude extract was fractionated by liquid-liquid partition to obtain aqueous, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O interface residues and methanolic fractions. The most active methanolic extract on HIV reverse transcriptase were fractionated and the fractions were submitted to a qualitatively analyzed using LC-QTOF/MS. On the other hand, a qualitative phytochemical screening and fractionation by column chromatography of potent fraction against K1 strain of *Plasmodium falciparum* were performed. The inhibitory potential associated to RNA dependent DNA polymerase and RNAase H of HIV1 was measured by fluorometry. The cytotoxicity of the active fractions was evaluated on human lung adenocarcinoma cell line (A549) and the Human Foreskin Fibroblast (HFF) cell line. In addition, the antiplasmodial activity against the K1 strain of *Plasmodium falciparum* was evaluated *in vitro* by monitoring fluorescence using SYBR Green I. Finally, the acute toxicity and the *in vivo* suppressive efficacy of the promising fraction were evaluated in mice using the rodent parasitic strain, *Plasmodium berghei*.

Of the 18 crude extracts tested on RNAase H and DNA polymerase RNA dependent, 6 from *U. angolensis* showed good inhibitory activities with 50% inhibitory concentrations varying from 1.0 <IC<sub>50</sub><53 µg/ml to 0.62 <IC<sub>50</sub><46.5 µg/ml respectively. The crude methanolic extract of *U. angolensis* stem bark was the most active with IC<sub>50</sub> values of 0.62 µg/ml and 1.00 µg/ml on the DNA polymerase and the RNAase H respectively. Following the fractionation, the solid residue 4 and the aqueous fraction exhibited very good activities with IC<sub>50</sub> values of 0.10 µg/ml and 0.29 µg/ml respectively on RNAase H. Finally, the qualitative analysis of these fractions led to the identification of chalcones such as angoletin, and glycerolipids (palmitoyl and stearyl glycerol). The aqueous fraction showed selectivity of action vis-à-vis the enzymes relative to the A549 cells.

On the other hand, from the 54 extracts/fractions submitted to *in vitro* screening against K1 strain of *P. falciparum*, 6 ethanolic extracts from *P. suaveolens* inhibited parasite

growth with IC<sub>50</sub> values ranging from 4.53 µg/ml to 10.00 µg/ml. Besides, the methanolic fraction of *P. suaveolens* twigs displayed a very good antiplasmodial activity with IC<sub>50</sub> value of 3.24 µg/ml. Qualitative phytochemical analysis of the latter showed the presence of alkaloids, phenolic compounds and lactones as the main secondary metabolites. The fractionation of this fraction led to the subfraction PS8 which showed a good inhibition of *P. falciparum* relative to the starting fraction with IC<sub>50</sub> of 4.42 µg/ml. This latter also showed selective antiplasmodial activity relative to the HFF cell line. Moreover, when tested for acute toxicity in mice by oral administration, the 50% lethal dose was found to be higher than 5000 mg/kg body weight. The methanolic fraction of *P. suaveolens* twigs was also suppressive against *P. berghei* parasitaemia in mice with percent suppression of 79.39% at 400 mg/kg b.w. The dose able to suppress 50% of parasites (SD<sub>50</sub>) was estimated at 71.39 mg/kg b.w.

The results achieved in this work are promising and indicate *P. suaveolens* and *U. angolensis* as potential sources of secondary metabolites active against *P. falciparum* and reverse transcriptase of HIV1. The promising fractions/subfraction should be submitted to detailed studies to isolate the active principles as starting points for development of new drugs against HIV/Aids and malaria.

**Key words:** *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis*, *Monodora tenuifolia*, antiplasmodial, reverse transcriptase, HIV/Aids, Malaria.



**INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Les maladies infectieuses constituent de véritables problèmes de santé dans le monde, particulièrement en Afrique sub-Saharienne. En effet, l'infection par le VIH et le paludisme sont deux des plus importants problèmes de santé publique. Ensemble, ils causent plus de 4 millions de décès par an, particulièrement chez les enfants et les jeunes adultes (**Aubry, 2015**). Globalement, 36,7 millions de personnes sont infectées par le VIH avec 1 million de décès liés au Sida en 2016 (**ONUSIDA, 2017**). L'Afrique est le continent le plus touché avec 25,6 millions d'individus atteints. Particulièrement, l'Afrique centrale représente la deuxième région africaine la plus affectée avec 6,1 millions de personnes atteintes et une estimation de 370000 décès. Au Cameroun, l'infection par le VIH constitue l'une des causes de mortalité avec 29000 décès par an. De plus, 32000 personnes sont nouvellement infectées par an (**ONUSIDA, 2017 ; CDC Cameroun, 2013**). Quant au paludisme, c'est une infection parasitaire majeure dans les régions tropicales et subtropicales. Il touche 91 pays avec 3,3 milliards d'individus à risque d'infection palustre (40% de la population mondiale) D'après un récent rapport de l'OMS, l'infection à *Plasmodium* provoque 216 millions de cas de morbidité et 445000 décès par an (**OMS, 2017**). *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* sont les espèces les plus virulentes en Afrique et en Asie du Sud-Est (**OMS, 2017 ; Greenwood et al., 2008**). L'Afrique sub-Saharienne est la région la plus touchée avec 92% de décès (**OMS, 2017 ; 2016**). Au Cameroun, le nombre de cas de paludisme est estimé à 5440000 et 8000 décès par an (**OMS, 2017**).

La pathogénicité du VIH et du parasite *Plasmodium* est due au fait qu'ils possèdent des cibles métaboliques essentielles dans leur cycle de vie parmi lesquelles les enzymes. L'implication des enzymes par leur rôle de catalyseur dans plusieurs processus physiologiques peuvent influencer la progression des maladies infectieuses. En général, les polymérases jouent un rôle primordial dans la réplication de l'ADN et pourraient de ce fait représenter des cibles de choix pour le développement de nouvelles thérapies contre les maladies infectieuses telles que le VIH/Sida et le paludisme (**Berdis, 2008 ; Copeland, 2005**). Par exemple, l'ADN polymérase du *Plasmodium falciparum* est impliqué dans la polymérisation des desoxyribonucleotides durant la réplication ou la réparation du matériel génétique (**Sutton et Walker, 2001**). La télomérase transcriptase inverse du *Plasmodium falciparum* (TelTIPf) est une polymérase permettant de maintenir les extrémités télomériques du chromosome par retranscription de sa sous-unité ARN pour la synthèse de l'ADN exprimée au niveau des stades hépatiques asexuels (trophozoïtes et schizontes) (**Mohanty et**

*al.*, 2015). Par ailleurs, les polymérases ou transcriptase inverse sont aussi essentielles et fondamentales dans le cycle de réplication du VIH. Elle est constituée de deux sites catalytiques indispensables pour son activité tels que l'ARNase H et l'ADN polymérase permettant de dégrader le brin d'ARN de l'intermédiaire hybride formé ARN/ADN et de synthétiser l'ADN complémentaire respectivement. L'ensemble de ce processus aboutit ensuite à la production des particules virales infectieuses (**Engelman et Cherepanov, 2012 ; Parniak et SluisCremer, 2000**).

A ce sujet, les études de **Vasuvat et al (2016)** ont démontré l'activité du composé butylphenyl-dGTP sur la sous unité catalytique  $\delta$  de la polymérase de *P. falciparum*. Dans le même sens, **Sriwilajareon et al** ont montré l'inhibition de la télomérase TI du *P. falciparum* par la Berberine. Le virus de l'Immunodéficience Humaine et l'infection à *Plasmodium falciparum* se chevauchent géographiquement notamment en Afrique sub-Sahérienne. Des études suggèrent que chez les patients co-infectés, chaque maladie exacerbe l'autre (**Flateau et al., 2011 ; Abu-Raddad et al., 2006**). De plus l'infection par le VIH augmente la susceptibilité au paludisme, tandis que le paludisme en phase aigüe entraîne une réplication transitoirement accrue du VIH (**Schrumpf et al., 2015 ; Slusker et Marston, 2007 ; Renia et Potter, 2006**). La thérapie chez les patients souffrant de VIH vivant dans les régions où le paludisme est endémique consiste à l'administration des inhibiteurs de la transcriptase inverse (Efavirenz) et des protéases tels que Lopinavir. Certains auteurs ont suggéré que l'étude du potentiel antiplasmodial des inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH apporterait une valeur ajoutée dans le contrôle de ces infections. En effet, les travaux menés par **Hobbs et al. (2013)** et **Parikh et al.** ont démontré la capacité des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des protéases virales du VIH à inhiber les différents stades hépatiques du *Plasmodium*. De même, **Nsanzabana et Rosenthal (2011)** ont démontré l'activité antiplasmodiale *in vitro* des inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH1. Il a été démontré que les inhibiteurs analogues nucléosidiques de la TI du VIH1 (3'-azido-3'-desoxythymidine triphosphate ou Zidovudine) similaire à la télomérase TI du *P. falciparum*, avaient la capacité d'inhiber l'activité télomérase du *P. falciparum* par un mécanisme similaire (**Mohanty et al., 2015 ; Bottius et al., 1998**).

Des études ont montré qu'une co-administration des antiretroviraux et des combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (Arthéméter+Luméfantrine ; Artésunate+Amodiaquine) présente des limites telles que les interactions antagonistes entraînant une réduction du métabolisme des dérivés de l'Artémisinine en un métabolite actif (dihydro-Artémisinine) avec un risque accru d'échec thérapeutique contre le paludisme. On

note en plus, le développement des résistances du *Plasmodium* et du VIH à ces combinaisons médicamenteuses, et la non disponibilité contribuent à la baisse de l'efficacité du contrôle thérapeutique (Arts et Hazuda, 2015; Kyaw *et al.*, 2015 ; Burda *et al.*, 2010 ; OMS, 2004 ; Collier *et al.* 1996). Par voie de conséquence, cette problématique souligne la nécessité de rechercher de nouvelles molécules inhibitrices de la réplication du VIH, et ayant une activité sur le *Plasmodium*. Cette approche serait prometteuse et permettrait d'optimiser le traitement des patients VIH vivant dans les régions où le paludisme est endémique.

Les plantes médicinales ont de tout temps prouvé leur crédibilité comme sources de métabolites secondaires dotés de propriétés biologiques variées. Les exemples les plus célèbres incluent la Quinine abondamment produite par les plantes du genre *Cinchona* et l'Artémisinine isolé de *Artémisia annua* qui sont les squelettes de base pour le développement des médicaments contre le paludisme. En effet, les plantes de la famille des Annonacées sont connues pour leur richesse en métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les composés phénoliques, les terpénoïdes, et les acétogénines potentiellement actives sur les protozoaires et les virus (Ntie-Kang *et al.*, 2014 ; Macabeo *et al.*, 2014 ; Boyom *et al.*, 2011). A ce titre, des études ethnopharmacologiques ont révélé *Polyalthia suaveolens*, *Monodora tenuifolia*, et *Uvaria angolensis* comme bases de potions traditionnelles utilisées dans le traitement du paludisme au Cameroun (Tsabang *et al.*, 2012 ; Bele *et al.*, 2011 ; Focho *et al.*, 2010 ). Cependant très peu d'études scientifiques ont été menées pour valider leur potentiel.

De ces faits nous avons émis une hypothèse selon laquelle :

**Hypothèse de recherche** : Les extraits de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* possèderaient des propriétés antiplasmodiale et anti-VIH

**Objectif général** : Evaluer de l'activité des extraits et fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* contre quelques enzymes importantes de la replication du VIH1 et sur *Plasmodium*.

### **Objectifs spécifiques**

Plus spécifiquement il s'était agi de:

- Déterminer les propriétés inhibitrices des extraits et fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* de la transcriptase inverse (TI) du VIH1.
- Déterminer l'activité antiplasmodiale *in vitro* contre la souche K1 de *Plasmodium falciparum*
- Evaluer la toxicité aigüe et l'efficacite suppressive *in vivo* de la fraction la plus active chez les souris infectées par *Plasmodium berghei*.



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

## CHAPITRE I REVUE DE LA LITTERATURE

### I-1 GENERALITES SUR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

#### I-1-1 Classification et caractéristiques des virus

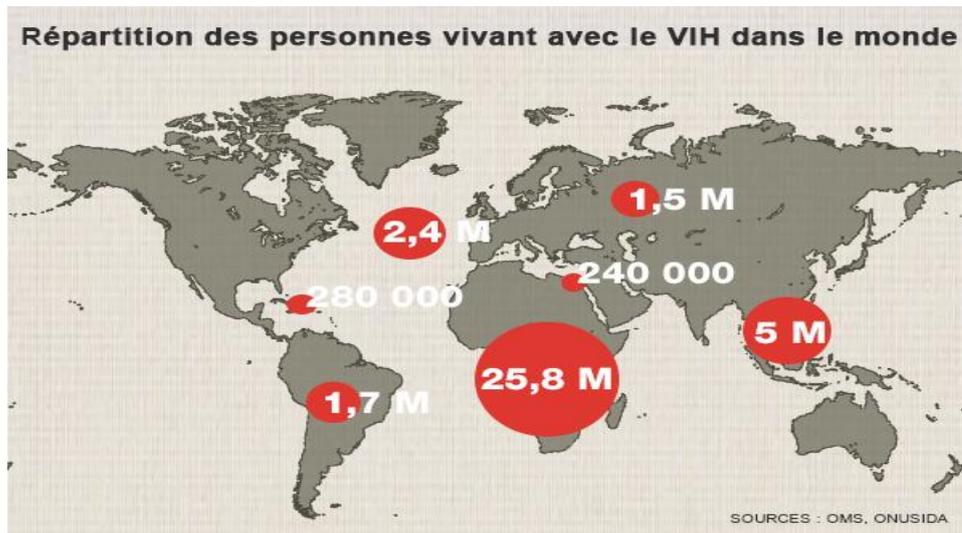
Le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est un virus de la famille des Retroviridae et appartenant au genre lentivirus. Les rétrovirus sont caractérisés par la capacité de transcrire leur génome d'acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique (ADN) à l'intérieur de la cellule par la transcriptase inverse. Ils infectent principalement les cellules du système immunitaire et par conséquent provoquent des immunodéficiences (**Hoffmann et Rockstroh, 2012 ; Engelman et Cherepanov, 2012**).

Le virus du VIH est classé en 2 types: VIH de type 1 et le VIH de type 2 (VIH-2). En effet, ces types diffèrent par l'organisation de leur génome, leur origine géographique et leur lien de parenté avec le virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS). Selon l'analyse des séquences génomiques, le VIH-1 est divisé en trois groupes: M, O et N et P. Ce virus est le plus virulent et le plus répandu dans le monde où il infecte plus de 30 millions de personnes dans le monde entier. Il infecte spécifiquement les cellules du système immunitaire notamment les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+), les macrophages, les cellules dendritiques, ainsi que des cellules des systèmes lymphatiques, hématopoïétique et nerveux (**Hoffmann et Rockstroh, 2012**). La destruction des LT CD4+, qui constituent la clé du système immunitaire, va entraîner une chute de l'efficacité de la réponse immunitaire face aux agressions extérieures.

Quant au virus du VIH-2, il est réparti en 8 groupes d'A-H et a été localisé en Afrique de l'Ouest. Sa vitesse de transcription et la progression de la maladie est plus lente au cours de leur infection (**Engelman et Cherepanov, 2012; Hoffmann et Rockstroh, 2012; Fanales-Belasio et al., 2010**).

#### I-1-2 Epidémiologie de l'infection du VIH-SIDA

L'infection du VIH est l'une des pandémies les plus dévastatrices dans le monde et continue d'être parmi les principaux défis pour la communauté scientifique. La répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH sont représentées dans la figure 1 suivante.



Source : (ONUSIDA, 2017)

**Figure 1 : Répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH-SIDA en 2016**

En 2016, 36,7 millions de personnes vivaient avec le VIH dans le monde dont 2,1 millions de nouveaux cas infectés au total. On comptait 1 million de décès liés au Sida. L'Afrique constitue la région la plus touchée avec 25,6 millions d'individus atteints. En particulier, l'Afrique centrale représente la deuxième région africaine la plus affectée avec 6,1 millions de personnes atteintes. Dans cette zone, 370000 décès de cette population ont été enregistrés en 2016 (ONUSIDA 2017).

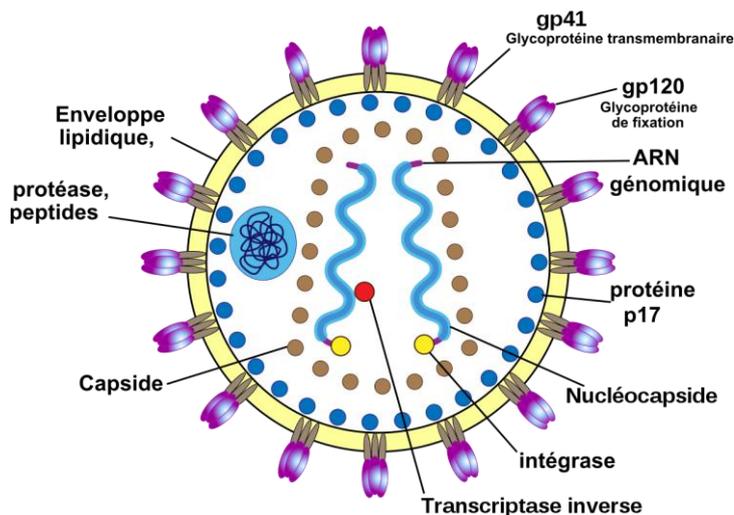
Le VIH/SIDA affecte majoritairement les femmes qui représentent la population la plus exposée. En effet, des 34,5 millions d'adultes, on a dénombré 17,8 millions de femmes de 15 ans et plus qui sont infectées du VIH en 2016. (ONUSIDA, 2017).

Le Cameroun, est l'un des pays africains où le VIH constitue la première cause de mortalité. En 2016, 32000 personnes ont été nouvellement infectées et 29000 décès liés au SIDA ont été enregistrés. Dans cette région, 560000 individus vivaient avec le VIH dont 37% avaient accès au traitement antiretroviral. Les populations clés sont constituées des groupes exposés à un risque accru. Il s'agit notamment des prostituées avec un taux de prévalence de 24,3%, des hommes gay (37,2%) et 3,96 % des prisonniers (ONSIDA, 2017; CDC Cameroun, 2013).

### **I-1-3 Pathogénèse du virus**

#### **I-1-3-1 Structure morphologique du virus VIH**

Le VIH a une forme sphérique de diamètre égal à 100 nanomètres environ et est constitué d'une enveloppe lipoprotéique qui contient trois protéines de structure (**Figure 2**) : la matrice (p17), la capsid (p24) et la nucléocapsid (p7) (Luciw, 1996).



Source : Hoffman et Rockstroh, 2012

## Figure 2: Structure de la particule virale du VIH

La matrice est ancrée à l'intérieur de l'enveloppe de la particule ; la capside entoure l'ARN génomique virale et la nucléocapside interagit avec l'ARN viral à l'intérieur de la capside. L'enveloppe virale est recouverte de deux types de glycoprotéines (gp): gp41 et gp 120. Le génome du VIH, est constitué d'un simple brin d'ARN d'environ 9,6 kb en deux copies identiques et des enzymes tels que :

- La transcriptase inverse (p66/51) qui transcrit l'ARN virale en ADN,
- L'intégrase (IN, p32) qui intègre l'ADN viral à l'ADN cellulaire et
- La protéase (PR, p12) qui participe à l'assemblage et à la maturation

### I-1-3-2 Cycle de multiplication du virus du VIH1

Le cycle de multiplication du VIH-1 est constitué de plusieurs étapes (**Figure 3**) dont celles-ci représentent une cible potentielle pour le développement de nouveaux traitements antirétroviraux.

➤ **Attachement et fusion** : L'entrée du virus requiert une reconnaissance spécifique et une forte affinité entre les protéines de la surface virale gp120 et les récepteurs de surface CD4<sup>+</sup> de la cellule cible. Cette interaction va induire un changement conformationnel au sein de l'enveloppe virale, qui permet l'interaction avec des récepteurs protéiques secondaires: corécepteurs CCR5 (CC-chemokine receptor 5) situé à la surface des macrophages et CXCR4 à la surface des lymphocytes T. Cette interaction va entraîner la fusion des membranes du virion et de la cellule de l'hôte favorisant la pénétration de la particule virale dans la cellule (**Kwong et al., 1998**).

➤ **Décapsidation et transcription inverse**: Une fois la capside libérée dans le cytoplasme, elle se désintègre en libérant le complexe formé de la double copie d'ARN génomique viral et l'ARNt de la lysine (ARNt<sup>3lys</sup>) qui sert d'initiateur de la transcription inverse. Ensuite, la

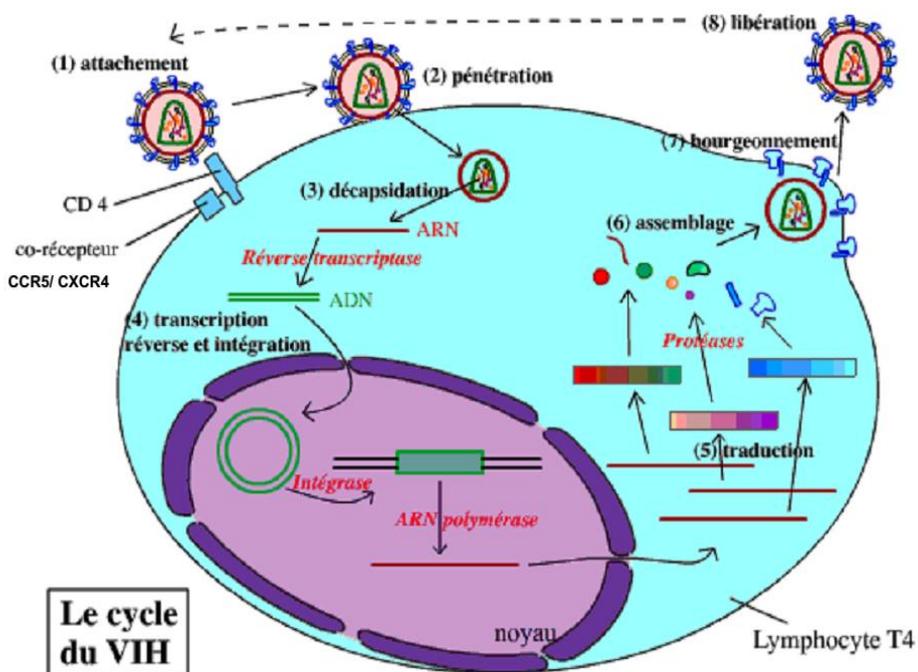
conversion de l'ARN viral en ADN provirus, sous l'action de la transcriptase inverse (TI), est une étape essentielle dans le cycle de la réplication virale (**Hoffmann et Rockstroh, 2012; Fanales-Belasio et al., 2010 ; Barré-Sinoussi et al., 1983**). Ce travail sera focalisé sur cette étape.

➤ **Intégration:** L'ADN viral bicaténaire est insérée dans le génome de la cellule hôte par l'action de l'intégrase. Celle-ci clive les nucléotides de chaque extrémité 3'terminal de l'ADN double hélice créant deux extrémités accolées. Ainsi ce mécanisme aboutit au transfert de l'ADN provirus modifié dans le noyau de la cellule et facilite son intégration dans le génome de l'hôte.

➤ **Réplication:** Une fois intégré, l'ADN provirus est transcrit en un ARN messager viral. Après sa migration dans le cytoplasme, l'ARN messager est traduit en protéines structurales.

➤ **Assemblage:** Les deux brins d'ARN viral et les protéines s'associent pour aboutir à la formation des nouveaux virions qui migrent vers la surface cellulaire.

➤ **Bourgeonnement et maturation:** Ces virions vont bourgeonner à la surface de la cellule, par la suite la protéase du VIH-1 dégrade la grosse molécule précurseur. Ceci génère des nouvelles particules virales matures infectieuses. Ces dernières s'incorporent dans la membrane de la cellule hôte, acquérant ainsi une nouvelle enveloppe. Au cours de ce processus, les membranes lipidiques des virus peuvent incorporer diverses protéines de la cellule hôte et s'enrichir des phospholipides et du cholestérol (**Hoffmann et Rockstroh, 2012; Fanales-Belasio et al., 2010**).



Source : <http://www.infectiologie.org.tn>

**Figure 3 : Cycle de multiplication du VIH1**

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la transcription du virus du VIH, stade d'intérêt plus spécifiquement les enzymes qui sont impliquées durant ce processus à savoir l'ARNase H et l'ADN polymérase ARN dépendante, cibles potentielles des nouveaux médicaments antiretroviraux.

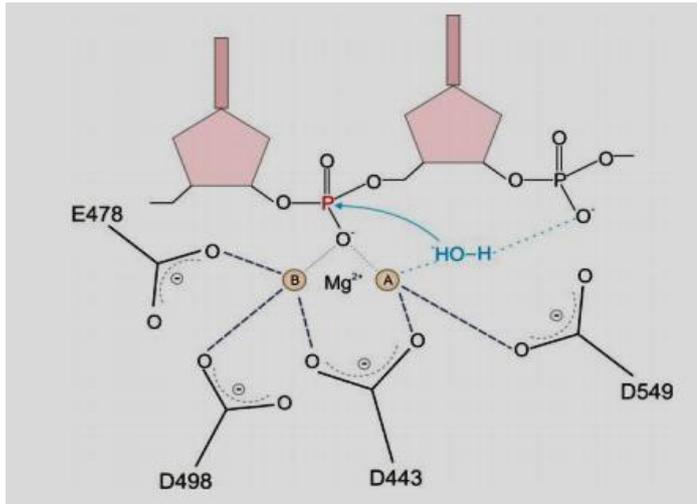
### **I-1-3-3 Structure et fonction de la Transcriptase Inverse (TI)**

Le processus de la transcription inverse est une étape fondamentale et obligatoire du virus VIH pour sa réplication à travers l'action de la transcriptase inverse qui permet la retro transcription de l'ARN simple brin du génome viral en ADN bicaténaire. Cette enzyme est composée de deux sous-unités : une grande sous unité catalytique p66 (66kDA) et une petite p51 (51kDA) chacune comprenant les polypeptides (**Telesnitsky et Goff, 1997**). Pour ce faire, la sous unité catalytique est composée de 3 domaines qui sont : le domaine de N-terminal de l'ADN polymérase (très exploitée pour le développement des inhibiteurs nucléosidique/nucléotidiques de la TI) et le domaine C-terminal de l'ARNase H, et le domaine de connexion qui lie les deux autres. D'où l'action de la TI nécessite l'implication des activités de l'ADN polymérase ARN- dépendante (RDDP) et l'ADN polymérase ADN dépendante (DDDP) et l'ARNase H (**Steltz, 1998**). Donc en absence de la TI, le virus ne pourra pas intégrer le génome de la cellule hôte et par conséquent il sera incapable de se répliquer par la suite.

De même, le domaine de l'ARNase H, cible thérapeutique potentielle et d'intérêt pour le développement de nouvelles molécules anti-VIH. En effet, il dégrade de façon sélective et spécifique l'ARN de l'hybride d'ARN/ADN et les amorces ARNt pour permettre la formation de l'ADN bicaténaire (**Corona et al., 2014**). Par ailleurs il a été démontré que les virus déficients en ARNase H sont non-infectieux et incapables d'infecter, prouvant ainsi que sa fonction est essentielle pour la réplication du rétrovirus (**Tramontano et Di Santo, 2010**). En outre, des études ont montré aussi que l'activité de l'ARNase H joue un rôle dans la résistance aux inhibiteurs de la TI. En effet, la mutation au niveau de certaines poches de la sous unité catalytique de l'ARNase H VIH1 peut affecter la susceptibilité de la TI aux inhibiteurs non nucléosidiques et nucléosidiques. Par exemple le mécanisme de résistance de l'ARNase H aux INTI tels que la 3'-azidodesoxythymidine triphosphate (AZT) est liée à la mutation au niveau de V106. Ceci empêche une reconnaissance spécifique entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme, par conséquent diminue fortement l'efficacité de l'inhibiteur (**Corona et al., 2014; Mcwilliam et al., 2006; Arion et al., 2002**)

### **I-1-3-4 Mécanisme catalytique de l'ARNase H**

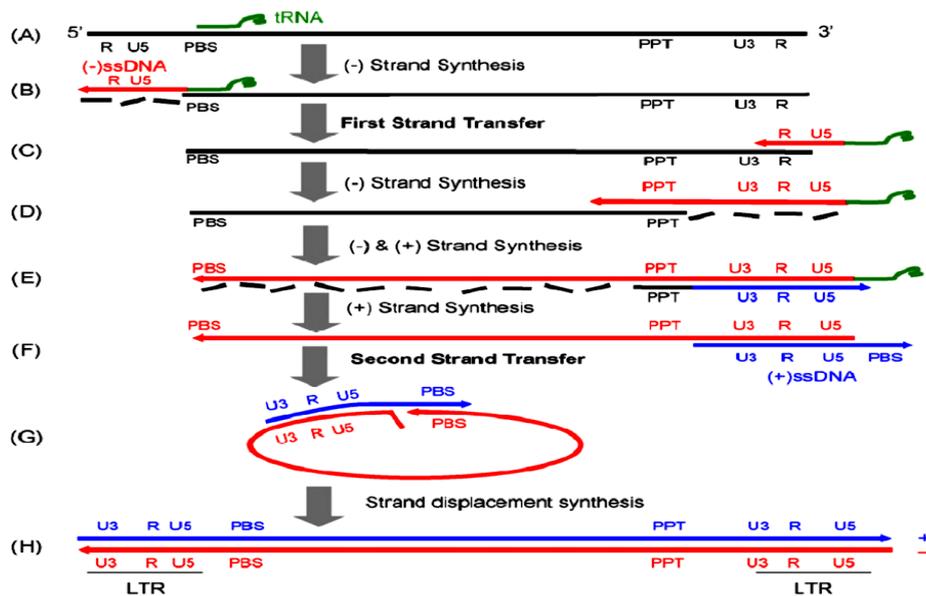
Le site actif de l'ARNase H est constitué de 4 sous-domaines acides catalytiques : D443, E478, D498 et D549 (**Figure 4**). Ces derniers sont liés par les ions  $Mg^{2+}$  divalents essentiels pour le mécanisme de clivage de l'ARN (**Rosta et al., 2011; Davies et al., 1991**).



Source : Schultz et Champoux, 2008

**Figure 4 : Site d'action de l'ARNase H**

Le domaine de l'ARNase H catalyse un transfert du groupe phosphoryl par substitution nucléophile de la liaison phosphodiester. Cette action se déroule à travers la déprotonation de la molécule d'eau et dont le groupe hydroxyde produit à son tour effectue une attaque sur le groupe 5'phosphate de l'ARN précédemment activé avec le cofacteur  $Mg^{2+}$  (Beilhartz et Götte, 2010)



Source : Esposito *et al.*, 2012

**Figure 5: Étapes du processus de la dégradation de l'ARNase H transcriptase inverse du VIH1**

### **Légende :**

**A:** Initiation de la transcription inverse par une amorce ARN, ARNt3lys de l'hôte, en vert, qui s'hybride par complémentarité partiellement au site de fixation de l'amorce (PBS) de l'ARN génomique, en noir.

**B:** Début de synthèse du brin d'ADN (-), en bleu et arrêt rapide. Ensuite, l'extrémité 5' de l'ARN viral est dégradée.

**C:** 1<sup>er</sup> transfert de brin: hybridation de la séquence R de l'ADN (-) avec celle de l'extrémité 3' de l'ARN viral.

**D:** Elongation du brin ADN(-) avec dégradation de l'ARN viral parallèlement à la synthèse de l'ADN, à l'exception du tractus Polypurine PPT (polypurine tract). régions riches en purines résistantes à la dégradation.

**E:** L'ARN situé sur la séquence PPT non dégradé sert d'amorce à la synthèse du brin (+) d'ADN viral, en rouge. L'ADN (+) est synthétisé jusqu'à l'extrémité U5.

**F:** La séquence PBS du brin (+) est synthétisée à partir de l'ARNt, puis après sa dégradation, on a le 2<sup>ème</sup> transfert de brin.

**G:** La synthèse du brin d'ADN (+) se poursuit.

**H:** La synthèse de l'ADN double brin s'achève au niveau des extrémités terminales LTR (Long terminal repeat) pour l'obtention de 2 séquences terminales identiques (U3-R-U5 complètes).

### **I-1-4 Stades évolutifs du VIH**

L'évolution du VIH dans l'organisme se résume en 4 grandes étapes:

- **La primo-infection:** est accompagnée d'une répllication virale intense détectable dans le sang et dure 3 à 6 semaines après contamination et variable selon les individus. Il se manifeste par une diminution de nombre de lymphocytes CD4+. Durant cette période, le système immunitaire apprend à reconnaître et à combattre le VIH et se met à fabriquer des anticorps contre le virus (**Dupré, 2013**).

- **La phase asymptomatique de latence:** Elle dure 5 à 10 ans. Les personnes ne présentent aucun symptôme, ou de simples adénopathies (augmentation des ganglions). Le virus provoque une perte de fonction progressive du système immunitaire. Les lymphocytes (LT) CD4 chutent lentement et régulièrement (perte environ de 30-60 LTCD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>/an). Elle permet la dissémination du virus dans tout l'organisme hôte et les macrophages, monocytes, cellules dendritiques et cellules nerveuses seront infectées durant cette période.

- **La phase d'accélération:** Elle consiste en une réactivation de la répllication virale, suite à l'épuisement des capacités de contrôle du système immunitaire. Cette hausse de la virémie induit une chute plus rapide des lymphocytes CD4.

- **Le stade SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise)** est le stade tardif de l'infection à VIH : Le système immunitaire, totalement affaibli définie par un taux de CD4+ inférieur à 200 cellules/ml. En l'absence de traitement, l'évolution est rapidement mortelle. Durant cette phase l'individu infecté devient sensible à des infections dites opportunistes (**Dupré, 2013**).

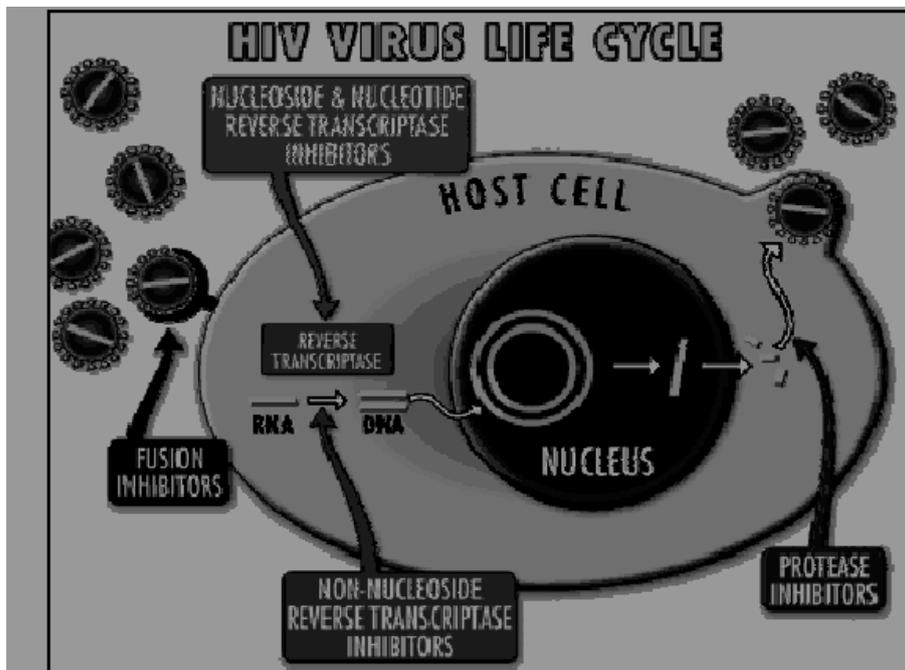
Ainsi, pour réduire le taux d'infection à VIH, plusieurs stratégies de lutte ont été mises en jeu pour traiter cette infection.

### **I-1-5 Thérapie du VIH et mode d'action**

Au début des années 1990, les premiers traitements à l'infection du VIH-1 ont été donnés en monothérapie (**Collier et al., 1996; D'Aquila et al., 1996; Staszewski et al., 1996**). Du fait de l'émergence des résistances, cette thérapie est devenue inefficace.

En 2010, pour le traitement du VIH 1 aux États-Unis et dans l'Union Européenne il est recommandé la multi thérapie appelée thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) qui est la combinaison d'au moins trois différents inhibiteurs actifs à divers stades de réplication. Il est utilisé lorsque les cellules CD4 du sang périphérique est inférieur à 350 millimètres cube, un stade auquel la charge virale peut atteindre 10.000-100.000 copies par ml.

Les médicaments antiretrovirales consistent à la combinaison des inhibiteurs nonnucléosidiques, les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs de la protéase. Ils ont une activité anti-virale plus puissante et minimisent les chances du virus de trouver une combinaison de mutation compatible à sa survie (**Fauci, 2003**). Ces derniers contribuent aussi à la réduction de la morbidité et de la mortalité liée au VIH, l'amélioration de la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH, la prévention de la transmission mère à l'enfant (PTME) et la prophylaxie post-exposition (**Guide National ART 2009 ; AAAS, 2004**). Cependant, l'administration de HAART ne peut pas éliminer l'infection VIH1 seule. Il y'a plusieurs paramètres en jeu qui peuvent influencer l'effet de cette thérapie tels que le manque d'accès aux soins médicaux dans les populations pauvres, les prises en charge sociales inadéquates, l'abus de l'alcool, les restrictions concernant le régime alimentaire, et les interactions des antirétroviraux et autres médicaments qui diminuent l'absorption optimale du traitement. Ainsi tous ces facteurs peuvent conduire au développement de la résistance des médicaments vis-à-vis du virus (**Art et Hazuda, 2015 ; Ammassari et al., 2001**). Du fait de l'impossibilité d'éradiquer le virus il convient de compléter le traitement en bloquant à chaque de stade de réplication. Les sites d'actions des classes des antiretroviraux sont dans la figure 6 suivante.



Source : National ART Guidelines, 2009

**Figure 6: Sites d'action des agents antiretroviraux**

À ce jour, il existe un arsenal de médicaments anti VIH-SIDA approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Ils sont répartis en 4 principales classes distinctes sur la base de leurs mécanismes d'action à diverses étapes et représentent les cibles thérapeutiques:

- Les inhibiteurs de fusion, et les antagonistes du corécepteur
- Les inhibiteurs de la Transcriptase Inverse (TI)
- Les inhibiteurs de l'intégrase
- Les inhibiteurs de la protéase (IP)

Depuis des années, l'arsenal thérapeutique du VIH s'est considérablement enrichi, avec comme principale cible, la transcriptase inverse (TI) et la protéase (PR). Ainsi, l'inhibition de la TI et la PR constituent la base du traitement anti-SIDA (**Parniak et Sluis-Cremer, 2000**). D'où le choix de la transcriptase inverse comme cible dans notre étude préliminaire.

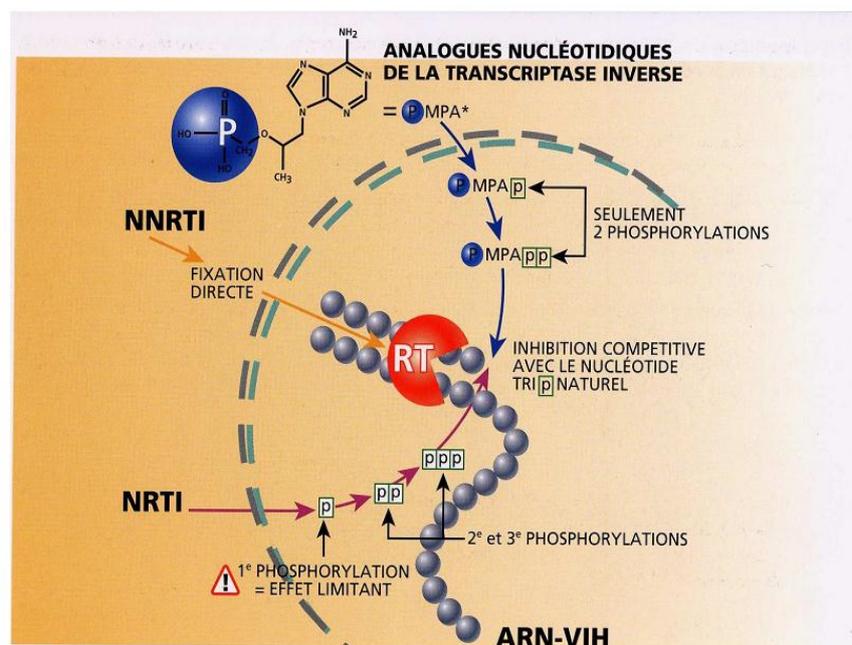
#### **I-1-5-1 Les inhibiteurs de la TI**

La TI est un complexe constitué d'un ensemble de plusieurs enzymes, toutes nécessaires pour la transformation de l'ARN simple brin en ADN double brin complémentaire (**Esposit et al., 2012 ; Hughes et Hu 2011**). Les inhibiteurs de la TI peuvent être regroupés en 3 sous-groupes: les inhibiteurs nucléosidiques (IsNTI), les inhibiteurs nucléotidiques (IsNtTI) et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (IsNNTI), (**Arts et Hazuda, 2015**).

**i) Inhibiteurs nucléosidiques de la TI (IsNTI):** c'est la première classe d'ARV mise sur le marché. Ce sont des analogues nucléosidiques qui nécessitent une activation métabolique (phosphorylation) par les kinases cellulaires en leurs dérivés 5'-triphosphate (**Figure 7**). Une fois activés, ils entrent en compétition spécifique, avec les deoxyribonucléotides naturels pour

agir sur le site actif de la transcriptase inverse. Il est important de noter que l'absence du groupement 3'OH sur la partie du sucre de la molécule empêchant la TI d'ajouter un nouveau nucléotide à ADN proviral, permet la formation de la liaison 3'-5' phosphodiester avec le nucléotide suivant et bloque ainsi l'élongation de l'ADN viral et par conséquent sa synthèse. Exemple : la zidovudine ou 3'-azido-2'-desoxythymidine, analogue de 2'-desoxythymidine (Esposito *et al.*, 2012; Mehellou et De Clercq, 2010).

ii) **Inhibiteurs nucléotidiques de la TI** : ils ont un mécanisme similaire que les IsNTI. La différence est qu'ils sont déjà monophosphorylés (Bani-Sadr, 1999). Ils ne subissent que deux étapes de phosphorylation pour être convertis en métabolites actifs. Ex le Ténofovir (TDF) est le premier analogue nucléotidique mis sur le marché.



Source : Art *et al.*, 2015

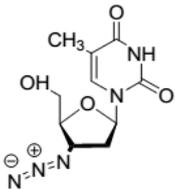
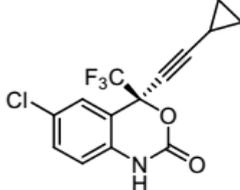
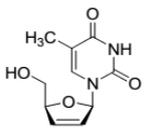
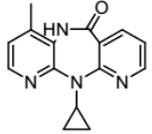
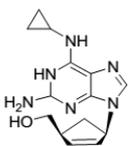
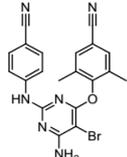
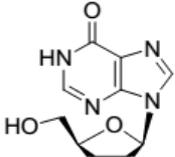
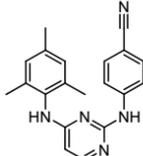
**Figure 7 : Mécanisme d'action des inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la TI du VIH1**

Légende : NNRTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la TI ; NRTI : inhibiteurs nucléosidiques de la TI

iii) **Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (IsNNTI)**: Contrairement aux IsNTI/IsNtTI qui agissent au site catalytique, les IsNNTI sont structurellement et chimiquement différents. Ils ne nécessitent pas d'activation métabolique (Mehellou et De Clercq, 2010). IsNNTI agissent par inhibition non compétitive et entraînent un changement de la conformation de plusieurs résidus, ce qui résulte de l'inhibition de l'ADN polymérase (Spence *et al.* 1995 ; Kohlstaedt *et al.*, 1992). Par ailleurs ils ont une action sélective sur la TI du VIH1 et

non celle de VIH2 (**Bani-Sadr, 1999**). Les structures chimiques de ces inhibiteurs sont représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I: Structures chimiques de quelques inhibiteurs nucléosidiques (IsNTTI) et des inhibiteurs non nucléosidiques (IsNNTI) de la transcriptase inverse approuvés**

IsNTTI	IsNNTI
 <p>Zidovudine (AZT)</p>	 <p>Efavirenz</p>
 <p>Stavudine (d4T)</p>	 <p>Névirapine</p>
 <p>Abacavir (ABC)</p>	 <p>Etravirine</p>
 <p>Didanoside (ddi)</p>	 <p>Dapivirine</p>

### I-1-5-2 Les inhibiteurs de l'ARNase H

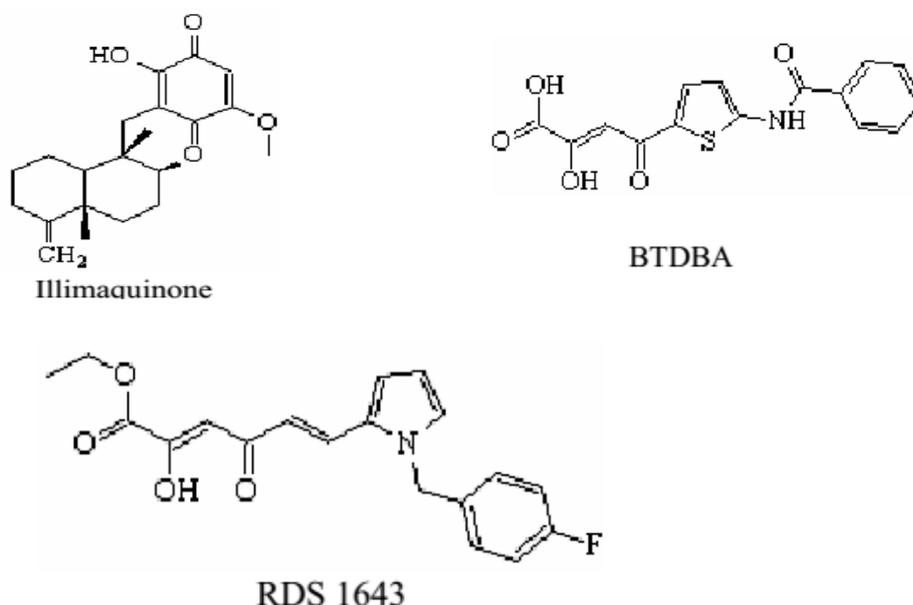
L'ARNase H est l'un des domaines de la TI, qui agit au cours de la catalyse de l'ARN du brin hybride ARN/ADN viral pour permettre la formation d'un ADN bicaténaire dont le mécanisme a été détaillé précédemment. C'est une cible thérapeutique potentielle. Contrairement aux nombreux inhibiteurs de l'ADN polymérase (IsNTI/IsNtTI, INNTI), très peu d'inhibiteurs de l'ARNase H ont été étudiés :

i) **Molécules dérivées des produits naturels**: l'illimaquinone (**Figure 8**) une quinone sesquiterpène naturelle marine isolée comme métabolite secondaire de *Smenospongia sp.* une éponge rouge de mer dont leurs activités sur l'ARNase H et RDDP VIH1 ont montré des valeurs de  $CI_{50}$  de 15  $\mu$ M et >140  $\mu$ M, respectivement (**Loya et al., 1990**).

**ii) Nucléotides et oligonucléotides.** Les formes monophosphatées de l'IsNRT, sont : 3'azido-3'-déoxythymidine (AZT), 3'-azido-3'-déoxythymidine 5'phosphate (AZTMP), 2',3'didéoxyadenosine-5'monophosphate et 2,3'dideoxyguanosine 5' monophosphate (ddGMP) inhibaient faiblement l'activité de l'ARNase H (Allen *et al.*, 1996).

**iii) Les hydrazones:** ce sont des chélateurs des métaux qui se fixent sur le cation métallique du site actif et de ce fait inactivent la protéine : Naphthaldéhydehydrazone N-(4-tertbutylbenzoyl)-2 hydroxyl (BBNH) exerce des activités inhibitrices sur la TI associée à ARNase H et RDDP avec des valeurs de  $CI_{50}$  de  $3\mu M$  et  $0,8\mu M$ , respectivement (Borkow *et al.*, 1997).

**iv) Les dérivés dicéto acides (DDA):** le dérivé dicéto-acide, acide 2,4-dioxobutanoïque-4-[5-(benzoylamino) thièn-2-yl] (BTDBA), a été rapporté inhibé l'activité de l'ARNase H VIH1 avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $3.2\mu M$  (Shaw-Reid *et al.*, 2005). Il existe un autre composé un ester d'éthyl d'acide 2,4-dioxo-5-hexenoïque-6-[1-(4-fluorophenyl) méthyl-1H-pyrrol-2-yl] (RDS 1643) ayant une activité anti- ARNase H avec une valeur  $CI_{50}$  de  $13\mu M$ , mais moins potentiel que le précédent BTDBA (Tramontano *et al.*, 2005). Cependant il est important de noter que le RDS 1643 est capable de se fixer au métal divalent  $Mg^{2+}$ , site actif spécifique du domaine de l'ARNase H de la même façon que BTDBA (Klumpp et Mirzadegan, 2006).



Source : Tramontano *et al.*, 2005

**Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs potentiels de l'ARNase H**

### **I-1-6- Résistance aux antiretroviraux**

La combinaison triple, thérapie antirétrovirale récente présente un certain nombre de limites à savoir le développement des effets secondaires et l'apparition des virus mutants. En effet, la trithérapie peut inhiber la réplication virale mais celle-ci ne peut éliminer complètement l'ADN viral intégré. De ce fait l'utilisation à long terme de cette thérapie est essentielle, par conséquent influence l'émergence des résistances des médicaments vis-à-vis du virus. De plus, la réplication du VIH extrêmement rapide (un virus peut produire en moyenne 10000 virions par jour, qui équivaut à mille milliards de virus en 4 jours) serait à l'origine des souches mutantes et donc compromet l'efficacité de l'association des médicaments antiretroviraux (**Alcaro et al., 2011 ; Harrigan et al., 2005 ; Nolan, et al., 2005**). Les études de **Burda et al., 2010** réalisées dans les régions du Sud-Ouest et du Nord-Ouest au Cameroun ont démontré que sur 28 patients VIH 1 positifs après 12 mois de traitement aux antiretroviraux de première intention, on a prouvé que 39% de ces patients présentaient des résistances aux inhibiteurs nucléosidiques et 46% aux inhibiteurs non- nucléosidiques de la TI. Ceci était dû à la présence des mutations au niveau de la séquence virale de la transcriptase virale.

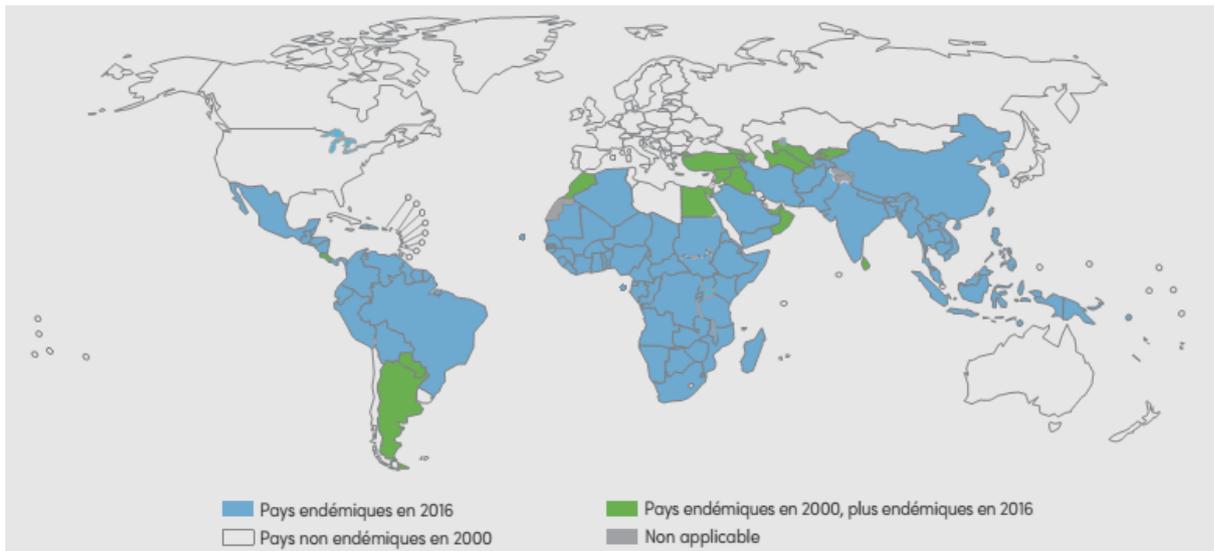
L'infection par le VIH et le paludisme se chevauchent dans les régions géographiques endémiques particulièrement en Afrique sub-Sahérienne. Le traitement des personnes infectées par le VIH consiste en l'administration des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des protéases. De ces faits les travaux de **Nsanzabana et Rosenthal 2011** et **Parihk et al.,(2005)** ont démontré l'activité antiplasmodial *in vitro* des inhibiteurs de la TI et des protéases sur les stades hépatiques du *Plasmodium* pour une meilleure efficacité du traitement de ces infections.

## **I-2 GENERALITES SUR LE PALUDISME**

### **I-2-1 Définition du paludisme**

Le paludisme est défini comme une maladie due à l'infection des hématies par des parasites du genre *Plasmodium* (**OMS, 2013**). La distribution mondiale du paludisme est représentée dans la figure ci- dessous.

## I-2-2 Répartition géographique et Epidémiologie en Afrique et au Cameroun



Source : OMS, 2016

**Figure 9 : Distribution du paludisme dans le monde de 2000-2016**

En 2016, le paludisme est endémique dans 91 pays et territoires repartis en Amérique du sud et centrale, en Asie du sud-est et en Afrique sub-Saharienne qui constituent essentiellement les pays en voie de développement (OMS, 2017).

L'Afrique est la région la plus touchée avec 90% des cas de paludisme. En Europe, le paludisme a été éradiqué. Toutefois, des réintroductions temporaires peuvent se produire et des cas isolés surviennent (paludisme d'aéroport). Mais c'est actuellement le paludisme d'importation qui sévit (OMS, 2017 ; Decastela *et al.*, 2003 ; Talarmin *et al.*, 2002).

Le paludisme est l'une des maladies mortelles. Selon les derniers rapports de l'OMS, on a estimé 216 millions des cas d'infections palustres et 445000 décès. On dénombre 3,3 milliards d'individus qui sont à risque dans le monde (OMS, 2017 ; 2016).

L'Afrique Subsaharienne est la région la plus touchée par le paludisme où on note 114 millions de personnes atteintes et 92% de décès sont dénombrés. Dans cette région, le nombre de décès dus au paludisme chez les enfants de moins de 5 ans a été estimé à 303 000, soit 70% du total mondial toutes tranches d'âge confondues (OMS, 2016).

Le paludisme touche de façon disproportionnée les populations pauvres ne possédant pas les moyens de se traiter ou qui ont un accès limité aux soins de santé. En plus des pertes humaines, le paludisme fait des ravages sur le plan socio-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 (OMS, 2009). Dans la région sub-saharienne, chaque année

depuis 2000, le coût de prise en charge s'élève à 300 million US\$ pour des cas de paludisme (OMS, 2016).

En Afrique Centrale, le Cameroun est l'un des pays africains où le paludisme est un problème de santé publique majeur. En effet 71% des individus vivent dans les zones à transmission élevée (OMS, 2014). En 2016, le nombre de cas de paludisme étant estimé à 5440000 et 8000 décès ont été dénombrés (OMS, 2017). De même le paludisme est classé, comme la deuxième cause de mortalité après le VIH avec 14% de décès (CDC, Cameroun, 2013). Cette maladie est à l'origine de 40 % des motifs de consultations dans les formations sanitaires. Il représente 40 % des décès chez les enfants de moins de 5 ans ; 35% de la mortalité dans les formations hospitalières et 40% du budget annuel de santé des ménages. Sur le plan social, le paludisme constitue l'une des causes majeures d'absentéismes dans les écoles (OMS Cameroun, 2009; MSP, 2007).

### I-2-3 Physiopathologie

#### I-2-3-1 Espèces plasmodiales humaines

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire de l'embranchement des Apicomplexa, de la classe des Haemosporidea de la famille des Plasmodidae, du genre *Plasmodium*. Il existe plus de 200 espèces du genre *Plasmodium* infectant les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Rich et Ayala, 2003). De ces espèces plasmodiales, cinq sont responsables de la pathologie humaine: *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* et *P.knowlesi* (Dondorp et al., 2009 ; Cox-Singh et al., 2008).

*P. falciparum* est l'espèce la plus dangereuse de toutes les espèces et est responsable de la fièvre tierce maligne. En 2016, elle a été à l'origine de 99 % des cas de paludisme en Afrique sub-Sahérienne. Elle est distribuée dans toutes les zones tropicales et subtropicales et provoque des complications sévères entraînant la mort (OMS, 2017 ; Snow et al., 2005; Gardner et al., 2002). Cette espèce développe une résistance aux antipaludiques d'usage couramment utilisés. Les co-infections de celle-ci sont fréquentes avec *P.vivax* (Nicolas et al., 2000).

*P. vivax* est une autre espèce qui entraîne un problème de santé public significatif dans certaines régions du monde. En 2016, La plupart des cas se retrouve essentiellement en Amérique (64%), suivie de la région Asie du Sud Est (40%) et la méditerranéenne orientale (30%). Dans la région africaine en 2015, le nombre des cas a été estimé à 10% En particulier, plus de 80% des cas de paludisme à *P. vivax* ont été dénombrés dans trois pays (Ethiopie, Inde et Pakistan). Elle s'adapte à de faibles températures et donc plus facilement aux climats tempérés. En général, cette espèce est responsable de la "fièvre tierce bénigne". Cependant des cas graves et des décès dus au paludisme à *P. vivax* ont été signalés dans toutes les régions endémiques. En

2015, le nombre de décès dus au paludisme à *P. vivax* est estimé à 3100 décès en 2015 dont 86% hors de l'Afrique (OMS, 2017 ; 2016). *P. vivax* a la particularité de ne pas reconnaître les globules rouges sans antigène Duffy (sert à l'adhérence du *Plasmodium* au niveau des récepteurs des globules rouges), circonstance extrêmement fréquente (85%) chez les populations d'Afrique Centrale et Occidentale. D'où elle procure une certaine protection pour *P. vivax* chez ces populations (Picot, 2006). Par ailleurs, elle a la capacité de produire des formes de dormances dans les hépatocytes humains (hypnozoïte) comme *P. ovale*. Ceux-ci peuvent s'activer après plusieurs mois ou années (Nicolas *et al.*, 2000; Krotoski *et al.*, 1982).

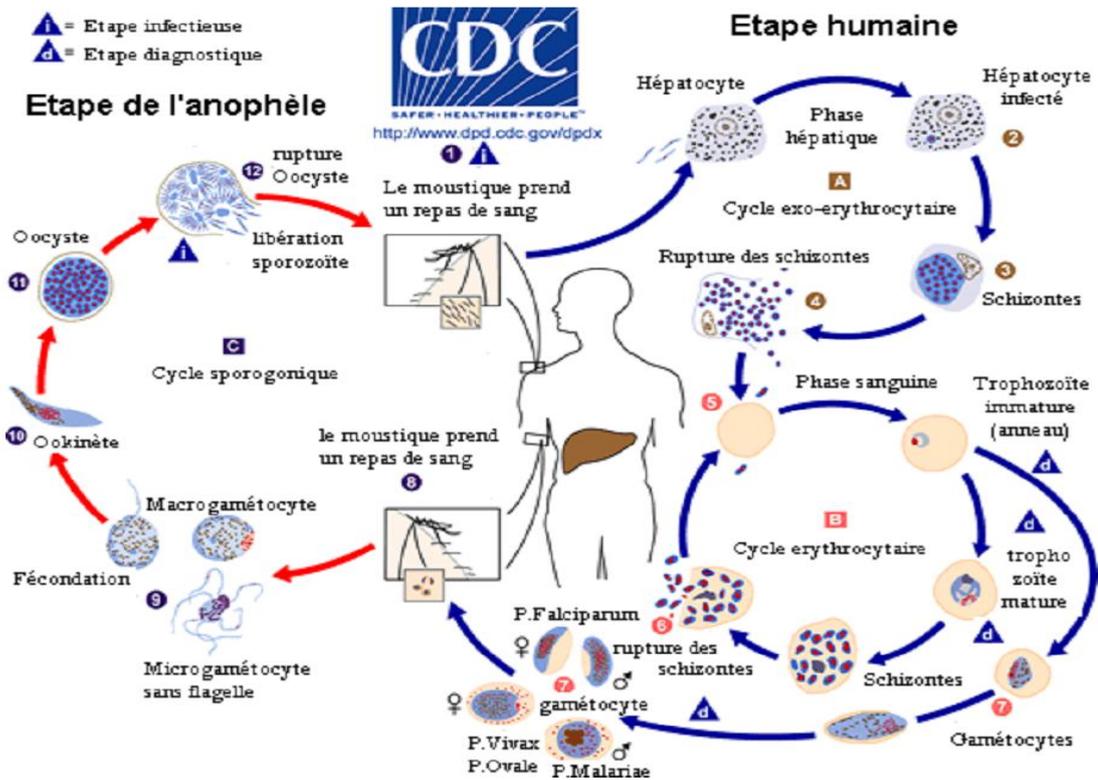
*P. ovale* est l'espèce la plus rare et la plus sensible à l'immunité humaine. Son cycle de vie est semblable à celui de *P. falciparum* et *P. malariae* mais elle est moins dangereuse que *P. falciparum*. Celle-ci produit également des hypnozoïtes comme *P. vivax* (Chin *et al.*, 1971). Elle est retrouvée en Afrique subsaharienne et est responsable de la fièvre tierce bénigne (ANOFEL, 2002).

*P. malariae* est l'espèce distribuée partout dans le monde. Elle provoque les fièvres tous les 3 jours et est donc responsable des fièvres dites quartes bénignes (ANOFEL, 2002). Sa période d'incubation est très longue mais son incidence est faible par rapport au *P. falciparum*. Elle est impliquée dans des infections chroniques qui peuvent provoquer des réactions immunologiques entraînant parfois des complications rénales (Muller *et al.*, 2007).

*P. knowlesi* est une espèce nouvellement décrite et se retrouve en Asie du Sud-est. C'est le plasmodium du singe proche génétiquement de *P. vivax*, et microscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert en 1965 chez l'Homme sur l'île Bornéo en Malaisie (mais était connu bien antérieurement chez le singe). Son cycle de vie dure 24 h. Les cas humains sont de plus en plus fréquents et provoquent des complications sévères (Singh *et al.*, 2004).

### **I-2-3-2 Cycle de vie de *Plasmodium* spp**

Les parasites de *Plasmodium* ont un cycle biologique similaire (Figure 10) et nécessite un hôte intermédiaire (l'Homme) et un hôte définitif (le moustique) qui se déroule à l'extérieur des érythrocytes (cycle exo-érythrocytaire) et à l'intérieur des érythrocytes (endo-érythrocytaire).



Source: CDC Adaptée de [http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm)

**Figure 10 : Cycle biologique du *Plasmodium* sp :**

Ce cycle est subdivisé en deux phases différentes :

**Phase asexuée chez l'Homme:** la forme de sporozoïtes des parasites présente dans les glandes salivaires d'un moustique du genre *Anopheles* est injectée à l'Homme lors d'un repas sanguin. Ces sporozoïtes pénètrent les cellules hépatiques où ils prennent le nom de cryptozoïtes. C'est le début d'un premier cycle de multiplication asexuée, appelé cycle exo-érythrocytaire. Au sein d'une vacuole, ils grossissent, se divisent par une série de mitoses et constituent en une semaine les corps bleus (schizontes matures) volumineux, déformant l'hépatocyte et repoussant son noyau en périphérie. L'éclatement des corps bleus libère de nombreux mérozoïtes, qui pour la plupart sont libérés dans des érythrocytes pour suivre le cycle endo-érythrocytaire de leur développement, seconde phase de multiplication asexuée (Greenwood *et al.*, 2008; Rich et Ayala, 2003 ; Sherman, 1998).

En cas d'infestation par *P. vivax* ou *P. ovale*, les reviviscences tardives sont expliquées soit par des réinfestations successives d'hépatocytes par les mérozoïtes, soit par une persistance prolongée (jusqu'à plusieurs années) de formes quiescentes: les hypnozoïtes (Ripert *et al.*, 1996). *P. falciparum* et *P. malariae*, ne comportent ni hypnozoïte, ni schizogonie tissulaire secondaire.

Dans le sang, s'effectue chaque mérozoïte pénètre une hématie et subit d'abord une phase de croissance au cours de laquelle il passera par un premier stade dit d'anneau (ou trophozoïte

immature) puis s'y transforme en un stade de trophozoïte mature. Il grossit et son noyau se divise, donnant alors un stade schizonte entraînant une destabilisation de la membrane cellulaire. Celui-ci se charge de pigment malarique ou hémozoïne. La multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique forme un schizonte mûr ou un corps en rosace. Le corps en rosace dilaté et mûr éclate. Ceci est à l'origine de l'accès fébrile, et libère aussi des mérozoïtes qui vont parasiter des hématies vierges et effectuer de nouveaux cycles schizogoniques érythrocytaire. Chaque cycle érythrocytaire dure 48 heures pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*, et 72 heures pour *P. malariae*. Après plusieurs cycles schizogoniques, certains trophozoïtes vont être détournés du cycle érythrocytaire pour former des éléments à potentiel sexué (mâle et femelle), et se différencier en gamétocytes. Lesquels gamétocytes n'évoluent pas chez l'Homme et ne peuvent poursuivre leur évolution que lorsqu'ils sont ingérés par des anophèles lors d'un repas sanguin repas de sang assurant ainsi la pérennisation de l'espèce (**Blackman, 2008; Greenwood et al., 2008**).

**Phase sexuée chez l'anophèle :** Au bout d'un certain nombre de cycles, certains trophozoïtes prennent une orientation différente et engagent la phase de reproduction sexuée. Ils se différencient en gamétocytes qui deviennent mâle ou femelle. Ceux-ci sont ingérés par une femelle Anopheles lors d'un repas sanguin et gagnent le tube digestif du moustique. La fécondation a ainsi lieu, aboutissant à un ookynète. Celui-ci migre à travers la paroi du tube digestif jusqu'à sa face externe où il s'implante et devient oocyste. Une série de mitoses a alors lieu, jusqu'à la libération de nouveaux sporozoïtes. Ceux-ci gagnent les glandes salivaires et y attendent un nouveau repas sanguin pour infecter un nouvel Homme (**Greenwood et al., 2008 ; Ménard, 2005 ; Sherman, 1998**).

#### **I-2-4 Différentes formes de paludisme**

La phase hépatique ou exo-érythrocytaire est asymptomatique, les signes cliniques sont liés à la phase de schizogonie érythrocytaire. Les manifestations cliniques 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 (**Berry, 2006 ; Benoit-Vical et al., 2000**).

##### **I-2-4-1 L'accès palustre simple**

Il est caractérisé par une fièvre de plus de 40°C, des frissons suivis d'une chute de température accompagnée de sueurs abondantes et d'une sensation de froid (**Malvy et al., 2000**). Cette fièvre est associée à divers symptômes tels que les vomissements, pertes d'appétit, des céphalées, des douleurs abdominales et diarrhées observés chez les enfants (**Greenwood et al., 2008 ; Ashley et al., 2004**).

#### **I-2-4-2 Le paludisme viscéral évolutif**

Ce type de paludisme est rare et résulte d'infections répétées en zone d'endémie. Il est fréquent chez les enfants de 2 à 5 ans n'ayant pas été soumis à une prophylaxie ou à un traitement efficace et se situant au début de la période d'acquisition de l'immunité. La symptomatologie du paludisme viscéral évolutif associe pâleur, asthénie, anorexie, œdèmes des membres inférieurs, anémie et splénomégalies (hypertrophie de la rate) (Malvy *et al.*, 2000).

#### **I-2-4-3 La fièvre bilieuse hémogloburinique**

Elle survient chez des européens expatriés depuis plusieurs mois ou années en zone tropicale et ayant des antécédents à *Plasmodium falciparum* (Gentilini *et al.*, 1993). Elle se manifeste par une fièvre élevée, un état de choc avec prostration, des urines de plus en plus foncées, une anémie, une hémoglobinurie et surtout une insuffisance rénale (Malvy *et al.*, 2000).

#### **I-2-4-4 L'accès palustre grave à *Plasmodium falciparum***

Il est encore appelé accès pernicieux palustre ou paludisme cérébral. Il 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 observée chez les femmes enceintes et les enfants ce qui contribue à l'acidose. Le paludisme peut entraîner des contractions prématurées ou des avortements spontanés, ce qui accroît le risque de décès maternel (Greewood *et al.*, 2008 ; Malvy *et al.*, 2000).

#### **I-2-5 Thérapie antipaludique**

Le traitement du paludisme tient compte de trois facteurs principaux qui sont: l'espèce plasmodiale infectante, le statut clinique du patient et le profil de résistance aux médicaments antipaludéens dans la région du monde où la personne a contracté la maladie (CDC, 2007).

Il existe plusieurs médicaments antipaludiques et nous nous limiterons aux principaux les plus utilisés. Ces médicaments peuvent être utilisés soit en traitement préventif ou soit curatif (après le diagnostic d'une infection). Les antipaludéens sont groupés en deux grandes classes selon la localisation de leur action sur le cycle de vie du *Plasmodium*: les schizontocides et les gamétocytocides (Basco *et al.*, 1994).

##### **I-2-5-1 Les schizontocides érythrocytaires**

Ils contiennent tous un noyau quinoléique du paludisme. Ce groupe comprend :

##### **➤ Les 4-aminoquinoléines**

**La Chloroquine et l'Amodiaquine** : ce sont des molécules de synthèse. Leur mécanisme d'action est semblable à celui de la Quinine. Elles se fixent sur l'ADN et/ou l'ARN du parasite et inhibent ainsi sa synthèse. La résistance de ces composés à *P. falciparum* en Afrique a été découverte et elle est due à des mutations sur le gène Pfmdr (*P.falciparum* multidrug resistant). Cette dernière inhiberait la polymérisation de l'hème au niveau de la vacuole digestive.

Cependant elle n'est pas recommandée en prophylaxie en raison de la toxicité hépatique et des troubles hématologiques (Mouchet, 2004; De, 1998 ; Duraisingh *et al.*, 1997 ; Bray *et al.*, 1996).

#### ➤ Les aminoalcools

**La Méfloquine** est un médicament efficace contre toutes les formes de paludisme (OMS, 2006). Malgré quelques résistances très localisées en Thaïlande et au Vietnam, elle reste très utilisée en Asie contre les souches multi-résistantes (Mouchet, 2004). Le mécanisme d'action de la Méfloquine n'est pas encore connu mais il a été montré que, comme toutes les quinoléines, elle inhibait la cristallisation de l'hème (Hawley *et al.*, 1998).

#### ➤ Les antifolates

Le principal représentant est le Fansidar qui est l'association d'un inhibiteur de la dihydropteroate synthase (DHPS) sulfamide antibiotique, la Sulfadoxine et d'une diaminopyrimidine antifolinique, un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR), la pyriméthamine (dérivé de la pyrimidine). Les antifolates agissent au niveau de la voie de synthèse des folates qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques du parasite (OMS, 2006 ; Sirawaraporn *et al.*, 1997). La Sulfadoxine Pyriméthamine s'est révélée comme un substituant approprié de la Chloroquine avec un usage à grande échelle en Afrique. Malheureusement des cas de résistances sont également apparus dans certains pays d'Afrique comme la Côte d'Ivoire, la Gambie, le Nigeria, l'Ethiopie particulièrement au Cameroun dans le Sud-ouest (Mbacham *et al.*, 2005 ; Landgraf *et al.*, 1994).

#### I-2-5-2 Les gamétocytocides

Ils détruisent les formes sexuées du parasite permettant ainsi d'interrompre la transmission de l'infection au moustique. Les plus connus sont les 8- aminoquinoléines. Le principal représentant est la Primaquine. Cette molécule est également très active sur les formes gamétocytes de quatre espèces de *Plasmodium*. Elle appartient à la classe des médicaments pour traiter *P. vivax* ou *P. ovale* et tue les hypnozoïtes évitant les phénomènes de reviviscences. Son inconvénient est sa toxicité chez les sujets déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) en Afrique, où elle provoque des hémolyses et entraîne une anémie sévère (Ganesan *et al.*, 2012; Shanks *et al.*, 2000).

#### I-2-5-3 Les antipaludiques naturels

##### La Quinine

C'est un alcaloïde naturel du quinquina, isolée des écorces de *Cinchona calisaya* et *Cinchona succirubra* retrouvés dans les forêts d'Amazonie péruviennes. Elle est la plus ancienne des antipaludiques et reste le principal antipaludique recommandé dans le traitement du paludisme grave. La Quinine est un schizontocide naturel qui a une activité optimale contre les

trophozoïtes âgés et les jeunes schizontes (**Skinner et al., 1996**). Il se fixe sur la membrane de l'hématie parasitée et se concentre fortement dans les vacuoles digestives des schizontes qui assurent la dégradation de l'hémoglobine. Il en résulte une accumulation de molécules d'hème. Celle-ci se lie à l'hème et inhibe la cristallisation de l'hème. Le complexe Quinine-hème est capable d'endommager les membranes parasitaires par peroxydation lipidique et par libération d'hème en présence de glutathion (**Atamna et Ginsburg; 1995**). Cette molécule est principalement utilisée pour le traitement curatif des accès palustres pernicioeux (neuropaludisme). Il existe peu de résistances à ce produit, surtout en Asie (**Portet, 2007**).

### **L'Artémisinine et ses dérivés**

L'Artémisinine est encore connue sous le nom de « qinghaosu »; c'est une lactone sesquiterpénique naturelle extraite des feuilles d'*Artemisia annua* (Asteraceae) utilisée comme fébrifuge pendant plus de 200 ans dans la médecine traditionnelle chinoise. Elle est active sur toutes les espèces de *Plasmodium*. Son mode d'action encore mal élucidé est lié à l'activité de la famille des endopéroxydes. Il interagirait avec l'hème des parasites et certaines protéines parasitaires dont une pompe à calcium ATP-dépendante. Celui-ci agit très rapidement sur les stades érythrocytaires du parasite, du trophozoïte jeune au schizonte mûre (**OMS, 2006; Hoppe et al., 2004 ; Eckstein-Ludwig, 2003; Delhaes et al., 2002**). Les dérivés les plus utilisés sont l'Artéméther, l'Artésunate et la Dihydroartémisinine (**OMS, 2006 ; Krishna et al., 2004**). L'Artémisinine et ses dérivés possèdent la plus grande rapidité d'action et sont bien tolérés (**Portet, 2007; Daily, 2006**).

Ainsi, *P. falciparum* a développé des résistances à ces antipaludiques, notamment à la Chloroquine dans plusieurs régions d'Afrique, d'Asie du Sud-Est et d'Amérique du Sud. Pour cette raison, l'OMS, 2005 recommande les associations médicamenteuses contenant les dérivés d'Artémisinine (**OMS, 2006**).

#### **I-2-5-4 Les associations d'antipaludiques**

Un traitement par association d'antipaludiques (traitement combiné) consiste en l'administration simultanée d'au moins deux schizontocides sanguins ; leurs modes d'actions sont indépendants et les cibles biochimiques intraparasitaires différents. Ceci a pour but d'améliorer leur efficacité thérapeutique et de ce fait retarder l'apparition d'une résistance à chacun des constituants de cette association (**OMS, 2006**). Ces associations sont connues sous le nom d'ACT (Artemisinin-based Combined Therapy) et sont les combinaisons thérapeutiques associant les dérivés d'artémisinine à d'autres antipaludiques.

A titre d'exemples nous pouvons citer :

- L'association Artéméther-Luméfantine (Coartem)

- L'association Artésunate-Amodiaquine (Artemiam)
- L'association Artésunate-Méfloquine (Artequin)
- L'association Artésunate-Sulfadoxine-pyriméthamine (Co-artinate) (OMS, 2006).

Les combinaisons thérapeutiques constituent les meilleurs médicaments disponibles particulièrement pour le paludisme à *P.falciparum* (OMS, 2009). Toutefois ces médicaments coûtent dix fois plus chères que ceux utilisés en monothérapie dans les continents africains (OMS, 2001). Des résistances parasitaires à ces molécules apparues récemment au Cambodge et en Thailand, compromettent les efforts de lutte (Kyaw *et al.*, 2015 ; Dondorp *et al.*, 2009).

### **I-2-6 Les cibles potentielles des médicaments antipaludiques**

Etant donné l'émergence des résistances des médicaments existant et la recrudescence du paludisme, la recherche des antipaludiques se focalise sur les cibles validées pour le développement de nouvelles molécules candidats d'où l'intérêt d'identifier de nouvelles cibles pour le futur en étudiant les mécanismes métaboliques et biochimiques du parasite (Alam *et al.*, 2009; Deharo *et al.*, 2002).

Ainsi, un certain nombre de cibles a été identifié ces dernières années chez *Plasmodium*. On distingue ainsi:

#### **I-2-6-1 La vacuole digestive**

Elle est le siège de l'hydrolyse d'hémoglobine érythrocytaire en hème, qui est ensuite polymérisé en un pigment insoluble hémozoïne et globine, par la suite dégradé en acides aminés. Les médicaments antipaludiques qui agissent à ce niveau de processus pourraient empêcher généralement la formation d'hémozoïne, par conséquent entraîne une accumulation de l'hème, qui est toxique pour le parasite (Tekwani et Walker, 2005).

#### **I-2-6-2 Le cytoplasme**

Il est constitué de 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; l'apicoplaste est un plastide non photosynthétique (reliquat de chloroplaste) acquis par transfert à partir d'une algue eucaryote. Cet organite dénommé apicoplaste. Cet organite spécialisé est impliqué dans les fonctions spécifiques telles que la synthèse de l'hème, des acides gras, et des isoprénoïdes (Goodman et McFadden, 2013; Nair et Striepen, 2011; Kita *et al.*, 2001)

#### **I-2-6-3 La membrane cytoplasmique**

Elle est composée de phospholipides et de canaux calciques. En effet, la membrane qui entoure la vacuole parasitophore du parasite effectue une synthèse des phospholipides. La phosphatidylcholine est le lipide le plus abondant dans cette membrane. Les antipaludéens qui

ciblent la synthèse des phospholipides, inhibent donc le transport de choline (Vial et Calas, 2001).

#### **I-2-6-4 Les protéases parasitaires à *Plasmodium***

La dégradation de l'hémoglobine par le parasite implique l'action de trois types de protéases au sein de la vacuole digestive pour avoir les acides aminés indispensables à leur survie: les protéases aspartiques (Plasmepsine1 et 2), les protéases cystéiques (Falcipain1, 2 et 3) et metalloprotéases (falcilysine) (Moura *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2002 ; Shenai *et al.*, 2000 ; Eggleston *et al.*, 1999). Ce clivage engendre la production d'hème libre toxique (Ferriprotoporphyrin-IX) induisant la production d'espèces radicalaires oxygénées (O<sub>2</sub>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), source d'un stress oxydant. Pour se protéger, le parasite sous l'action des protéases de la vacuole, séquestre l'hème sous une forme crytalline appelée hémozoïne ou pigment malarique (Bhisutthibhan *et al.*, 1998). Cet hème est considéré comme la cible d'action de la chloroquine et des antipaludiques tels que l'Artémisinine qui agiraient au niveau de l'oxydation de l'hémoglobine. Ainsi, Falcipain-2 et falcipain-3 sont les proteases à cysteine qui sont les hémoglobinasés essentielles de *P. falciparum*, et représentent donc des cibles potentielles des médicaments antipaludiques (Boyom, 2004 ; Singh et Rosenthal, 2001).

Malgré la mise sur pied effective des combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances.

#### **I-2-7 Résistances aux médicaments antipaludiques**

La résistance aux antipaludiques s'explique par la grande diversité génétique de *P. falciparum* due à un taux élevé de mutations dans son génome. Le nombre élevé de parasites infectant les humains fait que ces mutations finissent par apparaître et par être sélectionnées par la pression médicamenteuse (Noranate *et al.*, 2007). Il existe d'autres facteurs favorisant l'émergence de résistances qui sont: une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés (automédications abusives, non respect de la posologie) conduisant à des traitements incomplets, une indisponibilité des médicaments efficaces et la consommation de contrefaçons sous dosées, facteurs permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludiques et d'être sélectionnés pour leur aptitude à résister (Pradines *et al.*, 2010). D'ailleurs les travaux de Kyaw *et al.* (2015) ont déclaré les cas de résistance des combinaisons à base d'Artémisinine à *P. falciparum* au Myanmar en Thailand dû à une mutation du marqueur K13 porté par ce parasite.

Ainsi la propagation, l'émergence des résistances aux molécules contre l'infection à *Plasmodium* et au VIH et l'apparition des effets antagonistes dus à l'association des molécules

antiretrovirales et antipaludiques posent un problème sérieux de santé publique. Ceci justifie la recherche de nouvelles molécules actives sur le VIH et le paludisme.

L'utilisation des plantes médicinales serait une source de découverte de nouveaux composés de bonne innocuité. En Afrique, les substances phytochimiques ont été utilisées pendant longtemps pour la lutte contre les infections. Au Cameroun, l'utilisation des plantes médicinales est très connue vue leur efficacité. Il existe un très grand répertoire des espèces de la famille des Annonacées avec un large spectre d'activités biologiques tels que antimicrobien, antipatozoaire et antivirales (**Ngouana *et al.*, 2015 ; Yamthe *et al.*, 2015 ; Taiye *et al.*, 2011, Boyom *et al.*, 2011**).

### **I-3 GENERALITES SUR LES ANNONACEAE**

Les Annonaceae, communément connus sous le nom de "de corossol" ont été longtemps utilisés par les communautés dans les régions forestières (**Letouzey, 1985**). Leur importance médicale a été largement reconnue (**Adjanohoun et al., 1996 ; Burkill, 1985**). Les Annonacées forment une famille de plantes les plus naturelles et les plus homogènes, tant par leur morphologie que par leur habitat. On dénombre actuellement environ 120 genres et 1100 espèces répandues sous les tropiques, dont la plupart se trouve en forêt dense humide de basse altitude (**Fournet 1979 ; Le Thomas 1969**). Elles sont aussi fréquentes mais dispersées dans le sous-bois de la forêt, et le long des cours d'eau et dans les galeries forestières.

Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes caractérisés par une odeur aromatique spéciale que l'on retrouve particulièrement dans les écorces, les fleurs et les fruits de la plupart des espèces. Ils mesurent environ 7-10 m et 15-20 m de hauteur pour les arbustes et les arbres respectivement (**Mabberley, 2008 ; Leboeuf et al., 1982**). Les Annonaceae représentent une famille intéressante du point de vue économique, thérapeutique et traditionnel. Trois espèces d'annonaceae ont été étudiées dans ce travail: *Monodora tenuifolia*, *Uvaria angolensis* et *Polyalthia suaveolens*.

#### **I-3-1 *Polyalthia suaveolens* (Engl et Diels)**

##### **I-3-1-1 Description botanique et répartition géographique**

Cette espèce est aussi appelée *Greenwayodendron suaveolens* (**Engl et Diels**) ou *Polyalthia acuminata*. Il existe plusieurs appellations locales de la région du Sud au Cameroun et en Afrique:

##### **Noms locaux:**

- Otoungui en Ewondo
- Bakélé (pygmé bibaya): Betungha
- Gabon: Tsenge

*Polyalthia* est parmi les genres les plus importants de la famille des Annonacées car il compte environ 150 espèces. Il est constitué d'arbres et d'arbustes à feuilles glabres ou à indument de poils simples. Les fleurs hermaphrodites ou polygames sont solitaires, axillaires, extra-axillaires à oppositifoliées, naissant parfois sur le vieux bois. Les graines sont parfois entourées d'une cannelure équatoriale et les fruits à méricarpes stipités, ovoïdes à globuleux (**Le Thomas, 1969**). Parmi les espèces figure l'espèce *Polyalthia suaveolens* (**Figure 11**)

C'est un arbre extrêmement commun de la strate moyenne de la forêt dense humide, d'une vingtaine de mètre de haut (35-40 m) et de 70 cm de circonférence. L'écorce est lisse gris clair, très odorante à tranche arrangée, avec un rhytidome superficiel noir. Le fût, souvent très

étroit, se termine par une cime dense formée de branches plus ou moins horizontales serrées (**Le Thomas, 1969**).

*P. suaveolens* est répandu au Nigéria, à l'Est de la République Centrafricaine au sud de l'Angola (**Le Thomas, 1969**). On le retrouve fréquemment dans les forêts denses du Centre et du Sud du Cameroun à Mbalmayo et Ngoyang (**Tsabang et al., 2012**).



Source : Photographie Ngoutane 2014

**Figure 11 : Partie feuillée de *P. suaveolens***

### **I-3-1-2 Etude ethnobotanique et ethnopharmacologique**

Au Congo dans la région de Bongo, *P. suaveolens* est utilisée comme bois de construction. Dans la même région les écorces de tronc sont utilisées comme purgative, de même la macération à l'eau ou la poudre lutte contre la constipation. Cette médication facilite également l'accouchement et lutte contre la stérilité chez les femmes.

Le macéré des écorces est utilisé pour traiter les maladies sexuellement transmissibles (MST) et les feuilles bouillies associées à d'autres plantes sont utilisées pour des bains rituels destinés à enlever la malédiction (**Burkill, 1985; Le Thomas 1969; Bouquet, 1969**).

Dans certaines régions du Cameroun et du Gabon, une infusion de l'écorce est utilisée pour guérir les maux de ventre. Cette infusion est considérée comme vermifuge au Libéria. La pulpe des feuilles ou des écorces associées à celle de la maniguette et mélangées à l'huile de palme servent au massage des personnes atteintes de courbatures fébriles ou de rhumatisme (**Burkill, 1985; Le Thomas 1969; Bouquet, 1969**).

Au Gabon, le fruit de *P. suaveolens* est comestible et est utilisé pour la fabrication des rampes de sagaies (**Van der Veen, 1991**).

Une étude ethnobotanique a été réalisée par **Betti en 2004** dans la réserve du Dja chez les pygmées Baka dans le but d'identifier les plantes utilisées dans la pharmacopée générale des pygmés. A l'issue de cette étude 102 plantes médicinales appartenant à 97 genres et 51 familles

ont été répertoriées. La toux, le dysfonctionnement de la lactation, le paludisme et les maux de dents sont les principales maladies traitées dans ces régions. Parmi ces plantes, les écorces de *Polyalthia suaveolens* associées à *Elaeis guineensis* sous forme de cendre par scarification sont utilisées pour traiter le paludisme dans cette région. En 2009, **Betti et Lejoly** ont recensé *Polyalthia suaveolens* parmi les plantes qui traitent la jaunisse dans la réserve du Dja.

**Jiofack et al., 2010** ont fait une étude sur l'utilisation ethnobotanique des plantes et l'implication de la conservation de la biodiversité dans les forêts de la vallée de Nyong (Cameroun) et ont répertorié *P. suaveolens* comme une espèce exploitée à l'échelle industrielle pour fabriquer les feuilles de papiers formats grâce à sa richesse en caoutchouc et en latex.

### **I-3-1-3 Travaux antérieurs**

**Hocquemiller et al en 1981** en étudiant la composition chimique de l'huile essentielle des écorces de *P. suaveolens* ont révélé la présence d'un sesquiterpène à noyau indole (polyvéoline). Quant aux essences des feuilles, la composition chimique était constituée de  $\alpha$ -humulène (34,2%) et de  $\beta$ -caryophyllène (32,8%). Pour les fruits on a noté une dominance en myrcène (34,3%), et en (Z)- $\beta$ -ocimène (11,2%) (**Cravo et al., 1991**). Par contre les essences des feuilles ont démontré une richesse en composés tels que le  $\alpha$ -humulène (34,2%) et le  $\beta$ -caryophyllène (32,8%). Les alcaloïdes aporphines et indolesquiterpènes ont été isolés des extraits des écorces de la même espèce (**Hassan et al., 1982**).

Par ailleurs l'activité antifilariale *in vitro* de *P. suaveolens* contre *Onchocerca guttorosa* mâle a été révélée et deux composés sont isolés: le polycarpol et polyveoline (**Nyasse et al., 2006**). Les composés carapolides A et oliverine ont montré une activité filaricide d'*Onchocerca volvulus* adulte (**Titanji et al., 1990**).

L'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'huile essentielle des écorces de *P. suaveolens* a été mise en évidence avec comme produit majoritaire du  $\beta$ -caryophyllène (36,4%) et dans les feuilles l' $\alpha$ -pinène (21,1%) et le  $\beta$ -pinène (22,5%) (**Boyom, 2004**).

L'extrait à l'hexane de l'écorce de tronc de *P. suaveolens* a démontré l'activité trypanocide sur *Trypanosoma brucei* et le polycarpol (triterpène) et la polyvéoline (alcaloïde indolesquiterpène) ont été isolés (**Ngantchou et al., 2010**). Tandis que **Lamidi et al en 2005** ont démontré une forte activité antiproliférative contre la forme promastigote des parasites de la leishmaniose et une bonne activité antifongique des extraits méthanoliques de *P. suaveolens* ( $CI_{50} < 1\text{mg/ml}$ ).

Les huiles essentielles des écorces de *P. suaveolens* ont présenté les activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique. L'analyse chimique a révélé la présence des sesquiterpènes comme constituants majoritaires (**Nyegue et al., 2008**).

### I-3-2 *Monodora tenuifolia* Benth

#### I-3-2-1 Description botanique et répartition géographique

*Monodora tenuifolia* (Figure 12) est une plante généralement appelée « noix de muscade ».

**Nom commun: Noix de muscade africain (Burkill, 1985)**



Source : Photographie Source: IMG\_2863 *Monodora tenuifolia*

<https://www.flickr.com/photos>

**Figure 12 : Partie feuillée de *Monodora tenuifolia***

Le genre *Monodora* est constitué d'arbres ou d'arbustes parfois lianescents, glabres ou à indument de poils simples. Leurs fleurs comportant 3 sépales, sont hermaphrodites, grandes, solitaires ou rarement géminées. Les étamines sont très nombreuses, sessiles, oblongues à thèques extrorses, et connectifs épais, élargis tronqués au dessus des anthères. Les carpelles sont soudés en un ovaire uniloculaire à placentation pariétale. Le genre africain comporte environ 14 espèces tropicales de sous-bois en forêt dense humide ou dans les galeries forestières (Njoku *et al.*, 2012 ; Ekeanyanwu *et al.*, 2010; Burkill, 1985).

*M. tenuifolia* est un petit arbre ayant 17 m de hauteur qu'on retrouve en Guinée, Gabon, et au Cameroun. C'est une plante ornementale attrayante à la fois par leur feuillage et ses fleurs qui apparaissent avant les feuilles. En général leur bois est blanc, assez durable, et de petites dimensions (Irvine, 1961).

#### I-3-2-2 Etude ethnobotanique

A l'issue d'une enquête ethnobotanique, une décoction des racines et de l'écorce est utilisée pour traiter la dysenterie et la fièvre dans la région du Sud-Ouest Cameroun à Buea (Focho *et al.*, 2010 ; Bele *et al.*, 2011). Dans la région du centre, la même préparation des racines est utilisée contre les dermatoses, les céphalées et les soins dentaires (Ndoye, 2001). L'étude faite par Tsabang *et al* (2012) ont montré que la décoction des écorces à Mbalmayo est

administrée oralement pour les douleurs musculaires, les céphalées et favorise la production du lait.

Les feuilles sont utilisées en ethnomédecine pour lutter contre la dysenterie, les racines contre les dermatoses, et l'écorce de tronc contre les céphalées et le mal de dents (**Ndoye, 2001**). Les graines sont empâtées puis utilisées comme insecticides et pour le traitement de la constipation (**Oguntinein et al., 1989**). Les décoctions de racines et d'écorces sont administrées par voie orale pour traiter la fièvre et les dysenteries (**Focho et al., 2010**).

### **I-3-2-3 Travaux antérieurs**

Un alcaloïde hydroisoquinoline tetrabenzyl, le 3-diméthylallylindole a été isolé des extraits éthanoliques des écorces et démontrait des activités antifongiques et anti diarrhéiques (**Oguntinein et al., 1989; Le boeuf et al., 1982**) . Il existe très peu d'investigations concernant *M. tenuifolia*.

L'effet anti diarrhéique des extraits méthanoliques des graines a été étudié et les résultats de cette investigation ont montré que cet extrait réduisait significativement ( $p < 0,05$ ) le transit intestinal du charbon chez les souris induites avec l'huile de castor. Le pourcentage d'inhibition de défécation était de 78,13% à 200 mg/Kg légèrement différent que celui de l'atropine (**Ezenwali et al., 2010**).

**Ngouana et al.**, ont démontré que la combinaison des sous fractions de *M. tenuifolia* et *Terminalia. mantaly* avaient une interaction synergétique et fongicide sur *Cryptococcus neoformans* et *Candida parapsilosis*.

### **I-3-3 Uvaria angolensis (Engl. et Diels)**

#### **I-3-3-1 Description botanique et répartition géographique**

Il existe plusieurs appellations de *Uvaria angolensis* (**Figure 13**).

#### **Synonymes**

*Uvaria bukobensis* (Engler et Diels)

*Uvaria nyassensis* (R.E.Fries)

*Uvaria variabilis* (De Wild)



Source : Photographie, Ngoutane 2014

**Figure 13 : Partie feuillée de *Uvaria angolensis***

Le genre *Uvaria* appartenant à cette famille, qui constitue des buissons d'arbustes, et des lianes ou un arbuste atteignant 6 m de hauteur avec des poils étoilés. Les fleurs sont généralement bisexuelles, rarement unisexuées et souvent obsolètes. Les fruits contiennent de nombreuses graines sont entourées par une saillie (**Troupin, 1982**).

*U. angolensis* est une liane ou un arbuste atteignant 6 m de hauteur. Les feuilles sont à pétiole long de 3-10 mm. Leurs fleurs sont jaunes, solitaires, ou en cymes condensées, pédicelle court, long de 4-6 mm et sépales soudés en cupule dans le bouton. Les fruits sont à pédicelle long de 7-10 mm; méricarpes cylindriques, longs de 1,3-4 cm, larges de 6-20 mm. Les graines sont bisériées, de plus ou moins 1 cm de longueur à maturité, à testa brillant brun-noirâtre (**Le Thomas, 1969**).

Elle est très largement répandue dans les forêts dense humides et rivulaires en Afrique, de la Sierra Leone à la République Centrafricaine jusqu'en Rhodésie du Nord (**Le Thomas, 1969**).

### **I-3-3-2 Etude ethnobotanique**

À notre connaissance les données ethnobotaniques sur *U. angolensis* sont peu connues. Cependant le genre *Uvaria* est généralement utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies telles que la dysenterie, la fatigue, la sénescence, des douleurs abdominales et la cicatrisation des plaies (**Adjanohoun et Assi, 1979**). Le décocté des feuilles et racines est utilisé par les tradipraticiens du Tchad et du Cameroun pour combattre les furoncles, les douleurs intestinales et les convulsions. L'écorce de *Uvaria* sp à Yambetta au Cameroun est utilisé pour traiter la fièvre typhoïde, la fièvre jaune, des maux de tête et l'épilepsie (**Tsabang et al., 2012**).

### **I-3-3-3 Travaux antérieurs**

Les études antérieures sur la caractérisation chimique ont montré que les dihydrochalcones comme anguvetine, flavokawine B et angoletine ont été isolés à partir des racines de *U. angolensis*. Leurs activités antimicrobiennes ont été évaluées *in vitro* contre

*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacteria smegmatis* avec concentrations minimales inhibitrices respectives de 0,78k µg/ml, 1,56 µg/ml et 3,12 µg/ml (**Hufford et Oguntimein, 1982**).

**Hufford et al.** ont isolé et identifié des écorces de racines collectées de *U. angolensis* au Nigéria les composés suivants : 8 dihydrochalcones C-benzylés ou C-méthylés et flavanones.

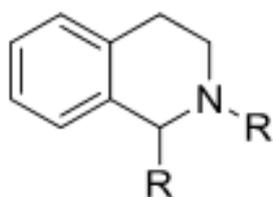
Les travaux menés par **Muhammad et Waterman (1985)** ont montré que les écorces de tronc de *U. angolensis* récoltés dans le parc national Gombe en Tanzanie étaient composées de benzoate de benzyl, dihydrochalcone C- benzylés et 4 indoles, C- et N uvarindoles benzylées A-D. De même ils ont isolé en 1988, trois uvarisquiterpènes (nommés A, B et C) des écorces du tronc de cette plante.

Les huiles essentielles extraites des écorces de tronc et des feuilles de *U. angolensis* ont montré une inhibition *in vitro* sur la souche W2 de *P. falciparum* avec des CI<sub>50</sub> de 19,76 µg/ml et 35,02µg/ml respectivement (**Boyom, 2004**).

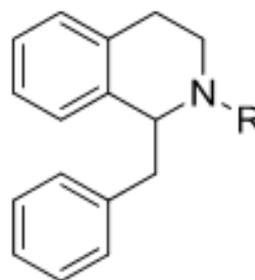
#### **I-3-4 Bref aperçu sur les activités biologiques des métabolites secondaires des Annonaceae**

Du point de vue composition chimique, la famille des Annonaceae est constituée des classes de métabolites secondaires variées. On retrouve principalement, les alcaloïdes (**Figure 14**), les acétogénines, les terpénoïdes et les composés phénoliques (**Le Ven, 2012**).

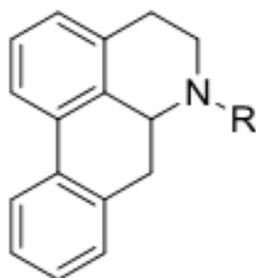
Les alcaloïdes quinoléiques sont isolés en majorité et dérivent du noyau tétra-hydro-isoquinoléique qui est généralement benzylé. Ces alcaloïdes sont présents dans tous les organes des plantes de cette famille. Par exemple, les alcaloïdes quinoléiques se trouvent dans les écorces de *Cinchona* et sont doués des propriétés antiplasmodiales.



Tétrahydroisoquinoléines



Benzyl -tétrahydroisoquinoléines



Aporphine

Source : Le Ven, 2012

#### Figure 14 : Différents noyaux alcaloïdiques chez les Annonaceae

Le groupe le plus important est constitué par les aporphinoïdes, possédant le noyau aporphine. Ils possèdent des activités biologiques telles que : antibactériens, antifongiques, déprimeurs du système nerveux (**Champy *et al.*, 2004**).

Les huiles essentielles extraites à partir des plantes aromatiques des Annonaceae sont généralement constituées de monoterpènes et de sesquiterpènes. Elles sont connues pour leurs activités antiplasmodiales, antiradicalaires, antifongiques, antibactériennes et cytotoxiques (**Bakarnga-Via *et al.*, 2014 ; Nyegue *et al.*, 2008 ; Boyom, 2004**).

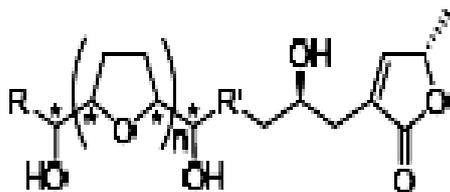
Les composés phénoliques sont constitués essentiellement des phénols simples, des acides phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, des coumarines, des lignanes, des lignines, des chalcones et des xanthones (**Stalikas, 2007**). Les tanins chez *Annona muricata*, ont démontré des propriétés astringentes, antidiarrhéiques, cicatrisantes et antihémorragiques. Les flavonoïdes et les chalcones possèdent des activités anti-VIH et antifongiques (**Wang *et al.*, 2015 ; Rosandy *et al.*, 2013**).

Les acétogénines sont une classe des composés naturels isolés principalement des plantes de la famille des Annonaceae (**Alali *et al.*, 1999 ; Naoto et Tetsuaki, 2009**). Ces molécules se retrouvent également chez les Lauraceae (**Boyom, 2004**). Par ailleurs, **Jolad *et al.*, 1982** ont isolé le premier acétogénine, l'uvacine substance obtenue des extraits éthanoliques des racines d'*Uvaria accuminata* et montrant des propriétés antitumorales sur la leucémie murine P388.

Depuis, plus de 400 acétogénines des Annonaceae ont été découverts et caractérisés à ce jour (Spurr et Brown, 2010). Ces substances ont démontré diverses activités biologiques intéressantes telles que les activités antitumorales *in vivo*, antipesticides, antipaludiques et antibactériennes (Boyom *et al.*, 2011 ; Mc Laughlin, 2008 ; Bermejo *et al.*, 2005 ; Alali *et al.*, 1999). L'une des activités biologiques les plus importantes est l'activité anti-tumorale cytotoxique. En effet certains acétogénines inhibent la croissance des cellules cancéreuses multirésistantes (Oberlies *et al.*, 1997).

Sur le plan structural, les acétogénines comportent 35-37 atomes de carbone et sont dérivés des acides gras à 32-34 atomes de carbone (Figure 15). Ils sont caractérisés par :

- Une longue chaîne linéaire aliphatique portant en bout de chaîne un noyau  $\lambda$ -lactonique,  $\alpha$ - $\beta$  insaturé méthylé
- 1, 2 ou 3 noyaux tétrahydrofuraniques (THF) ou les noyaux tétrahydropyraniques (THP) localisés le long de la chaîne hydrocarbonée
- Un certain nombre de fonctions oxygénés (hydroxyles, époxydes, acétoxyles, cétones) et des doubles liaisons (Villo, 2008 ; Alali *et al.*, 1999).



Source : Naoto et Tetsuaki, 2009

**Figure 15: Structure générale des acétogénines des Annonaceae**

n= 1-3, R, R'= chaîne hydrocarbonée portant des fonctions oxygénés/double liaisons



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

## CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES

### II-1 Préparation des extraits de plantes

#### II-1-1 Justification de la sélection des plantes

*Polyalthia suaveolens*, *Monodora tenuifolia* et *Uvaria angolensis* ont été sélectionnées sur la base des travaux ethnobotaniques et ethnopharmacologiques menées au Cameroun. En effet, les enquêtes ethnobotaniques montrent leur utilisation traditionnelle dans le traitement de la fièvre, des douleurs musculaires, des céphalées et des maux de tête symptômes associés au paludisme (Tsabang *et al.*, 2012; Bele *et al.*, 2011; Focho *et al.*, 2010; Beti et Lejoly, 2009 ; Ndoye, 2001).

#### II-1-2 Matériel végétal

Les plantes sélectionnées ont été récoltées au Mont Kalla (Yaoundé) en Juin 2014. L'identification a été confirmée à l'Herbier National du Cameroun, Yaoundé où des spécimens ont été conservés sous les numéros de référence 1227 HNC, 50059 HNC, et 55313 HNC respectivement pour *P. suaveolens*, *U. angolensis* et *M. tenuifolia*.

#### II-1-3 Préparation des extraits aqueux, méthanoliques, éthanoliques et des fractions

Les feuilles, brindilles et les écorces ont été séchées à température ambiante séparément pendant cinq jours au Cameroun au Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales (Unité des Agents Antimicrobiens). Ensuite, chaque échantillon a été broyé à l'aide d'un mixeur commercial en fine poudre afin de faciliter l'extraction.

Les échantillons ont été extraits d'une part de façon séquentielle à l'eau et au méthanol et d'autre part à l'éthanol, puis par partition liquide- liquide au chlorure de méthylène/eau et au méthanol/ hexane.

##### II-1-3-1 Préparation des extraits bruts aqueux et au méthanol

Une extraction de chaque échantillon de plante a été effectuée séparément à l'eau et au méthanol pour l'obtention des extraits bruts aqueux et méthanoliques au laboratoire de Toxicologie du Département des Sciences de la Vie et Environnementales de l'Université de Cagliari (Italie).

#### ➤ Procédure

L'échantillon de chaque matériel végétal (100g) a été mélangé dans 2000 ml de l'eau distillée et du méthanol individuellement. L'ensemble a été ensuite introduit dans un appareil sonicateur de marque Ultracleaner pendant 30 min à 35°C. La sonication consiste à solubiliser les composés présents (Cares *et al.*, 2009 ; Metherel *et al.*, 2009). Après 24 h, le mélange a été filtré en utilisant le coton. Puis le filtrat a été centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min dans le but de séparer les débris solides du liquide. Enfin, le surnageant collecté a été soumis à une

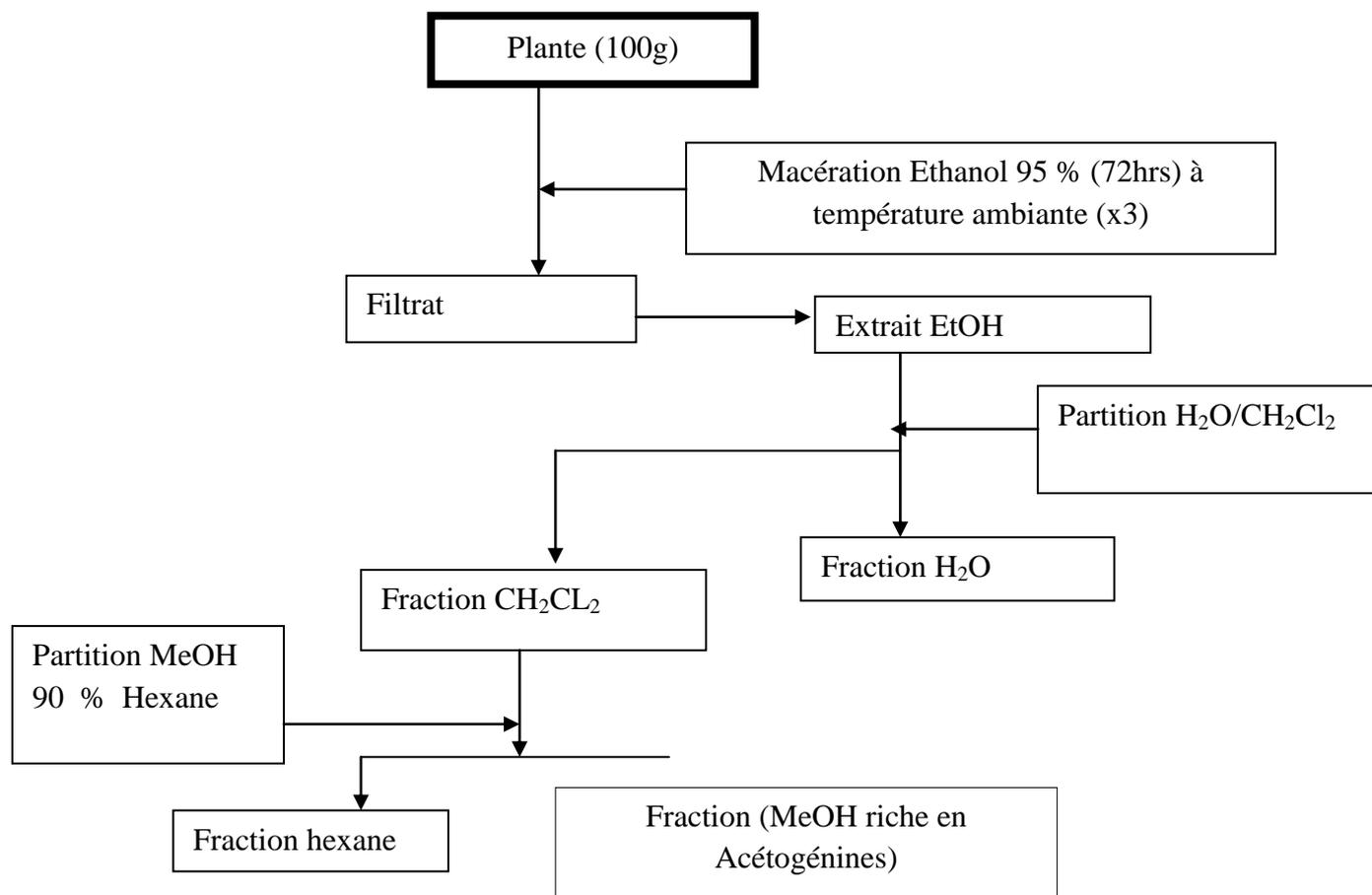
évaporation complète en utilisant un générateur d'azote. Les extraits bruts obtenus secs ont été conservés dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les expériences ultérieures.

### **II-1-3-2 Préparation des extraits bruts éthanoliques et partition liquide-liquide**

Cette méthode d'extraction consiste à préparer les extraits bruts éthanoliques et à partitionner ces derniers avec les systèmes chlorure de méthylène/eau et hexane/méthanol pour obtenir les différentes fractions successivement au Laboratoire de Phytobiochimie et Etude des plantes médicinales, Unité des Agents Antimicrobiens de l'Université de Yaoundé I au Cameroun.

#### ➤ **Procédure**

La procédure d'extraction a été réalisée d'après la méthode décrite par **Alali *et al.*, (1999)**. En effet, 100 g du matériel végétal (poudre) ont été pesés et macérés dans l'éthanol (1000ml) 95% pendant 72 h à  $25^{\circ}\text{C}$ . Le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre Wattman N° 1 et le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif de type BÜCHI 461 à  $80^{\circ}\text{C}$ . Cette étape a été répétée trois fois. Le résidu de la plante a été ré-suspendu dans l'éthanol récupéré. Les concentrats obtenus ont été séchés à température ambiante afin d'éliminer l'excédant du solvant. L'extrait éthanolique obtenu a été soumis à une partition  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v). Cette opération a abouti à l'obtention de deux phases: la phase aqueuse et la phase au chlorure de méthylène ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Ensuite la fraction  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a été concentrée à sec à  $40^{\circ}\text{C}$  et partitionnée entre le MeOH et l'Hexane (1/1 v/v). Une phase méthanolique et une phase hexane ont été obtenues. La fraction méthanolique a été également évaporée à sec à  $75^{\circ}\text{C}$  pour concentrer les acétogénines qui sont nos molécules d'intérêt. Ainsi, au terme de cette partition, les extraits bruts éthanoliques, les fractions méthanoliques,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et les interfaces durant les partitions  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  ont été utilisés pour les tests *in vitro*.



Source : Alali *et al.*, 1999

**Figure 15 : Procédure d'extraction des fractions enrichies en Acétogénines**

Les rendements des extraits et fractions exprimés en pourcentage (%) ont été calculés d'après la formule ci-dessous :

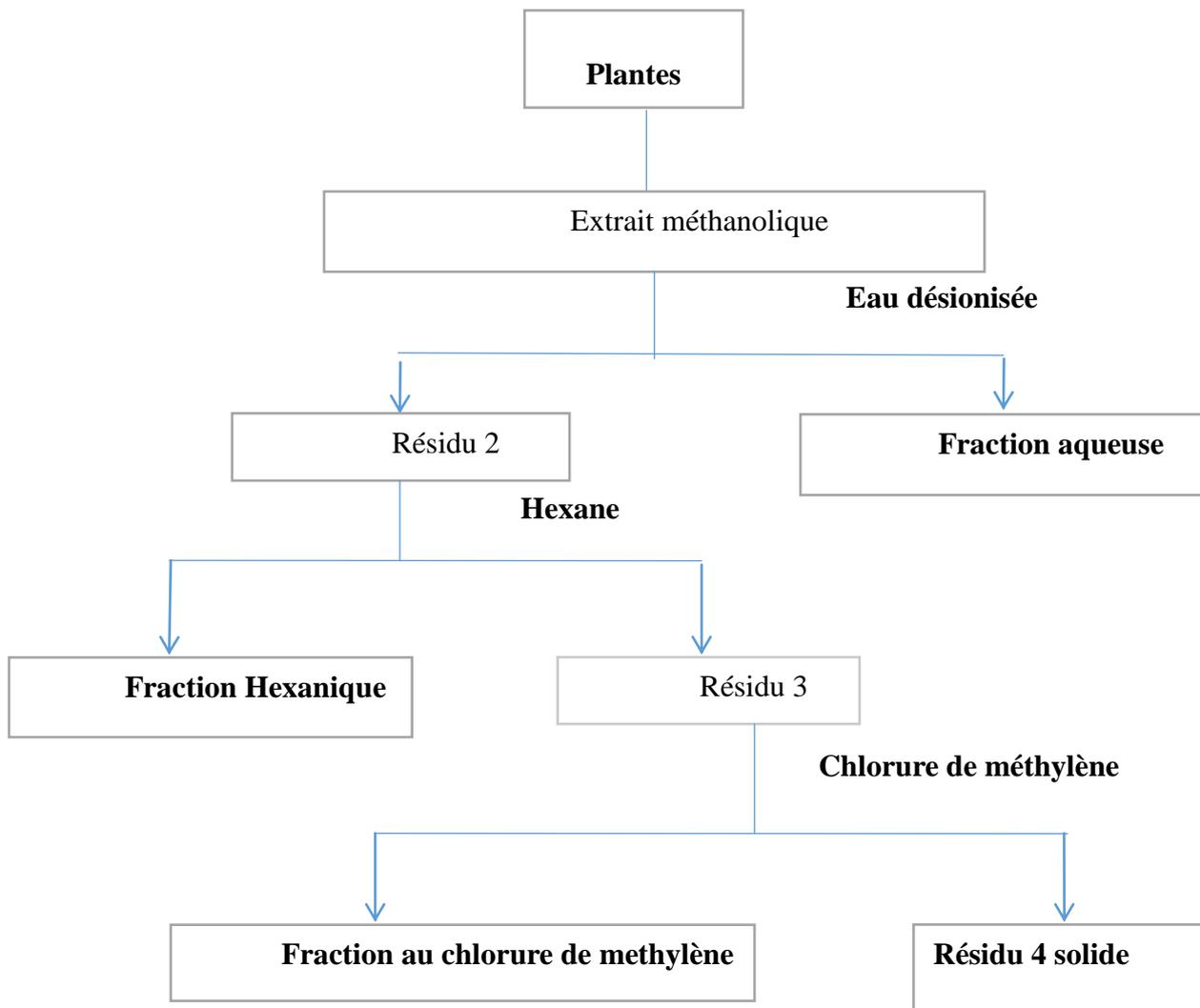
$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait(g)}}{\text{Masse du matériel végétal (g)}} \times 100$$

La fraction méthanolique riche en acétogénines et l'extrait méthanolique ayant respectivement présentés la meilleure activité sur la souche de *Plasmodium falciparum* et la transcriptase inverse du VIH1 respectivement ont été sélectionnées pour le fractionnement.

## II-2 Fractionnement des extraits les plus actifs et caractérisation des fractions

### II-2-1 Fractionnement par épuisement de l'extrait brut méthanolique des écorces de *Uvaria angolensis* le plus actif sur la transcriptase inverse du VIH1.

L'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* a été le plus actif et a été sélectionné pour un fractionnement bioguidé. En effet, les écorces de *U. angolensis* (250g) ont été extraites avec du méthanol (750 ml) à l'aide du sonicateur pendant 24h. Après filtration à l'aide d'un coton, le filtrat a été concentré avec un évaporateur rotatif à température ambiante (20°C) à 15000 rpm. A partir de l'extrait brut méthanolique obtenu, différents traitements de façon séquentielle à gradient de polarité à l'eau désionisée, l'hexane, et au chlorure de méthylène ont été réalisés (**Figure 16**). L'extrait méthanolique des écorces de couleur a été soumis à un traitement avec 300 ml d'eau désionisée, afin de solubiliser tous les composés hydrophiles et séparer les glycosides. Après homogénéisation à l'aide d'un agitateur magnétique, le mélange a été filtré en utilisant une pompe à vide. Ce processus a été répété 3 fois afin de maximiser l'extraction. La fraction aqueuse de couleur orange et le résidu 2 solide maronne gluant ont été obtenus. Par la suite, le résidu 2 a été suspendu dans l'hexane (3 x 100 ml) sous agitation dans le but d'extraire les composés lipophiles. Après, la mixture a été centrifugée à 1500 rpm. Le résidu 3 solide de couleur maronne claire a été collecté et une solution jaunâtre. Puis trois cuillerées de sulfate anhydre de sodium y ont été ajoutées à cette solution. Le mélange a été filtré puis concentré à température ambiante pour donner la fraction hexanique (huile jaunâtre). Enfin, le résidu 3 a été soumis à un traitement au chlorure de méthylène, solvant non-polaire qui a la capacité d'extraire une large gamme des composés organiques. Après centrifugation du mélange et filtration sous pompe à vide comme décrit précédemment. Un résidu 4 solide de couleur beige a été obtenu. La fraction au chlorure de méthylène a été obtenue après évaporation complète à température ambiante pour avoir un mélange huileux jaune noirâtre gluant. Ensuite une analyse qualitative chimique des fractions actives (fraction aqueuse, au chlorure et le résidu 4 solide) a été faite pour déterminer la composition chimique et identifier les groupes de composés présents.



**Figure 16 : Fractionnement par épuisement de l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* le plus actif sur la transcriptase inverse.**

## **II-2-2 Analyse par chromatographie liquide LC-QTOF Quadrupole TOF (LC/TOF/MS) des fractions actives obtenues de *U. angolensis* sur la transcriptase inverse du VIH1**

### **➤ Principe**

La chromatographie LC-QTOF MS est une technique utilisée pour séparer un mélange de composés afin d'identifier et de déterminer la masse de leurs composants individuels en fonction du temps. Cette méthode est basée sur la haute pression et température à travers une colonne (phase stationnaire) et d'une phase mobile constituée d'un système de solvants. Ensuite, un détecteur a été utilisé et les données sont représentées sous la forme d'un chromatogramme avec le spectre de masse (Ferrer et Thurman, 2012).

### **➤ Procédure**

L'analyse des fractions actives provenant de l'extrait brut méthanolique des écorces de *U. angolensis* potentiellement active sur la transcriptase inverse du VIH1 a été faite à l'aide

d'un appareil HPLC (Agilent série 1200) équipé d'une colonne de type Varian 5UEVO C18100A (150x 2,1 mm) N°5720-035 couplé à un détecteur 6520 QTOF. Cette fraction a été préparée dans du méthanol à 2500 µg/ml, puis 4 µl de cette solution a été injectée dans l'interface d'électrospray (ESI) fonctionnant en mode de détection ions positifs. La phase mobile était constituée d'un système solvant composée du mélange de l'acide formique aqueux (A) et du méthanol (B) à 0,1% (v/v). Ce système passe à travers une pompe en gradient (v/v) et a été généré à partir de 10% de B pendant 5 min, jusqu'à atteindre 100% de B pour un temps total d'expérience de 25 min. Les données des spectres de masse ont été acquises dans la gamme m/z 100-1500, avec une vitesse d'acquisition de 1,35 spectre s<sup>-1</sup>, avec une moyenne de 10 000 transitoires. Les paramètres de la source d'énergie sont les suivantes: température du gaz (250°C), la vitesse du flux 5l min<sup>-1</sup>, la pression du nébuliseur 45 psi et l'énergie de collision de fragmentation 150V. Les données ont été traitées et analysées à l'aide d'un appareil de type Agilent Mass Hunter Workstation Acquisition. Le logiciel Scripps Center Métabolomique a été utilisé pour l'identification des composés par comparaison avec les spectres de masses de la base des données NIST 98.

### **II-2-3 Criblage phytochimique et fractionnement de l'extrait méthanolique de brindilles de *P. suaveolens* le plus actif sur *Plasmodium falciparum* par chromatographie sur colonne**

#### **II-2-3-1 Criblage phytochimique de l'extrait méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* le plus actif par chromatographie colonne**

Le screening qualitatif phytochimique des fractions méthanoliques actives sur la souche K1 de *Plasmodium falciparum* a été réalisé dans le but de déterminer les autres groupes des métabolites secondaires bioactifs. La détermination des constituants chimiques : les alcaloïdes, les glucosides, les flavonoïdes, les saponines, les tannins, les terpènes, les composés phénoliques, des stérols et des groupes lactones ont été effectués d'après les protocoles standardisés décrites par **Oloyede, 2005 ; Odebeyi et Sofowora, 1978; Harbone, 1976 ; Trease et Evans, 1996** ci-dessous :

##### **II-2-3-1-1 Tests des alcaloïdes**

Dans un tube à essai, 50 mg de la fraction méthanolique de *P. suaveolens* sont dilués dans 10ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 %). Le mélange est homogénéisé et porté à ébullition pendant 2 minutes, puis filtré. A 1ml du filtrat, on ajoute 5 gouttes du réactif de Mayer. Le développement d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (**Odebeyi et Sofowora, 1978**).

#### **II-2-3-1-2 Test des flavonoïdes**

La fraction méthanolique a été préparée et 5ml d'ammoniaque diluée y sont ajoutés puis, de l'acide sulfurique concentré (1ml). Une coloration jaune qui disparaît avec le temps marque la présence des flavonoïdes (**Sofowora, 1993**).

#### **II-2-3-1-3 Mise en évidence des saponines**

Un mélange de quelques milligrammes de la fraction méthanolique et 5 ml d'eau distillée contenue dans un tube à essai est porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement, la solution homogénéisée est introduite dans un tube à essai et agitée vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. La présence d'une mousse persistante (1 minute) de plus d'un cm d'épaisseur après agitation indique la présence des saponines (**Oloyede, 2005 ; Harbone, 1976**).

#### **II-2-3-1-4 Test des tannins**

A une solution alcoolique (10ml) de la fraction, quelques gouttes de chlorure ferrique (0,1%) y sont ajoutées. La présence des tanins se manifeste par un changement de coloration de la solution : la coloration bleue foncée signifie la présence des tanins galliques alors que la coloration verte noirâtre traduit la présence des tanins catéchiques (**Trease et Evans, 1996 ; Oloyede, 2005**).

#### **II-2-3-1-5 Test des composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont été révélés en dissolvant 50 mg de la fraction de plante dans 15ml de méthanol, puis la solution est chauffée au bain marie bouillant pendant 15min. A ce mélange, 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée y sont ajoutées. La formation d'un précipité vert marque la présence des phénols (**Harbone, 1976**).

#### **II-2-3-1-6 Caractérisation des terpènes**

Le test de Sakowski a été utilisé pour détecter les terpénoïdes. Dans un tube à essai, 2ml de chloroforme sont ajoutés à 10 ml d'une solution de la fraction à 10%. Après agitation du mélange, 3ml d'acide sulfurique y sont ajoutés avec précaution pour former une couche. Il se forme une interface brun-rougeâtre qui traduit la présence des terpénoïdes (**Trease et Evans, 1996**).

#### **II-2-3-1-7 Test des glucosides**

Les glucosides ont été caractérisés en dissolvant une quantité de la fraction dans 5 ml of HCl et par suite ce mélange est neutralisé avec 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium hydroxide de sodium 5%; quelques gouttes de la solution de liqueur de Fehling y ont été ajoutées. La présence des glucosides est révélée par la présence d'un précipité rouge brique (**Odebeyi et Sofowara 1978**).

### II-2-3-1-8 Test de mise en évidence des stérols

Quelques milligrammes de la fraction de plante sont dissous dans 2ml de chloroforme. A cette solution, 4 gouttes d'anhydride acétique et d'acide sulfurique y ont été ajoutés successivement. La présence des stérols se manifeste par l'apparition de la couleur rouge violacée alors que la couleur bleue verdâtre indique celle des stérols (**Harbone, 1976**).

### II-2-3-1-9 Caractérisation des composés lactoniques

Les acétogénines sont caractérisés par leur groupement lactone. La mise en évidence de ce dernier dans la fraction méthanolique traduirait donc une forte probabilité de la présence des acétogénines. Les composés lactoniques ont été caractérisés avec le réactif de Kedde qui se matérialise par une coloration rose. C'est un test de caractérisation qualitatif et qui a été réalisée suivant le protocole décrit par **Aromde et al., (2005)**, avec quelques modifications.

#### Réactifs

- Acide 3,5- dinitrobenzoïque
- Le dihydroxyde de potassium
- Extraits méthanoliques de *P. suaveolens*

#### Préparation des solutions :

**1-** 2 g d'acide 3,5- dinitrobenzoïque ont été dissout dans 100 ml d'éthanol 95%.

**2-** 5,7 g d'hydroxyde de potassium ont été dissout dans 100 ml d'éthanol

Le mélange équivolumétrique des solutions 1 et 2 constitue le réactif de Kedde.

**3-** Solutions d'extraits: 0,3g des différentes fractions méthanoliques ont été dissouts dans 100 ml d'éthanol.

#### ➤ Procédure

Un volume de 800µl de chaque solution d'extrait a été introduit dans une cuve spectrophotométrique, puis 100µl de la solution d'acide dinitrobenzoïque et 100µl de la solution d'hydroxyde de potassium ont été ajoutés respectivement. Ensuite, 1000µl d'éthanol ont été ajoutés au mélange, suivi d'une homogénéisation. Le blanc n°1 était constitué d'eau distillée (2000µl) et le blanc n°2 de 800µl d'un mélange d'éthanol 95% + 100µl d'hydroxyde de potassium +100µl d'acide dinitrobenzoïque + 1000µl d'éthanol. Après avoir 3 à 5 min, l'absorbance du mélange a été lue à différentes longueurs d'ondes entre 300-700 nm. Les données collectées ont permis de tracer le spectre d'absorption des extraits dans la gamme.

La fraction active sur *Plasmodium falciparum* des brindilles riches en acétogénines a été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne.

### II-2-3-2 Fractionnement de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* le plus actif par chromatographie sur colonne

#### ➤ Procédure

La fraction méthanolique des brindilles de *Polyalthia suaveolens* ayant présenté une très bonne (la meilleure) activité antiplasmodiale sur la souche K1 de *P. falciparum* a été retenue pour le fractionnement sur la colonne chromatographique. En bref, 14,6g de la fraction a été dissoute dans du méthanol (100ml). Après évaporation complète à 70°C, la fraction séchée a été fixée sur la silice de granulométrie 70-230 µm de marque Merck et ensuite a été séparée sur une colonne de gel de silice 230-350 µm (Merck). L'élution a été réalisée en utilisant des systèmes solvants à des gradients de polarité (**Tableau II**): Hex 100%, Hex-AE(98 :2), Hex-AE (95 :5→93 :7), Hex-AE (93 :7), Hex-AE (93 :7→85 :15), Hex- AE (85 :15→78 :22), Hex-AE(78 :22→70 :30), Hex-AE(70-30→60 :40), Hex-AE (60 :40→ 50 :50),Hex-AE(50 :50→20 :80), Hex-AE (50 :50→20 :80) /AE-MeOH (98 :2) et AE-MeOH (95 :5)/MeOH 100% respectivement. Les chromatographies analytiques sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck, 20 x 20 cm ou 0,2 x 5 m) sur feuilles d'aluminium de 0,2 mm d'épaisseur, ou SIL G/UV<sub>254</sub> (POLYGRAM, 40 x 80 mm) sur feuilles de plastique de 0,2 mm d'épaisseur. Ces plaques ont été développées dans des cuves chromatographiques contenant les systèmes de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, Hex-AE et AE-MeOH à différentes polarités. Les plaques CCM ont été révélées, soit par utilisation de la lumière ultraviolette de la lampe UV de type spectroline , modèle VL-4-LC, de longueurs d'onde 254 et 366 nm, soit après pulvérisation à l'aide d'une solution d'acide sulfurique diluée à 50 %, suivi d'un chauffage à l'étuve à 150 °C, soit encore en les exposant aux vapeurs d'iode. Enfin 438 fractions de 125 ml ont été collectées et regroupés en 12 sous fractions : PS1-12 sur la base de leur profil de chromatographie sur couche mince (CCM).

**Tableau II: Chromatogramme de la fraction méthanolique des brindilles de *P.suaveolens***

<b>Eluants</b>	<b>Fractions</b>	<b>Série</b>	<b>Remarques</b>
Hex 100%	1-17	(PS1)	Mélange de 4 produits
Hex-AE (98 :2)	18-19	(PS2)	Trainée
Hex-AE (98 :2),	20-23	(PS3)	Apparition des cristaux à la fraction 20 et 23 fluorescent à l'UV, mélange de 4 produits
Hex-AE (95 :5→93 :7)	24-59	(PS4)	Trainée et apparition des cristaux 24, 25, 30, 32 et 33
Hex-AE (93 :7)	60-73	(PS5)	Cristaux 60-64,70 ; Trainée
Hex-A (93 :7→85 :15)	74-150	(PS6)	Mélange de 2 produits
Hex-AE (85 :15→78 :22)	151-199	(PS7)	Apparition des cristaux à 193, mélange de 3 produits
Hex-AE (78 :22→60 :40)	200-249	(PS8)	Présence des cristaux à 200 ,mélange de 2 produits
Hex-AE (60 :40→ 50 :50)	250-282	(PS9)	Mélange de 3 produits
Hex-AE (50 :50→20 :80)	283-332	(PS10)	Présence des cristaux à 298, 326
Hex-AE(50 :50→20 :80) /AE-MeOH (98 :2)	333-393	(PS11)	Mélange de 3 produits
AE-MeOH (95 :5)/MeOH 100%	394-438	(PS12)	Trainée

Hex : hexane ; AE : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; PS : *Polyalthia suaveolens*

Les différents extraits et les fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* ont été soumis aux tests d'activités inhibitrices de la transcriptase inverse du VIH 1 et sur *Plasmodium falciparum*.

### **II-3 Evaluation des activités inhibitrices des extraits et des fractions de la transcriptase inverse (TI) associée à la fonction ADN polymérase-ARN dépendant et l'ARNase H VIH**

L'enzyme Transcriptase Inverse (VIH-1 TI) recombinant a été exprimée et purifiée à partir du proto plasmide p(His) 6-tagged p66/p51 HIV-1HXB2 TI et a été offerte au Laboratoire de Virologie et de Biologie Moléculaire de Cagliari (Italie). La séquence de nucléotides de l'hybride ARN/ADN est la suivante:

5'-GAUCUGAGCCUGGGAGCU-FLUORESCÉINE-3'

5'-DABCYL-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3' (HPLC, dry, QC: MassCheck) disponible par Metabion). Au cours de l'expérience l'eau distillée utilisée (UltraPure™) (Life Technologies, Invitrogen™, catalog number: 10977-015) afin d'éviter l'interaction avec les acides nucléiques. La préparation du tampon de dilution enzymatique et la solution du mélange réactionnel constitué des éléments nécessaires pour le déroulement de la réaction des tests d'activités sur la transcriptase inverse voir **Annexe 2**.

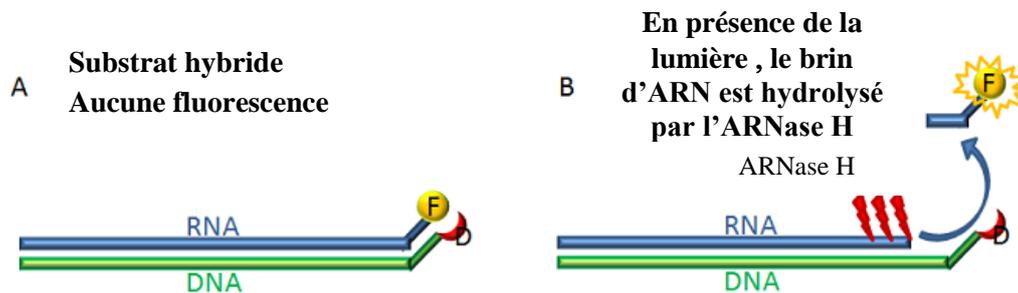
#### **II-3-1 Préparation des solutions tests des extraits et des fractions**

Le screening a été effectué avec 27 extraits bruts (H<sub>2</sub>O et MeOH) de *P. suaveolens*, *M.tenuifolia* et *U. angolensis*. Les solutions stock des extraits ont été préparées dans de l'eau purifiée milliQ à 1000 µg/ml dans les tubes falcon. Puis, des dilutions aqueuses de ces extraits ont été fraîchement préparées dans des tubes eppendorff au cours de l'expérience. En effet 5 µl de la solution à 1000 µg/ml ont été introduits dans un eppendorf et compléter avec de l'eau à 45 µl pour avoir un volume final de 50µl soit une concentration finale de 100 µg/ml. A partir de cette concentration de 100 µg/ml, des dilutions au 1/3 ont été réalisées. Ainsi pour chaque échantillon, 6 concentrations ont été testées variant de 100 ; 33,33; 11,11; 3,70; 1,23 et 0,41 µg/ml ont été testées. Concernant les fractions issues de l'extrait méthanolique des écorces *U. angolensis*, les solutions mères ont été préparées à 10000 µg/ml dans du DMSO, puis des dilutions ont été faites dans de l'eau purifiée milliQ. La concentration initiale était de 100 µg/ml, et des dilutions au ¼ ont été réalisées. Les concentrations testées variaient de 100; 25; 6,25;1,56;0,39 et 0,10 µg/ml pour chaque fraction. L'expérience a été conduite en duplicate pour chaque concentration et répétée trois fois.

## II-3-2 Test d'inhibition des extraits de la TI associée à la fonction de l'ARNase H

### ➤ Principe

Le principe de la dégradation de l'ARNase H est expliquée dans la figure 16 suivante.



**Figure 17 : Principe de la dégradation de l'ARNase.**

**Légende :** Le substrat d'ARN (bleue) marqué par la fluorescéine fluorophore (F jaune) est lié avec le brin complémentaire d'ADN (verte) marqué quant à lui avec la molécule Dabcylquencher (D, rouge). Au niveau du substrat, le quencher est si proche du fluorophore qu'il peut absorber la fluorescence émise après excitation (Panel A). Ensuite, le substrat d'ARN est hydrolysé par l'ARNase H, un petit oligo ribonucléotide marqué avec la fluorescéine va se détacher du quencher, et ainsi libéré la fluorescence après excitation de la lumière (Panel B). Par conséquent, plus la couleur est intense, plus l'activité est révélée et la fluorescence diminue en présence de l'inhibiteur.

L'activité de la TI-VIH 1 associée à l'ARNase H a été réalisée comme décrite par (Cuzzucoli *et al.*, 2015) dans un volume total de 100µl de la réaction.

En effet, dans une microplaque de 96 puits (OPTIPLATE-96 F/50B), l'eau dépourvue d'ADNase/ARNase (UltraPure TM) (20 µl pour le blanc et 10µl pour le contrôle négatif dans les puits de la ligne A1-A2 et A3-A5 respectivement) a été introduite. Ensuite 80 µl du mélange réactionnel dans tous les puits ont été ajoutés. Puis 10µl du contrôle positif et de chaque extrait testé en duplicate ont été ajoutés à des concentrations croissantes variant de 0,41 ; 1,23 ; 3,70 ; 11,11 ; 33,33 et 100 µg/ml de la ligne A6-H11. Enfin 10µl de la solution de inverse transcriptase préalablement préparée dans le tampon de dilution (Tris-Hcl) (Annexe 2) y sont ajoutés. RDS 1643 était la molécule de référence à des concentrations testées de 33,11 et 3,7 nM. Chaque concentration a été testée en duplicate et l'expérience a été répétée 3 fois. La plaque a été recouverte et été incubée pendant 1 h à 37°C sous une microplaque Multi Thermo-Shaker (TRM4) à 200 tours/min. Après incubation, la réaction a été stoppée par addition de l'EDTA et l'activité a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque multilabel Victor 3 (Perkin Elmer model 1420-051) équipés des filtres à une longueur d'onde 490/528 nm (excitation/émission). Les résultats ont été obtenus en soustrayant la valeur de la fluorescence pour chaque échantillon sur une feuille dans le logiciel Microsoft Excel. Les

pourcentages d'activité enzymatique ont été calculés à partir des moyennes des fluorescences en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ Activité} = \frac{\text{Moyenne fluorescence essai} - \text{Moyenne fluorescence blanc}}{\text{Moyenne fluorescence contrôle négatif} - \text{Moyenne fluorescence blanc}} \times 100$$

**Fluorescence** : Mesure de la capacité d'un composé à émettre de la lumière sous l'effet des radiations.

### II-3-3 Test d'inhibition *in vitro* des extraits sur la TI associée à la fonction de l'ADN polymérase ARN dépendent

L'activité inhibitrice des extraits sur la transcriptase inverse associée à l'ADN polymérase ARN dépendante a été évaluée à l'aide du Kit des essais de la transcriptase inverse (Invitrogen EnzCheck Inverse Transcriptase Kit) dans un volume total de 25,5 µl dans chaque puit de la microplaque (Meleddu *et al.* 2014). Dans les puits de la ligne A1-A2 et A3-A5, 5µl du tampon de dilution enzymatique Tris-HCl (voire **Annexe 2**) pour le blanc et 2,5 µl pour le contrôle négatif ont été introduit respectivement. Ensuite 20 µl du mélange réactionnel ont été ajoutés dans tous les puits. Puis 2,5 µl de chaque extrait/contrôle positif testé en duplicate ont été ajoutés à des concentrations croissantes variant de 0,41 ; 1,23 ; 3,70 ; 11,11 ; 33,33 et 100 µg/ml de la ligne A6-H11. Enfin 3µl de la solution de la transcriptase inverse préalablement préparée dans le tampon de dilution (Tris-HCl) dont la composition (**Annexe 2**) y a été ajoutée excepté les puits du blanc. Le contrôle positif était constitué Efavirenz connue comme un inhibiteur de référence non nucléotidique de la transcriptase inverse a été testé à des concentrations de 30; 10 et 3 nM. Chaque concentration a été testée en duplicate et le contrôle négatif en triplicate. Après incubation pendant 30 min à 37°C sous agitation, la réaction enzymatique a été stoppée par addition de l'EDTA. Enfin, les produits de la réaction ont été évalués par ajout de la solution de Picogreen (préparation dans **l'annexe 2**) et l'ensemble est introduit dans un lecteur de plaque multilabel Victor 3 (Perkin Elmer model 1420-051) équipé des filtres à des longueurs d'ondes 502/523 nm (excitation/émission). Les résultats ont été obtenus en soustrayant la valeur de la fluorescence pour chaque échantillon sur une feuille du logiciel Microsoft Excel.

Les pourcentages d'activité enzymatique ont été calculés à partir de la moyenne de la fluorescence obtenue d'après la formule suivante:

$$\% \text{ Activité} = \frac{\text{Moyenne fluorescence essai} - \text{Moyenne fluorescence blanc}}{\text{Moyenne fluorescence contrôle négatif} - \text{Moyenne fluorescence blanc}} \times 100$$

**Fluorescence** : Mesure de la capacité d'un composé à émettre de la lumière sous l'effet des radiations.

Le graphique d'inhibition a ensuite été généré en traçant le pourcentage d'activités par rapport à la concentration des extraits. Une analyse de régression linéaire des courbes d'inhibition a été effectuée en utilisant Microsoft Excel et une ligne de tendance convenant le mieux à la courbe a été sélectionnée. L'équation correspondante a été utilisée pour calculer la concentration requise pour inhiber de 50% l'activité enzymatique (valeur  $CI_{50}$ ). Les résultats sont exprimés en  $CI_{50} \pm$  écart type.

### **II-3-4 Evaluation de l'activité cytotoxique des fractions actives de *U. angolensis* sur la lignée cellulaire A549**

Une évaluation de la susceptibilité des cellules A549 (Sigma Aldrich 86012804-1VL) avec des fractions actives de l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* a été effectuée avec la méthode au réactif de PrestoBlue pour mettre en évidence la viabilité cellulaire.

#### ➤ **Principe**

Ce test utilise le pouvoir réducteur des cellules vivantes actives pour transformer le réactif résazurine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one 10-oxyde), un composé de couleur bleu perméable aux cellules et pratiquement non-fluorescent, en résorufine, un produit rouge fortement fluorescent. La conversion est proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives, et peut donc être mesurée quantitativement.

#### ➤ **Procédure**

La lignée cellulaire A549 est un groupe des cellules épithéliales alvéolaires issues d'un adénocarcinome humain, modèle cellulaire majeur utilisé dans les études de biosécurité. La culture a été faite dans les microplaques de 96 puits (Spectra Plate, PerkinElmer) à une densité initiale de  $10^5$  cellules/ml dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de FBS (serum de veau fœtal) inactivé et 1% Penicilline/Streptomycine (Lifetechnologies). Le mélange a été incubé à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de  $CO_2$  pendant 72 h.

Après la culture, les solutions stock des fractions aqueuse, hexanique, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide potentiels de *U. angolensis* ont été dissoutes dans du DMSO 5% (Sigma Aldrich) pour une concentration de 100 µg/ml. Des dilutions en séries de facteur 1/3 ont été faites dans le milieu de culture. Puis les cellules ont été incubées dans une microplaque avec des différentes concentrations de fractions et résidu variant de 100 µg/ml à 0,03 µg/ml pendant 72h à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de  $CO_2$ . Le volume total de la réaction était de 100µl constitué de 50µl de milieu et de 50µl des

échantillons tests. Le blanc contenait uniquement 100 µl de milieu. Le contrôle négatif était composé des volumes égaux (50µl) de cellules et de milieu et le contrôle positif était constitué de la Camptothécine. Après le colorant PrestoBlue™ y a été ajouté et la plaque a été incubée pendant 1h à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>, (Invitrogen). L'expérience a été répétée 3 fois et chaque échantillon est testé en duplicate. La fluorescence a été détectée à l'aide d'un appareil de type Victor3 (Perkin Elmer). Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été déterminés sur la base du nombre de cellules vivantes traitées avec le composé par rapport aux cellules témoins non traitées (défini comme 100% de viabilité).

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Absorbance moyenne du composé test} - \text{Absorbance du blanc}}{\text{Absorbance du contrôle négatif} - \text{Absorbance blanc}} \times 100$$

Le graphique de cytotoxicité a ensuite été généré en traçant le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à la concentration des extraits. Une analyse de regression linéaire a été effectuée en utilisant Microsoft Excel et une ligne tendance convenant le mieux a été sélectionnée. L'équation correspondante a été utilisée pour calculer la concentration requise pour réduire la croissance cellulaire de 50% (valeur CC<sub>50</sub>). Les indices de sélectivité (IS) ont été déterminés d'après la formule suivante :

$$\text{Indice de sélectivité} = \frac{\text{Concentration cytotoxique 50 (CC50)}}{\text{Concentration inhibitrice 50 (CI50)}} \times 100$$

Le degré de sélectivité a été adopté selon les critères de classification suivants définis par **Ondo et al. (2012)** :

- IS < 1 : classé comme non sélectif (toxique)
- 1 < IS < 10 classé comme faiblement sélectif (faiblement toxique)
- IS > 10 classé comme sélectif (non toxique)

A la suite de l'évaluation de l'activité des extraits et fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* sur le VIH1, ces extraits ont également été étudiés sur le paludisme. Au Cameroun, ces plantes sont utilisées traditionnellement pour traiter le paludisme. Le Cameroun est une zone endémique favorable au développement du paludisme. L'évaluation des extraits et fractions de ces plantes contribue à l'identification des substances naturelles à activité antipaludique dans notre pays.

## **II-4 Détermination de l'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits bruts, des fractions et subfractions**

L'évaluation de l'activité de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* sur *Plasmodium falciparum* a été réalisée.

### **II-4-1 Test de susceptibilité des érythrocytes sains aux extraits**

Avant les tests d'activité proprement dits, une étude préliminaire de toxicité a été réalisée pour déterminer les concentrations maximales d'extrait sans dommages significatifs sur des globules rouges. Cette étude a été faite suivant le test colorimétrique au 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]- bromure de 2,5- diphényltétrazolium /méthosulfate de phénazine (MTT/PMS) décrit par **Cedillo-Rivera *et al* (1992)**, avec quelques modifications.

Cette méthode est basée sur la réduction de MTT (jaune) en formazan (bleue) par les enzymes mitochondriales des cellules viables.

Pour ce faire, 50µl d'érythrocytes suspendus à 2% d'hématocrite dans le milieu de culture RPMI 1640 supplémenté de HEPES à 25 mM à pH 7 ont été introduits dans tous les puits d'une microplaque de culture de 96 puits. Un volume de 5 µl d'une solution d'extrait concentrée à 1mg/ml ont été introduits dans le puits de la ligne A d'une microplaque de 96 puits, puis dilués avec 95µl de RPMI 10%. Puis des dilutions en série ½ ont été effectuées. Après la plaque a été incubée dans un volume final de culture de 100 µl sous une atmosphère de 91% N<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub>, et 5% CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 48 heures. Chaque concentration d'extrait a été réalisée en triplicate avec les érythrocytes. Au terme de l'incubation, les cultures ont été transférées dans les tubes en polypropylène et centrifugées à 1500 trs/min pendant 5 min. 150 µl de solution de MTT et 250 µg de PMS ont été ajoutés au culot récupéré, puis le mélange a été incubé pendant 45 min à 37°C. Après incubation, l'ensemble a été de nouveau centrifugé comme décrit précédemment. Le culot récupéré a été ré-suspendu dans 0,75ml HCl à 0,04M dans l'isopropanol afin d'extraire et de dissoudre le colorant (formazan) des cellules. Après 5 min, le contenu des tubes a été vigoureusement mélangé, centrifugé et l'absorbance du surnageant déterminée à 570 nm. La densité optique obtenue étant proportionnelle à la quantité de formazan produite l'est avec la quantité d'érythrocytes viables. A partir des résultats obtenus les concentrations maximales d'extraits ayant peu de dommage sur les cellules ont été considérées comme point de départ des dilutions subséquentes pour les tests antipaludiques (**Cedillo-Rivera *et al.*, 1992**).

### **II-4-2 Culture du *Plasmodium falciparum***

La souche *K1* de *Plasmodium falciparum* résistante à la Chloroquine a été maintenue en culture continue d'après la méthode décrite par **Trager et Jensen (1976)** avec quelques

modifications. Les parasites sont maintenus *in vitro* dans des érythrocytes humains frais saints O<sup>+ve</sup> à un hémocrite de 4 % (v/v) dans du milieu RPMI 1640 (16,2g/L) complet constitué de 25 mM HEPES, 11,11 mM de glucose, 0,2% sodium bicarbonate (Sigma), 0.5% Albumax I (Gibco), 45 µg/L Hypoxanthine (Sigma) et 50 µg/L Gentamicine (Gibco). L'ensemble de la préparation a été incubée sous une atmosphère de 90% N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, et 5% d'O<sub>2</sub> à 37°C. La culture est réensemencée quotidiennement avec un milieu frais. La réalisation d'un frottis sanguin fixé au méthanol, coloré au Giemsa a été effectuée afin de déterminer la parasitémie et de vérifier le bon état de la culture. Par la suite, afin de maintenir les parasites au même stade, la synchronisation a été réalisée.

### **II-4-3 Synchronisation de stade parasitaire**

Dans le cadre de cette étude, les tests biologiques sont réalisés sur la souche *K1* de *P. falciparum* dans leur stade de développement en anneau tel que le protocole décrit par **(Lambros et Vanderberg, 1979)**. La synchronisation de la souche parasitaire repose sur la lyse simultanée de tous les globules rouges parasités par des schizontes. En effet, afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques, le parasite perméabilise la membrane érythrocytaire mais la rend aussi sensible aux chocs osmotiques. A un stade avancé du parasite, l'ajout de sorbitol dans le milieu lyse les érythrocytes parasités par les schizontes mûrs alors que les autres globules résistent à ce choc. Il ne reste alors que des globules rouges sains ou des globules parasités par des jeunes trophozoïtes (stade anneaux).

#### **➤ Mode opératoire**

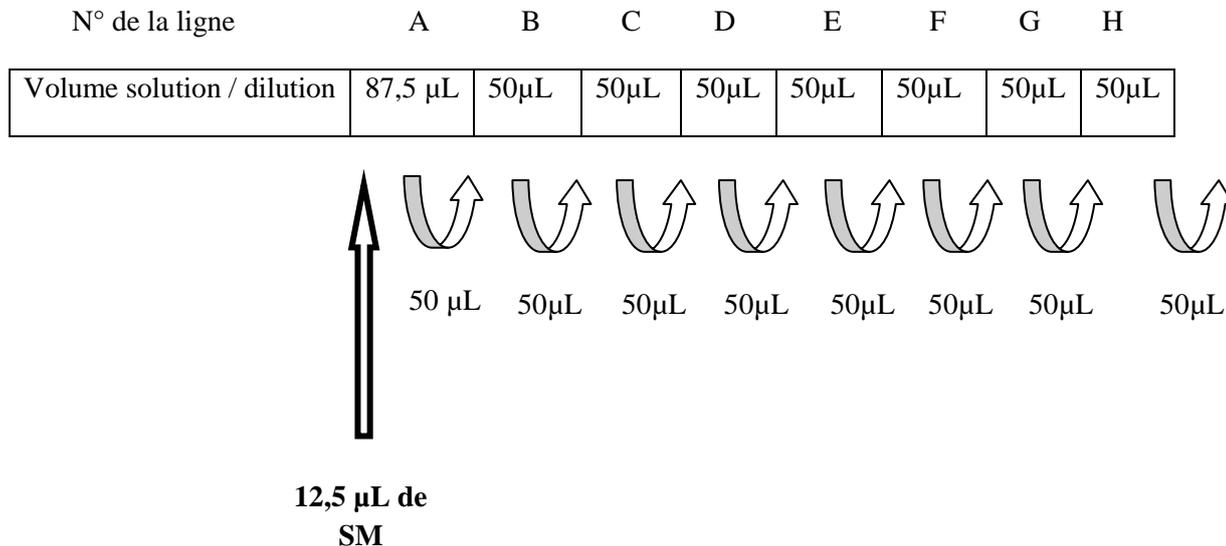
La culture est centrifugée à 1500 tours/min pendant 5 min, le surnageant est remplacé par neuf volumes de solution de D-sorbitol (5% dans de l'eau distillée). Une fois homogénéisée, la culture a été incubée à 37°C pendant 10 minutes puis centrifugée de nouveau suivant la même procédure à la même vitesse, ce qui permet d'isoler le culot de globules rouges parasités par des formes en anneau alors que le lysat cellulaire reste en suspension.

### **II-4-4 Tests d'inhibition de *P. falciparum* des extraits bruts, des fractions et sous fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis***

Au total 96 parasites synchronisés au stade en anneau à un hémocrite de 2% et à une parasitémie de 1% ont été incubés avec les extraits bruts et les fractions à différentes concentrations. Au terme de cette expérience, les CI<sub>50</sub> (représentent les concentrations qui inhibent la croissance de 50% de parasites) ont été déterminées.

➤ **Préparation des solutions d'extraits**

Les solutions mères ont été préparées à 25 mg/ml dans du DMSO 100%. Dans une microplaque de 96 puits, 12,5 µl de chaque solution mère d'extrait, y ont été introduits avec 87,5 µl de milieu de culture RPMI 1640. Puis des dilutions en série à partir de cette solution ont été effectuées avec un facteur de dilution de 1/2 suivant le schéma ci-contre.



**SM** : solution mère.

Au total 10 concentrations ont été obtenues variaient de 6,103 µg/ml à 3125 µg/ml.

➤ **Evaluation de l'activité antiplasmodiale: Détermination de la CI<sub>50</sub>**

Pour le test d'activité, la méthode fluorométrique au SYBR Green I telle que décrite par **Smilkstein et al. (2004)** a été effectué. Ce colorant interagit avec le *Plasmodium* pour produire un complexe fluorescent.

Un volume de 4 µL de chaque extrait des plantes a été transféré dans une autre microplaque de 96 puits, puis 96µl de parasites synchronisés au stade en anneau (parasitémie 1% et hématocrite 2%) y ont été ajoutés pour faire la dilution. Cette préparation a permis d'obtenir des concentrations variant de 0,24 µg/ml à 125 µg/ml. La plaque a été ensuite incubée pendant 48 h à 37°C sous une atmosphère de 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, et 90% N<sub>2</sub>. Chaque concentration a été testée en triplicate. L'Artémisinine (1µM) et 0,4% DMSO constituaient les contrôles positifs et négatifs respectivement.

A la fin de l'incubation, 100 µl de SYBR green I préparé dans le tampon [0,2 µl de 10 000 x SYBR green (Invitrogen) par ml de tampon de lyse {Tris (20 mM, pH 7,5), EDTA (5 mM), saponine (0,008% en v/v) et de Triton X-100 (0,08%, v /v)}] ont été ajoutés à chaque puits et le mélange a été homogénéisé délicatement. Après incubation à l'obscurité à 37°C pendant 1 h, la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur mutiple plaque (Perkin Elmer)

aux longueurs d'onde de 485 et 530 nm pour l'excitation et l'émission respectivement. La courbe dose-réponse de la fluorescence a été représentée en fonction des concentrations. Les activités inhibitrices des extraits et fractions ont été exprimées en  $CI_{50}$  (concentrations qui inhibent 50% la croissance des parasites et ont été déterminées à l'aide du logiciel Estimation-CI version 1,2 (<http://www.antimalarial-icestimator.net/MethodIntro.htm>) où la croissance parasitaire a été estimée. Le contrôle négatif (0,4% DMSO) est 100 %, et 0% pour le contrôle positive ART (**Le Nagard et al., 2011 ; Kaddouri et al., 2006**).

L'analyse des résultats a été faite à l'aide de l'échelle de classification des extraits et fractions établie par **Muñoz et al, (2000)** qui classe en fonction des valeurs de  $CI_{50}$ :

- Très bonne activité pour les  $CI_{50}$  inférieures à 5 µg/ml
- Activité modérée (bonne) pour les  $CI_{50}$  comprises entre 5 µg/ml et 10 µg/ml.
- Absence d'activité pour les  $CI_{50}$  supérieures à 10 µg/ml.

A l'issue des tests de l'activité antiplasmodiale, la fraction et les sous fractions qui ont présenté une bonne activité, ont été soumis au test de cytotoxicité dans le but de vérifier leur innocuité *in vitro* sur une lignée cellulaire.

#### **II-4-5 Test de cytotoxicité de la fraction la plus active méthanolique des brindilles et ses sous-fractions actives de *P. suaveolens* sur les cellules HFF**

##### **II-4-5-1 Activation des cellules HFF (Human Foreskin Fibroblast) en culture**

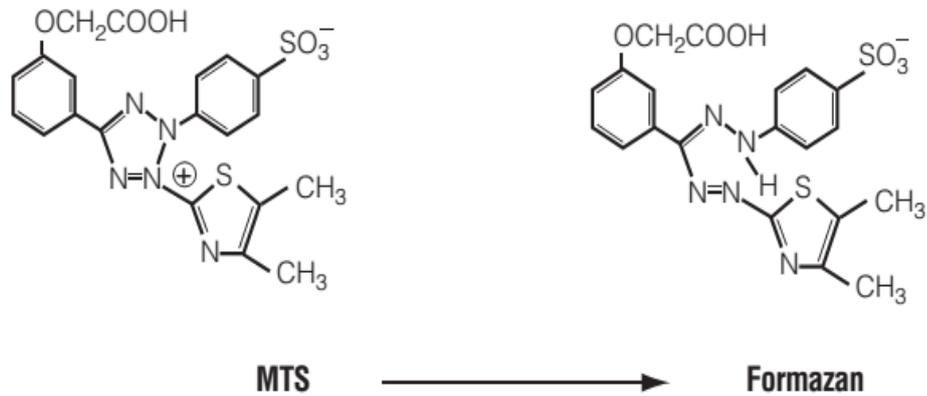
Les cellules HFF ATCC-HS68 sont maintenues en culture continue au sein de l'Unité des Agents Antimicrobiens du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Etude des Plantes Médicinales du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé 1.

Sous une hotte microbiologique maintenue dans les conditions aseptiques, les cellules HFF ont été mise en culture dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> en présence de 13,5 g/L du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du bicarbonate de sodium (0,2%) (Sigma) et gentamycine (50 µg/mL), supplémenté à 10% de sérum bovin foetal (FBS) inactivé. Le mélange a été incubé sous les conditions optimales à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Le milieu de culture était renouvelé tous les 3 jours. L'observation et la détermination de la charge parasitaire ont été faite par comptage microscopique sur cellule hématimètre de Neubauer et le bleu trypan utilisé pour distinguer les cellules vivantes des cellules mortes (**Boyom et al., 2014**).

##### **II-4-5-2 Test de cytotoxicité sur les cellules HFF en culture**

Le test de viabilité cellulaire a été réalisé avec la méthode colorimétrique au MTS/PMS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium/méthosulfate de phénazine. Elle est basée sur la réduction du MTS (teinte jaune)

en formazan (teinte violette) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives (**Figure 19**). La quantité du précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.



**Figure 18 : Principe du test au MTS**

Les cellules HFF ont été réensemencées dans des microplaques de 96 puits (Costar, USA) à la charge de  $5 \times 10^3$  cellules/100  $\mu\text{L}$ /puits et incubées pendant 24h à  $37^\circ\text{C}$  sous une atmosphère humidifiée 5%  $\text{CO}_2$ . Après incubation, le milieu a été retiré et remplacé par 80 $\mu\text{L}$  de milieu contenant les différentes solutions d'extraits (la fraction méthanolique d'intérêt des brindilles de *P. suaveolens* et leurs sous-fractions (PS1-PS12) préparées dans du DMSO 0,4%. Les concentrations variaient de 0,24 à 125  $\mu\text{g/ml}$ . Les contrôles négatifs étaient constitués uniquement des cellules sans inhibiteur. La plaque a été incubée à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 48 h sous une atmosphère humidifiée 5%  $\text{CO}_2$ . Puis, 20  $\mu\text{L}$  de MTS/PMS ont été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été une fois de plus incubées pendant 3h. La mesure de la densité optique dans chaque puits à 490 nm a été faite à l'aide d'un lecteur de microplaque (Biotek EL800, USA). Les pourcentages d'inhibition de la croissance cellulaire ont été calculés à partir des densités optiques par rapport au contrôle négatif d'après la formule ci-dessous :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{\text{DO contrôle positif} - \text{DO}_{\text{test}}}{\text{DO contrôle positif}} \times 100$$

DO= Densité optique

Les concentrations cytotoxiques 50 ( $\text{CC}_{50}$ ) ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPadPrism 5.0. Les tests ont été réalisés en triplicate. Les indices de sélectivité ont été déterminés suivant la formule:

$$\text{Indice de sélectivité} = \frac{\text{Concentration Cytotoxique 50 (CC 50)}}{\text{Concentration Inhibitrice 50 (CI 50)}} \times 100$$

Le degré de sélectivité a été adopté selon les critères de classification suivants définis par **Ondo et al. (2012)** :

- IS<1 : classé comme non sélectif (toxique)
- 1<IS<10 classé comme faiblement sélectif (toxicité intermédiaire)
- IS>10 classé comme sélectif (non toxique)

La fraction mère méthanolique des brindilles, vue son activité et la quantité a été retenue pour la suite des études *in vivo*.

## **II-5 Etude de l'activité antiplasmodiale *in vivo* de la fraction méthanolique de *P. suaveolens* chez la souris**

Les tests biologiques de l'activité antiplasmodiale *in vivo* de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* ont été effectués sur des souris femelles blanches Swiss appartenant à la lignée reproduite à l'animalerie du laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie de la Faculté de Médecine et Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I. Le choix du sexe des animaux a été basé sur la faible susceptibilité des mâles à l'infection plasmodiale, observée au cours des études préliminaires. Ces animaux étaient âgés de 6 à 7 semaines et ont été utilisés aussi bien pour les tests antipaludiques *In vivo* que pour l'étude de la toxicité aigüe de l'extrait.

L'infection plasmodiale a été réalisée en inoculant la souche *Plasmodium berghei* des rongeurs codifiée (MRA 406, ATCC Manassas Virginia) sensible à la Chloroquine. Cette souche a été gracieusement offerte par BEI Ressource réceptionnée dans un cryotube conservé dans de la carboglace.

Tous les extraits à tester ont été pesés et dissouts dans le mélange 70% Tween 80 et 30% éthanol. Cette solution a été diluée 10 fois en y ajoutant de l'eau distillée pour obtenir une solution stock contenant 7% Tween 80 et 3% éthanol.

Un test de toxicité aigüe a été effectué en prélude au test d'efficacité *In vivo* de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* ayant présenté la meilleure activité avec une CI<sub>50</sub><5 µg/ml sur la souche K1 de *Plasmodium falciparum*.

## **II-5-1 Etude de la toxicité aigüe de la fraction méthanolique riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens***

L'étude de la toxicité aigüe a été réalisée dans le but de déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) suivant le protocole expérimental de la ligne directrice 423 (OCDE, 2001).

### **Détermination de la dose létale (DL<sub>50</sub>)**

Après 3 à 4 h avant l'administration, 3 souris Swiss albinos (femelles) de poids moyen de 20-25 g ont reçu par voie orale la fraction d'intérêt à l'aide d'une sonde gastrique une dose unique de 5000 mg/kg de poids corporel. Le lot contrôle a reçu uniquement le véhicule. Après administration, les animaux expérimentaux ont été privés d'aliments pendant 2 h au cours de laquelle, ils ont été mis en observation pour détecter les signes immédiats de toxicité tels que la fatigue, sensibilité au bruit, au toucher, la perte des poils, la mobilité, l'aspect des fécès, les frissons, la prostration d'abord pendant les 30 premières minutes, puis 1 h après. Puis, les animaux ont été maintenus dans les conditions d'élevage avec alimentation et boisson à volonté. De manière quotidienne et pendant 14 jours, les animaux ont été observés, le poids corporel, les éventuels signes de toxicité ainsi que les décès ont été enregistrés.

Les volumes d'extraits à administrer ont été déterminés par la formule suivante :

$$\text{Volume à administré (ml)} = \frac{\text{Dose } \left( \frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) \times \text{Poids de l'animal (kg)}}{\text{Concentration de l'extrait } \left( \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right)}$$

A l'issue du test de toxicité aigüe qui a permis d'avoir une idée sur la dose létale 50 de la fraction sélectionnée méthanolique des brindilles de *P. suaveolens*, l'activité antipaludique *in vivo* sur les souris infectées a été réalisée.

## **II-5-2 Etude de l'activité antipaludique *in vivo* de la fraction méthanolique de brindilles de *P. suaveolens***

### **II-5-2-1 Amplification de la souche de *P. berghei* ANKA**

Après la sortie de la souche de *Plasmodium berghei* (MRA-406) de la carboglace, la parasitémie a été déterminée. Par la suite, elle a été maintenue en vie par injection par voie intra péritonéale chez des souris saines de 0,2ml d'une préparation de sang de souris contenant 10<sup>6</sup> globules rouges parasités par *P. berghei*. La parasitémie des animaux a été ensuite déterminée 4 jours après infection, par observation au microscope à l'objectif 100 avec l'huile d'immersion, des lames de frottis minces confectionnées à partir du sang caudal et colorées au Giemsa 10%. Ce passage a été répété par transfert successif du sang de souris infectée par *P. berghei* et ayant une parasitémie de l'ordre de 30-40%. Cette procédure de

transfert a été répétée 3 fois jusqu'à l'obtention d'une charge parasitaire environ 34 % permettant de conduire l'étude.

#### ➤ **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé à partir du sang d'un animal donneur ayant une parasitémie d'environ 34%. Pour le réaliser, la souris infectée a été anesthésiée avec du chloroforme et après ouverture de la cage thoracique, le cœur a été mis à découvert. Le sang a été collecté par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue stérile contenant de l'héparine (**Fidock et al., 2004**). Le sang collecté a été dilué avec de l'eau physiologique permettant d'obtenir 0,2ml de sang contenant  $10^6$  globules rouges parasités. Cette préparation a été inoculée par voie intrapéritonéale chez des souris saines d'expérimentation à raison de 0,2 ml par animal.

#### **II-5-2-2 Evaluation de l'activité *in vivo* en traitement suppressif pendant 4 jours de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens***

L'évaluation de l'efficacité *in vivo* de la fraction active méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* a été réalisée d'après le protocole de 4 jours (**Kamkumo et al., 2012 ; Fidock et al., 2004 ; Frederich et al., 2004**). En effet, c'est un test de screening qui consiste à traiter les souris quelques heures après l'infection. Il permet d'évaluer les effets des extraits sur la suppression des parasites immédiatement 4 jours après infection.

#### ❖ **Procédure:**

Au jour  $J_0$  le poids des animaux expérimentaux a été enregistré. Un total de 35 souris âgées de 6 à 7 semaines et pesant environ 25 g a été utilisé pour l'étude. Ces animaux ont été répartis en 7 lots de 5 spécimens chacun. 6 lots ont été infestés par administration par voie intrapéritonéale, de 0,2 ml d'inoculum contenant  $10^6$  érythrocytes parasités par *P. berghei*. 3 heures après infestation, les animaux ont été traités par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne avec différentes substances d'expérimentation. Le lot témoin positif a reçu de la Chloroquine (Sigma) à 24 mg/kg ; la chloroquine constituait la molécule de référence. Le lot témoin négatif a été traité avec le véhicule. Les lots tests ont été traités à l'extrait aux doses de 100, 200, 300 et 400 mg/kg de poids corporel. Un lot non infesté et non traité a constitué le lot des normaux pour l'étude. Du jour  $J_0$  à  $J_3$  post infection, le traitement a été répété et, de manière quotidienne, la parasitémie de chaque animal était déterminée. 24 heures après la fin de traitement la parasitémie a été déterminée par comptage du nombre de globules parasités dans 3 champs microscopiques de 100 globules rouges au total sur la lame. Une extrapolation du comptage sur 1000 érythrocytes examinés a été faite comme indiqué dans la formule suivante établie par **Zucker et Campbell, (1993)** :

$$\% \text{ des \u00e9rythrocytes parasit\u00e9s} = \frac{([\text{Nombre ER1} + \text{Nombre ER2} + \text{Nombre ER3}])}{10} \times 1000$$

**Nombre ER1**= Nombre d'\u00e9rythrocytes infect\u00e9s dans un champ de 100 globules rouges

**Nombre ER2**= Nombre d'\u00e9rythrocytes infect\u00e9s dans un champ 2 de 100 globules rouges

**Nombre ER3**= Nombre d'\u00e9rythrocytes infect\u00e9s dans un champ 3 de 100 globules rouges.

La d\u00e9termination du pourcentage d'inhibition de chaque dose d'extrait a \u00e9t\u00e9 obtenue en appliquant la formule ci-dessous suivante: (**Fidock et al., 2004**).

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

**A**= Moyenne de la parasit\u00e9mie du groupe t\u00e9moin n\u00e9gatif; **B**= Moyenne de la parasit\u00e9mie du groupe test.

➤ **Analyse statistique**

Les r\u00e9sultats de cette \u00e9tude ont \u00e9t\u00e9 exprim\u00e9s en moyenne  $\pm$  Erreur Standard sur la Moyenne (ESM). La significativit\u00e9 statistique a \u00e9t\u00e9 faite en utilisant le test ANOVA et la DS<sub>50</sub> (Dose permettant de supprimer 50% de parasites) a \u00e9t\u00e9 d\u00e9termin\u00e9e gr\u00e2ce au logiciel Graph Pad Prism 5.0.



**CHAPITRE III**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE III- RESULTATS ET DISCUSSION

### III-1 Rendement d'extraction des plantes sélectionnées

Le tableau III représente les rendements d'extraction des extraits bruts éthanolique, méthanolique, aqueux et des différentes fractions riches de *M. tenuifolia*, *U. angolensis* et *P. suaveolens*. Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage (%) a été calculé par rapport à la masse du matériel végétal de départ.

**Tableau III: Rendements d'extraction des extraits bruts et fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis***

	<i>P. suaveolens</i>			<i>M. tenuifolia</i>			<i>U. angolensis</i>		
	PSf	PSbr	PSec	MoTef	MoTebr	MoTec	Uvaf	Uvabr	Uvaec
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,000	0,001	1,92	0,11	0,05	0,03	0,06	0,06	0,047
<b>Méthanol</b>	1,63	0,41	1,85	0,09	0,02	0,05	0,05	0,03	0,05
<b>Ethanol</b>	4,28	1,80	6,3	3,98	1,79	4,03	3,27	3,83	4,94
<b>Fractions aqueuses</b>	0,90	0,34	0,46	2,11	1,24	1,94	0,76	0,06	0,05
<b>Interface</b>	0,07	0,02	0,06	0,33	0,82	0,12	0,74	0,18	0,23
<b>Fraction enrichie en acétogénines</b>	0,82	0,45	1,45	0,83	1,23	1,21	1,39	1,31	1,98

H<sub>2</sub>O: extraits bruts aqueux; Méthanol; extraits bruts méthanoliques; Ethanol; extraits bruts éthanoliques; Interface: Interface CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O; f: feuilles; br: brindilles; ec: écorces; PS: *Polyalthia suaveolens*; M. tenuifolia: *Monodora tenuifolia*; U. angolensis: *Uvaria angolensis*.

Au regard des résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, les rendements d'extraction varient en fonction de l'organe et du solvant d'extraction. L'extrait brut aqueux des feuilles de *P. suaveolens* a présenté le plus faible rendement avec 0,0002 % tandis que l'éthanol était le meilleur solvant d'extraction pour les écorces avec 6,3 %. Il est aussi à noter que les fractions aqueuses, les interfaces CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O et les fractions méthanoliques riches en acétogénines qui en découlent de ces extraits bruts éthanoliques présentent des rendements faibles variant de 0,02% à 2,11%. Ce résultat signifierait que le fractionnement aurait une influence sur la quantité en composés présents.

L'extrait éthanolique des écorces de *P. suaveolens* a présenté un rendement élevé de 6,3%. Ce résultat est sensiblement proche à celui obtenu par **Boyom et al (2011)** qui était de 7,3%. De même, les fractions méthanoliques riches en acétogénines des feuilles, brindilles et écorces de *P. suaveolens* présentent un rendement de 1,63% ;

0,41% et 1,85% respectivement qui ne corroborent pas à ceux obtenus par **Boyom et al., 2011** qui ont montré un rendement de 3,73%, 0,73% et 1,05 %. Cette différence serait attribuée aux facteurs tels que la nature du sol, le climat, le temps de récolte (**Braga et al., 2005**).

### **III-2 Activités inhibitrices de la transcriptase inverse VIH 1 des extraits et des fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis***

Les extraits bruts aqueux et méthanoliques de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* ont été soumis à un screening préliminaire d'activité contre l'action de la transcriptase inverse du VIH1.

#### **III-2-1 Evaluation de l'activité des extraits bruts aqueux et méthanoliques de *P. suaveolens*, *U. angolensis* et *M. tenuifolia* sur l'ADN polymérase ARN-dépendant (RDDP) de la TI**

Les extraits bruts aqueux et méthanoliques de *P. suaveolens*, *U. angolensis* et *M. tenuifolia* ont été évalués sur l'activité de l'ADN polymérase ARN-dépendant (RDDP) de la TI. Les résultats sont représentés dans le tableau IV suivant.

**Tableau IV : Inhibition de l'ADN polymérase ARN-dépendant (RDDP) de TI VIH1 par les extraits bruts de *P. suaveolens*, *U. angolensis* et *M. tenuifolia***

Plantes	Extraits bruts	RDDP RT CI <sub>50±ET</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>
<i>P. suaveolens</i>	PSf (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSbr (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSec (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSf (MeOH)	>100
	PSbr (MeOH)	>100
	PSec (MeOH)	>100
<i>U. angolensis</i>	UvAf(H <sub>2</sub> O)	30,00±2,0
	UvAbr(H <sub>2</sub> O)	28,10±5,5
	UvAec(H <sub>2</sub> O)	3,50±0,6
	UvAf(MeOH)	46,50±8,25
	UvAbr(MeOH)	1,00±0,14
	UvAec(MeOH)	0,62±0,15
<i>M. tenuifolia</i>	MoTef(H <sub>2</sub> O)	28,00±7,0
	MoTebr(H <sub>2</sub> O)	>100
	MoTec(H <sub>2</sub> O)	23,20±1,7
	MoTef(MeOH)	>100
	MoTebr(MeOH)	>100
	MoTec(MeOH)	53,00±18
	Efavirenz	9,0 ± 0,9 nM (2,84 µg/ml)

**a=** Concentration du composé capable d'inhiber 50% l'activité enzymatique de l'ADN polymérase ARN dépendant ; MoT:*M. tenuifolia* ; UvA : *U. angolensis* ; PS : *P. suaveolens* ; H<sub>2</sub>O : extraits bruts aqueux ; MeOH : extraits bruts méthanoliques ; f : feuilles ; br : brindilles ; ec : écorces ; RDDP: ADN Polymérase ARN dépendant

L'analyse du tableau IV montre que sur un total de 18 extraits testés, 9 extraits aqueux et méthanoliques de *M. tenuifolia* et *U. angolensis* sont actifs et inhibent l'activité enzymatique de l'ADN polymérase ARN- dépendant de la TI VIH1 avec des 0,62 <CI<sub>50</sub>< 53,00 µg/ml. Dans le même sens on note aussi que tous les extraits de *P. suaveolens* ne présentent pas d'activité avec des CI<sub>50</sub> > 100µg/ml. Les extraits aqueux des écorces et méthanoliques des brindilles et écorces de *U. angolensis* (UvAecH<sub>2</sub>O ; UvAbrMeOH ; UvAecMeOH) ont montré une bonne activité inhibitrice de l'ADN polymérase avec des valeurs de CI<sub>50</sub> variant de 0,62 à 3,5 µg/ml. Particulièrement l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* s'est révélé être le plus actif avec une CI<sub>50</sub>= 0,62 µg/ml.

Globalement, l'activité inhibitrice sur l'ADN polymérase de la TI des extraits méthanoliques des brindilles (CI<sub>50</sub> =1,00 µg/ml) et des écorces de *U. angolensis* (CI<sub>50</sub>

=0,62 µg/ml) reste supérieure à celle d’Efavirenz molécule de référence qui inhibe avec une CI<sub>50</sub> de 9,0 nM (2,84 µg/ml).

L’inhibition de l’activité enzymatique de l’ADN polymérase des extraits de *U. angolensis* suggèrerait que cette espèce serait plus riche en principes actifs comparée aux extraits de *M. tenuifolia*.

De plus, l’inhibition des extraits sur l’activité enzymatique de l’ARNase H par les extraits a été également démontrée. Les résultats sont consignés dans le tableau V ci-dessous.

**Tableau V: Activité inhibitrice des extraits de *P. suaveolens*, *U. angolensis* et *M. tenuifolia* sur l’activité de l’ARNase H de TI VIH1**

Plantes	Extraits bruts	ARNase H RT
		CI <sub>50</sub> ±ET (µg/ml) <sup>a</sup>
<i>P. suaveolens</i>	PSf (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSbr (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSec (H <sub>2</sub> O)	>100
	PSf (MeOH)	>100
	PSbr (MeOH)	>100
	PSec (MeOH)	>100
<i>U. angolensis</i>	UvAf(H <sub>2</sub> O)	>100
	UvAbr(H <sub>2</sub> O)	74,00±5,2
	UvAec(H <sub>2</sub> O)	2,00±1,2
	UvAf(MeOH)	53,00±22
	UvAbr(MeOH)	3,50±1,2
	UvAec(MeOH)	1,00±0,2
<i>M. tenuifolia</i>	MoTef(H <sub>2</sub> O)	>100
	MoTebr(H <sub>2</sub> O)	>100
	MoTec(H <sub>2</sub> O)	>100
	MoTef(MeOH)	>100
	MoTebr(MeOH)	46,50±8,25
	MoTec(MeOH)	24,90±0,9
	Efavirenz	ND
	RDS1643	8 ± 0,5 µM

**a** =Concentration de l’extrait qui inhibe 50% l’activité enzymatique de l’ARNase H ; MoT:*M. tenuifolia* ; UvA : *U. angolensis* ; H<sub>2</sub>O : extraits bruts aqueux ; MeOH : extraits bruts méthanoliques ; f : feuilles ;br : brindilles ; ec : écorces.

Des résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, il en ressort que 7 extraits bruts sur 18 au total possèdent une inhibition sur l’activité enzymatique de l’ARNase H TI avec des valeurs variant 1,00<CI<sub>50</sub><74,00 µg/ml. Parmi ces extraits actifs, on note que 5 étaient des extraits de *U. angolensis* et 2 extraits de *M. tenuifolia*.

Les extraits aqueux des écorces et méthanoliques des brindilles et des écorces de *U. angolensis* montrent également une meilleure activité sur l'ARNase H avec des  $1,0 < CI_{50} < 3,5$  µg/ml. Ce résultat nous permet de constater que ces extraits de *U. angolensis* présentent une double inhibition enzymatique de TI du virus VIH1. L'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* est le plus actif sur l'ARNase H avec une  $CI_{50} = 1,0$  µg/ml.

Cette inhibition observée pour cet extrait de *Uvaria* serait un avantage pour le développement des molécules inhibitrices de la TI du VIH1. En effet, l'activité complète de la TI implique à la fois les fonctions catalytiques associées à l'ADN polymérase et l'ARNase H essentielles pour la synthèse de l'ADN proviral (**Meleddu et al. 2015**). De même, cette double inhibition limitera certaines résistances développées par la fonction ARNase H. Il existe très peu d'inhibiteurs sur cette fonction. Les inhibiteurs de l'ARNase H agissent en chélatant l'ion divalent  $Mg^{2+}$  situé dans le site actif (**Esposito et al., 2014 ; Corona et al., 2013**).

Bien que les extraits de *Uvaria* n'aient pas encore fait l'objet des études contre la transcriptase inverse du VIH, certaines plantes de la famille des Annonacées ont démontré une inhibition sur la transcriptase inverse. En effet, **Wang et al., (2015)** ont prouvé que les extraits de racines de *Artabotrys pilosus* et *Dasymaschalon rostratum* (Annonaceae) avaient un effet sur la transcription du VIH 1 en empêchant la progression des lymphocytes T  $CD4^+$  à 10 µg/ml. Cette activité serait due aux flavonoïdes impliqués dans l'inhibition de la transcriptase inverse. En effet, ces métabolites ont été déjà caractérisés en général dans le genre *Uvaria* (**Rosandy et al., 2013**) et ont montré des activités inhibitrices de la réplication du VIH et anti-inflammatoires, mécanisme impliqué dans la défense de l'hôte (**Liu et al., 2007 ; 2002**). Par ailleurs des études antérieures, les extraits méthanoliques de certaines plantes constitués en majorité des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré une inhibition de l'activité de la transcriptase inverse du VIH1 (**Mbaveng et al., 2011**).

Vue l'activité inhibitrice prometteuse sur la TI, l'extrait brut méthanolique des écorces de *U. angolensis* a été sélectionné pour un fractionnement par épuisement à gradient de polarité. Les fractions découlant de cet extrait ont été soumises aux tests d'activités sur les 2 fonctions enzymatiques de la TI comme décrit précédemment.

### III-2-2 Activité inhibitrice des fractions issues du fractionnement de l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* sur la TI du VIH 1

L'extrait brut méthanolique des écorces de *U. angolensis* ayant présenté la meilleure activité sur l'ADN polymérase et l'ARNase H de la TI avec une  $CI_{50}$  de 0,62  $\mu\text{g/ml}$  et 1,00  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement, il a été soumis à un fractionnement. Ainsi, 4 fractions : les fractions aqueuses, hexaniques, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide qui en résultent ont été testées pour leur potentiel anti-transcriptase inverse du VIH1. Les concentrations qui inhibent de 50% l'activité enzymatique de l'ADN polymérase et l'ARNase H ont été déterminées et sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau VI: Activité inhibitrice de la TI des fractions issues de l'extrait méthanoliques des écorces de *U. angolensis***

Traitements	Fractions	ARNase H VIH1 $CI_{50\pm ET}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	RDDPVIH1 $CI_{50 \pm ET}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>
<b>Extraits méthanolique de l'écorce de <i>U. angolensis</i></b>	UvAecFH <sub>2</sub> O	0,97 ± 0,08	8,69 ± 0,05
	UvAecFH <sub>ex</sub>	8,38 ± 3,43	17,17 ± 0,10
	UvAecFCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,29 ± 0,06	0,80 ± 0,14
	Résidu 4 solide	0,10 ± 0,03	0,23 ± 0,04
<b>RDS1643</b>	/	2,70 ± 0,20	>100
<b>EFV</b>	/	ND	0,003 ± 0,0003

<sup>a</sup> concentration capable d'inhiber 50% l'activité enzymatique de l'ARNase H; <sup>b</sup> concentration capable d'inhiber 50% l'activité enzymatique de l'activité de l'ADN Polymérase ARN dépendant (RDDP) de la RT du VIH1; EFV : Efavirenz; UvA : *U. angolensis*; FH<sub>2</sub>O : fraction aqueuse; FH<sub>ex</sub> : fraction hexanique; FCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : fraction au chlorure de méthylène; ec : écorces

Des résultats du tableau VI ci-dessus, toutes les fractions présentent des  $CI_{50}$  variant de 0,10 à 8,69  $\mu\text{g/ml}$ . La fraction au chlorure de méthylène possède une bonne inhibition de l'ADN polymérase et de l'ARNaseH avec des  $CI_{50}$  de 0,29 et 0,80  $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Quant au résidu 4 solide, il est le plus actif sur les deux enzymes, et particulièrement très intéressante sur l'ARNase H avec une  $CI_{50}$  de 0,10  $\mu\text{g/ml}$  valeur inférieure comparée à la molécule de référence RDS1643 qui présente une  $CI_{50}$  de 2,70  $\mu\text{g/ml}$ . Par contre la fraction aqueuse n'est fortement active que sur l'ARNase H avec une  $CI_{50}$  de 0,97  $\mu\text{g/ml}$ .

La fraction à l'hexane a montré une inhibition modérée avec des  $CI_{50}$  variant de 8,38 à 17,17  $\mu\text{g/ml}$  sur les deux fonctions enzymatiques. De manière générale, on

remarque que le fractionnement a un impact positif car favorise une augmentation de l'activité comparé à l'extrait brut mère.

Dans but de déterminer la composition en métabolites actifs des fractions aqueuses, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide actives sur la TI du VIH1, ceux-ci ont été analysés par chromatographie couplée aux spectres de masse (LC QTOF-SM).

### III-2-3 Analyse chromatographique LC-QTOF des fractions aqueuses, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide actives sur la TI du VIH1

Les résultats de l'analyse chimique qualitative des fractions aqueuses, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide par chromatographie liquide LCQTO/MS sont présentées dans le tableau VII ci-dessous.

**Tableau VII : Analyse chromatographique des fractions actives de UvAec MeOH par HPLC/ESI-MS**

Fractions	Glycosides	Chalcones	Phenyl Chromanones
UvAecFH <sub>2</sub> O	+	+	-
UvAecFCH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	+	+
Résidu 4 solide	-	+	-

+ Absence ; - présent ; ec : écorces ; MEOH : extrait brut méthanolique ; UvA : *U. angolensis* ; FH<sub>2</sub>O : fraction aqueuse ; FCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : fraction au chlorure de méthylène ; ec : écorces

Il ressort de ce tableau que les fractions actives de l'extrait méthanolique de *U. angolensis* (**Tableau VII**) contiennent tous des chalcones. Les glycosides sont présents uniquement dans la fraction aqueuse et les phenyl chromanones dans la fraction au chlorure de méthylène. Ce résultat corrobore celui obtenu par **Muhammad et Waterman, 1985** qui ont montré la présence des chalcones dans les extraits d'*U. angolensis*.

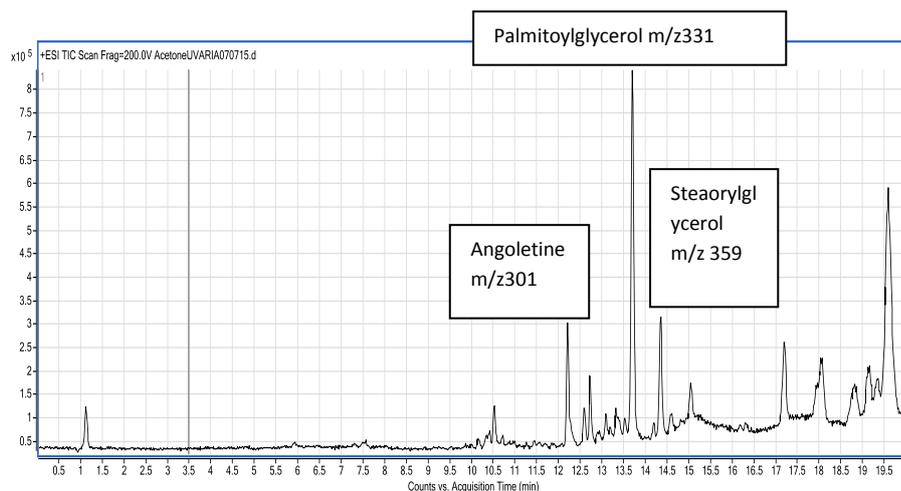
L'activité observée sur les deux fonctions enzymatiques de la transcriptase inverse serait liée à la présence des chalcones dans toutes les fractions actives. En effet les chalcones appartiennent à la sous-classe des flavanoïdes et seraient de puissants inhibiteurs de l'activité de l'ADN polymérase TI du VIH (**Vlietinck et al., 1997**). Ils sont constitués sur le plan structural de deux noyaux aromatiques reliés par une fonction carbonyle  $\alpha$ - $\beta$  insaturé, fonction réactive responsable des activités pharmacologiques variées : anti-inflammatoire, cytotoxique, anti-oxydant et anti-VIH

(**Avupati et Yejella, 2014 ; Dhar, 1981** ). Des études antérieures ont montré que ces composés possédaient une affinité pour la transcriptase inverse. **Harada et al., (1999)** ont prouvé que les chalcones inhibaient la caséine kinase II, protéine cellulaire impliquée dans la transcription du VIH. De même, Xanthohumol, un prenylchalcone isolé de la plante *Humulus lupulus* a démontré l'inhibition de la transcriptase inverse du VIH 1 avec une CE<sub>50</sub> de 0,50 µg/ml (**Wang et al., 2004**).

De même, certains composés du groupe des chalcones tels que 1-(2-Benzyloxy-6-hydroxy-phenyl)-3-(5-bromo-2-ethoxyphenyl)-propenone et 1-(2-Benzyloxy-6-hydroxy-phenyl)-3-(5-chloro-2-ethoxyphenyl)-propeno ont démontré une forte inhibition de la propagation des virions VIH 1 (**Cole et al., 2016**).

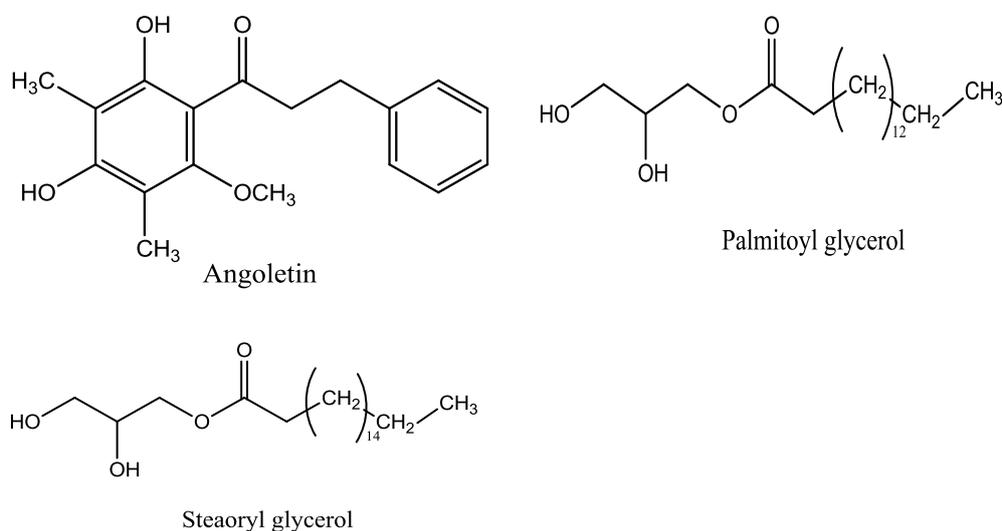
Ces composés et leurs dérivés sont aussi connus pour leur pouvoir antioxydant grâce à leur groupe phénolique (**Aly et al., 2014 ; Detsi et al., 2009**). Car les protéines du VIH (Gp120 ; Tat et transcriptase inverse) favorisent la production des espèces réactives oxygénées lesquelles sont impliquées dans la pathogénicité de la maladie à travers un épuisement du pool des lymphocytes CD4. Cependant le mécanisme par lequel les chalcones inhibent les radicaux libres n'est pas encore connu (**Ivanov et al., 2016**).

Le résidu 4 solide le plus actif sur la TI du VIH1 a été sélectionné pour l'identification des composés à l'aide du logiciel Script Center Metabolomic par comparaison avec des spectres de masse de la base des données NIST98. Le profil chromatographique suivant a été obtenu.



**Figure 19 : Profil chromatographique du résidu solide de *U. angolensis***

Il en découle de ce chromatogramme en fonction du temps de rétention, qu'il y'a 10 pics, dont 3 composés ont été identifiés du résidu solide de *U. angolensis*. Les pics à 12,2 min avec une  $m/z$  301, et 13,6 min pic de l'ion moléculaire de  $m/z$  331 et à 14,2 min de  $m/z$  359 correspondent à l'angoletine, le palmitoyl glycérol et stearoyl glycérol respectivement.



**Figure 20 : Structure des composés identifiés du résidu 4 solide par analyse chromatographique LC-TOF/MS**

Le palmitoyl glycérol et le stearoyl glycérol sont les composés qui ont été identifiés en Bulgarie chez les espèces de *Fumaria* après analyse en utilisant la

chromatographie en phase gazeuse couplée à la SM GC-MS (Vrancheva *et al.*, 2014). A notre connaissance, ces molécules n'ont pas encore été isolées des espèces d'*Uvaria*. L'angolétine est un chalcone encore connue comme 2',4'- dihydroxy-6'methoxy-3',5'- diméthyl-dihydrochalcones. Ce composé a été isolé pour la première fois dans les années 80 des racines de *U. angolensis* (Hufford et Oguntimein, 1982): Dans le même sens, l'angoletine a démontré dans les travaux antérieurs un effet antimicrobien sur *Mycobacterium smegmatis* responsable de l'une des infections opportunistes fréquentes chez des patients VIH+ avec une CMI de 3,12 µg/ml (Hufford et Oguntimein, 1982). Cependant, l'activité anti VIH-1 TI ARNase H et RDDP de l'angolétine, n'a pas encore été investiguée. La présence des glycérolipides justifierait aussi l'activité prouvée dans le résidu 4 solide. En effet, les glycérolipides constituent une classe des composés qui auraient un pouvoir inhibiteur de l'ADN polymérase fonction associée à la transcriptase inverse du VIH1 (Reshef *et al.*, 1997). De même Vo *et al.*(2011) ont montré que les glycérolipides étaient efficaces sur le virus de Herpes humain (HSV) qui est aussi l'une des infections virales présent chez des patients immunodéprimés.

Les fractions actives ont été évaluées pour leur cytotoxicité sur les cellules épithéliales A549.

### III-2-4 Cytotoxicité des fractions obtenues de l'extrait potentiel des écorces de *U. angolensis* sur les cellules A549

La cytotoxicité de toutes les fractions a été évaluée sur la lignée cellulaire A549 et les resultats sont presente dans le tableau VIII.

**Tableau VIII : Inhibition de la croissance cellulaire de la lignée A549 par les fractions de l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis***

Fractions de l'extrait méthanoliques des écorces de <i>U.</i>	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> ± ET (µg/ml) A549	IS= CC <sub>50</sub> /CI <sub>50</sub> ARNase H TI	IS=CC <sub>50</sub> /CI <sub>50</sub> RDDP
UvAecFH <sub>2</sub> O	> 100	> 103,09	> 11,51
UvAecFH <sub>ex</sub>	> 100	> 11,93	> 8,95
Résidu 4 solide	8,40 ± 0,5	84	36,52
UvAFecCH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	18,80 ± 8,8	64,83	81,74
Camptothécine	0,5	ND	ND

a=Concentration capable de réduire 50% la croissance cellulaire ; FH<sub>2</sub>O: fraction aqueuse; FH<sub>ex</sub>: fraction hexanique; FCH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> : fraction au chlorure ; UvAec : écorces *U. angolensis* :

Au regard des résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, il ressort que les fractions aqueuse, hexanique, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide ont montré une innocuité avec des valeurs de IS > 10 d'après les critères de **Ondo et al. (2012)**

En somme, l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* a montré une très bonne activité sur l'ADN polymérase et l'ARNase H à l'issue du screening préliminaire. Le résidu solide 4 et la fraction au chlorure de méthylène se sont révélés les plus actifs et ont été montrés une innocuité sur les cellules A549. Les chalcones ont été mises en évidence dans toutes les fractions actives.

A la suite de l'activité inhibitrice de la transcriptase inverse du VIH 1 des extraits et des fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis*, ceux-ci ont été également étudiés sur *Plasmodium*.

### **III-3 Activité antiplasmodiale *in vitro* contre la souche chloriquinorésistante de *Plasmodium falciparum* K1**

#### **III-3-1 Susceptibilité des érythrocytes aux extraits et fractions**

Les différents extraits bruts et fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia*, *U. angolensis* ont été testés pour leur effet toxique sur les érythrocytes en prélude des tests d'activités antiplasmodiales *in vitro*. Les résultats ont montré une non-cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes à une concentration de 1 mg/ml.

#### **III-3-2 Activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits et des fractions**

Les extraits bruts aqueux, éthanoliques, méthanoliques et les fractions aqueuses et les fractions méthanoliques (riches en acétogénines) de chaque plante ont été testés *in vitro* contre la souche K1 de *P. falciparum* et les résultats sont consignés dans le tableau IX ci-dessous.

**Tableau IX: Activité antiplasmodiale *in vitro* (CI<sub>50</sub>) des extraits bruts de *P. suaveolens*, *U. angolensis*, et *M. tenuifolia*.**

Plantes	Extraits bruts	CI <sub>50</sub> ± SD (µg/ml)
<i>P. suaveolens</i>	PSf (H <sub>2</sub> O)	>10
	PSbr (H <sub>2</sub> O)	>10
	PSec (H <sub>2</sub> O)	>10
	PSf (MeOH)	>10
	PSbr (MeOH)	>10
	PSec (MeOH)	>10
	PSf(EtOH)	4,53± 0,82
	PSbr(EtOH)	5,75 ±1,83
	PSec(EtOH)	>10
<i>U. angolensis</i>	UvAf(H <sub>2</sub> O)	>10
	UvAbr(H <sub>2</sub> O)	>10
	UvAec(H <sub>2</sub> O)	>10
	UvAf(MeOH)	>10
	UvAbr(MeOH)	>10
	UvAec(MeOH)	>10
	UvAf(EtOH)	9,98± 2,87
	UvAbr(EtOH)	10,00± 0,87
	UvAec(EtOH)	>10
<i>M. tenuifolia</i>	MoTef(H <sub>2</sub> O)	>10
	MoTebr(H <sub>2</sub> O)	>10
	MoTec(H <sub>2</sub> O)	>10
	MoTef(MeOH)	6,71± 1,52
	MoTebr(MeOH)	>10
	MoTec(MeOH)	>10
	MoTef(EtOH)	5,48±0,19
	MoTebr(EtOH)	8,93±0,19
	MoTec(EtOH)	>10
	Art	1,93 ± 0,04

CI<sub>50</sub>: concentration inhibitrice à 50% de croissance des parasites; Art: Artémisinine ; SD : Erreur standard ; f : feuilles ; br : brindilles ; ec : écorces ; H<sub>2</sub>O : extrait brut aqueux ; EtOH : extrait brut éthanolique ; MeOH : extrait brut méthanolique. MoTe : *Monodora tenuifolia* ; UvA : *Uvaria angolensis* ; PS : *Polyalthia suaveolens*

Au vue des résultats du screening du test antiplasmodial obtenus dans le tableau IX ci-dessus, il ressort que sur les 27 extraits bruts testés, 7 ont montré une activité inhibitrice contre la souche K1 de *P. falciparum* parmi lesquels 6 extraits éthanoliques qui sont PSf(EtOH), PSbr(EtOH), MoTef(EtOH), MoTebr (EtOH), UvAf(EtOH) et

UvAbr(EtOH) avec des concentrations inhibitrices variant de 4,53 à 10 µg/ml. L'extrait brut méthanolique des feuilles de *M. tenuifolia* a présenté une activité antiplasmodiale modérée avec une CI<sub>50</sub> de 6,71µg/ml. L'extrait brut des feuilles éthanoliques de *P. suaveolens* s'est révélé être le plus actif avec une CI<sub>50</sub> de 4,53 µg/ml.

Les différents extraits de plantes ont été fractionnés et toutes les fractions découlant de la partition liquide-liquide des extraits bruts éthanoliques ont été testés. Le tableau ci-dessous montre l'activité antiplasmodiale *in vitro* des fractions.

**Tableau X : Activité antiplasmodiale *in vitro* (CI<sub>50</sub>) des fractions de *P.suaveolens*, *U. angolensis*, et *M. tenuifolia***

Plantes	Fractions	CI <sub>50</sub> ± SD (µg/ml)
<i>P. suaveolens</i>	FPSfH <sub>2</sub> O	>10
	FPSbrH <sub>2</sub> O	>10
	FPSecH <sub>2</sub> O	>10
	PSf(I)	>10
	PSbr(I)	>10
	PSec(I)	3,84±0,86
	FPSf(MeOH)	>10
	FPSbr(MeOH)	3,24± 0,004
	FPSec(MeOH)	4,90 ± 4,73
<i>U. angolensis</i>	FUvAf (H <sub>2</sub> O)	9,78 ± 1,87
	FUvAbr(H <sub>2</sub> O)	>10
	FUvAec(H <sub>2</sub> O)	>10
	UvAf(I)	>10
	UvAbr(I)	>10
	UvAec(I)	>10
	FUvAf( MeOH)	5,78 ± 0,76
	FUvAbr( MeOH)	7,78 ± 0,13
	FUvAec( MeOH)	>10
<i>M. tenuifolia</i>	FMoTef(H <sub>2</sub> O)	7,75± 0,33
	FMoTebr(H <sub>2</sub> O)	>10
	FMoTec(H <sub>2</sub> O)	>10
	MoTef(I)	4,53±0,44
	MoTebr(I)	>10
	MoTec(I)	>10
	FMoTef(MeOH)	3,84± 0,37
	FMoTebr(MeOH)	5,02 ± 0,80
	FMoTec(MeOH)	>10
	Art	1,93 ± 0,04

CI<sub>50</sub>:concentration inhibitrice à 50% de croissance des parasites; Art: Artémisinine ; SD : Erreur standard ; f : feuilles ; br : brindilles ; ec : écorces ; F H<sub>2</sub>O : fraction aqueuse ; I : interface CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub>O ; FMeOH : fraction méthanolique riche en acétogénines ; MoTe : *Monodora tenuifolia* ; PS : *Polyalthia suaveolens* ; UA : *Uvaria angolensis*:

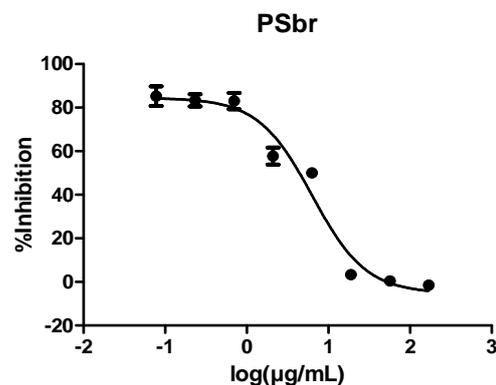
Au regard des résultats consignés dans le tableau X des 27 fractions au total 10 soit 37,04% ont présenté des activités antiplasmodiales variables de 3,24 à 9,78 µg/ml. Parmi lesquelles, 2 fractions aqueuses des feuilles de *M. tenuifolia* (FMoTef(H<sub>2</sub>O)) et *U. angolensis* (FUvAf (H<sub>2</sub>O)) ayant présenté une activité modérée avec les valeurs de CI<sub>50</sub> de 7,75 et 9,78 µg/mL respectivement. On note aussi 2 interfaces CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O des écorces de *P. suaveolens* (PSsb(I)) et des feuilles de *M. tenuifolia* (MoTef(I)) qui ont démontré une très bonne activité avec des CI<sub>50</sub> respectives de 3,84 et 4,53 µg/ml. Par ailleurs, on constate que, 6 fractions méthanoliques riches en acétogénines ont été les plus actives comparativement aux fractions aqueuses et interface dont 3 ont présenté une très bonne activité (CI<sub>50</sub> < 5µg/ml): F[PSbr(MeOH), FPSec(MeOH), et FMoTebr(MeOH)] avec des valeurs variant de 3,24 à 4,90 µg/ml. De manière générale on note une augmentation de l'activité antiplasmodiale avec le fractionnement. En effet, l'activité antiplasmodiale des fractions méthanoliques riches en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* et des feuilles de *M. tenuifolia* et *U. angolensis* avec des valeurs de CI<sub>50</sub> de 3,24 µg/ml; 3,84 µg/ml et 5,78 µg/ml augmentement de deux fois comparée à leurs extraits bruts de départ. Ce qui suggère que le fractionnement aurait concentré le principe actif dans les fractions riches en acetogenines qui seraient les métabolites responsables de l'activité antiplasmodiale. Cependant les fractions des feuilles de *P. suaveolens* ont montré une perte d'activité (CI<sub>50</sub> >10µg/ml). L'activité présente dans les extraits bruts des feuilles serait due à une possible interaction synergistique entre les composés. D'autre part, on note une absence d'activité des extraits bruts éthanoliques des écorces (CI<sub>50</sub> >10µg/ml) pour cette espèce, mais après fractionnement elle s'est révélée active (CI<sub>50</sub>= 4,90 µg/ml) suggérant un effet antagoniste des composés du mélange.

De manière générale, les fractions méthanoliques riches en acétogénines sont potentiellement actives avec FPSbr(MeOH) qui a montré une très bonne activité antiplasmodiale sur la souche K1 de *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> = 3,24 µg/ml). L'activité démontrée par les fractions riches en acétogénines des brindilles et des écorces de *P. suaveolens* corrobore les travaux de **Boyom et al. (2011)** qui ont obtenu des CI<sub>50</sub> de 3,23 et 5,52 µg/ml respectivement. De même, l'activité des huiles essentielles des écorces de *P. suaveolens* et *U. angolensis* a été démontrée par **Boyom (2004)** sur la souche W2 de *P. falciparum*. D'où ces résultats encouragent l'exploration de *P. suaveolens* dans la recherche de métabolites dotés d'activité antiplasmodiale.

Les travaux sur l'efficacité antipaludique de *M. tenuifolia* sont très peu connus. Des études antérieures ont démontré l'activité antiplasmodiale sur la souche W2 de *P. falciparum* des fractions riches en acétogénines des brindilles de *Monodora myristica* avec une  $CI_{50}=5,52 \mu\text{g/ml}$  (Boyom *et al.*, 2011), valeur qui n'est pas très éloignée du résultat obtenu pour la fraction riche en acétogénines des brindilles de *M. tenuifolia* qui a une  $CI_{50}$  de  $5,02 \mu\text{g/ml}$ . On peut également dire que les résultats obtenus justifient l'utilisation traditionnelle de *M. tenuifolia* dans le traitement de la fièvre et les maux de tête qui sont des symptômes du paludisme (Tsabang *et al.*, 2012; Bele *et al.*, 2011).

Bien que l'extrait organique de *U. angolensis* n'ai pas fait l'objet des études d'activités antiplasmodiales à notre connaissance, les travaux menés par Boyom (2004) ont montré que l'huile essentielle extraite de l'écorce de tronc de *U. angolensis* était actif sur la souche W2 de *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50}= 19,76\mu\text{g/ml}$ ). Dans le même sens, les investigations récentes sur les extraits de feuilles méthanoliques de *Uvaria lucida* (Benth) et *Uvaria scheffleri* (Diels) deux autres espèces du genre *Uvaria*, ont démontré une inhibition sur la même souche de *P. falciparum* avec des valeurs de  $CI_{50}$  de 10,3 et 6,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivement (Muthaura *et al.*, 2015).

En somme, on constate que les fractions riches en acétogénines (méthanoliques) de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* ont présenté une activité antiplasmodiale potentiellement élevée comparée à leurs extraits bruts éthanoliques. La fraction des brindilles riche en acétogénines de *P. suaveolens* s'est révélée la plus active à l'issue du screening d'activité antiplasmodiale. La figure 21 ci-dessous illustre la courbe sigmoïdale dose-réponse de l'inhibition de cette fraction.



**Figure 21 : Courbe sigmoïdale dose-réponse de l'activité de FPSbrMeOH (brindilles de *P. suaveolens*) sur K1 de *P. falciparum* en culture**

Légende : PSbr : *P. suaveolens* brindilles ; FMeOH : fraction méthanolique

La fraction méthanolique des brindilles la plus active de *P. suaveolens* sur la souche K1 de *P. falciparum* a été soumise à un total de 8 tests phytochimiques dans le but de mettre en évidence la présence des groupes métabolites bioactifs.

### III-3-3 Résultats du criblage phytochimique et fractionnement de la fraction méthanolique de brindilles de *P. suaveolens* par chromatographie sur colonne

Les résultats du criblage phytochimique de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* la plus active sont consignés dans le tableau XI suivant.

**Tableau XI : Analyse phytochimique qualitative de la fraction méthanolique la plus active des brindilles de *P. suaveolens*:**

Métabolites secondaires	Réactifs	FPSbrMe OH
Alcaloïdes	Mayer	+
Glucosides	Liqueur de Fehling	-
Phénols	Cyanure ferrique	+
Flavonoïdes	Ammoniaque +acide sulfurique concentré	-
Tannins	Chlorure Ferrique	-
Terpenoïdes	Chloroforme	-
Saponines	Eau distillée portée à ébullition	-
Sterols	Anhydride acétique+acide sulfurique	-
Composés lactoniques (acétogénines)	Reactif de Kedde	+

+ : présent ; - : absent ; FPSbrMeOH : fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens*:

Au vue du résultat obtenu dans le tableau ci-dessus, le screening phytochimique révèle l'absence des flavonoïdes, des tannins, des terpenoïdes, des saponines et des stérols et la présence de 3 principales classes de métabolites secondaires: les alcaloïdes, les composés phénoliques et les acétogénines mises en évidence par les fonctions lactones dans cette fraction. Ce résultat est similaire à celui de **Ngantchou *et al.*, (2010)** qui ont isolé l'alcaloïde, polyvéoline de l'écorce de tronc de *P. suaveolens*.

Ce résultat suggérerait que l'effet inhibiteur observé serait attribué aux acétogénines, aux alcaloïdes et aux composés phénoliques mis en évidence dans cette fraction. Ces groupes de composés seraient, prises soit individuellement ou en association responsables de l'activité antiplasmodiale (**Gina *et al.*, 2014**).

En effet, les acétogénines sont des métabolites secondaires qui se retrouvent en grande partie dans la famille des Annonaceae (**Bermejo *et al.*, 2005**) et qui possèdent des activités antipaludiques *in vitro*. Ces molécules agiraient selon **Rakotomanga *et al.*, (2004)** en inhibant l'adénylate translocase de *P. falciparum*. Par ailleurs, les

acétogénines sont des puissants inhibiteurs du complexe I (NADH: ubiquinone oxydoréductase) du système mitochondrial de transport d'électrons des cellules cancéreuses (Lewis *et al.*, 1993). Leur pouvoir inhibiteur a également été démontré sur la NADH oxydase des membranes plasmiques chez les mêmes formes cellulaires (Morré *et al.*, 1995). Ces enzymes sont présents dans *P. falciparum* et dont leur inhibition empêcherait l'oxydation du parasite et la production de l'ATP cytosolique conduisant ainsi à l'apoptose. Il a été aussi prouvé que ces acétogénines étaient cytotoxiques et possédaient des activités insecticides, bactéricides, fongicides et antiplasmodiaux (Rakotomanga *et al.*, 2004 ; Guadaño *et al.*, 2000).

Les alcaloïdes constituent l'une des classes naturelles les plus importantes et sont utilisés dans la thérapie antipaludique dont l'exemple remarquable est la quinine (Kaur *et al.*, 2009). De même, l'alcaloïde, polyvéoline de *P. suaveolens* est douée d'activité antiparasitaire (antitrypanosome avec une CI<sub>50</sub> de 32 µM) dont la présence pourrait justifier l'activité antiplasmodiale observée (Ngantchou *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les composés phénoliques contribueraient également à l'inhibition de cette fraction, car il a été démontré que les composés phénoliques inhibent des enzymes importantes ( $\beta$ -cétol-ACP réductase, b-hydroxyacyl-ACP-déshydratase et énoyl acyl-ACP réductase) pour la biosynthèse des acides gras chez *P. falciparum* qui compromettent sa croissance (Tasdemir *et al.*, 2006).

A la suite de ce screening, la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* la plus active sur la souche K1 de *Plasmodium falciparum* a été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne et les sous fractions testées pour leur activité antiplasmodiale.

#### **III-3-4 Susceptibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux sous fractions issues des brindilles de *P. suaveolens***

Après la chromatographie sur colonne, 438 fractions ont été collectées et regroupées en 12 sous-fractions suivant leur profil CCM. Les tests antiplasmodiaux ont été effectués sur les sous fractions obtenues et les résultats sont représentés dans le tableau XII.

**Tableau XII : Activité antiplasmodiale *in vitro* des sous-fractions des brindilles de *P. suaveolens***

Sous fractions	CI <sub>50</sub> ±EC (µg/ml)
PS1	>10
PS2	>10
PS3	>10
PS4	>10
PS5	>10
PS6	>10
PS7	8,55 ± 2,05
PS8	4,42 ± 0,87
PS9	>10
PS10	>10
PS11	>10
PS12	>10

Au vue des résultats indiqués ci-dessus, des 12 sous fractions testées, PS8 s'est révélée la plus active selon l'échelle d'activité décrite par **Muñoz *et al.*, (2000)** avec une CI<sub>50</sub> de 4,42 µg/ml contrairement à PS7 avec une activité antiplasmodiale modérée, CI<sub>50</sub> de 8,55µg/ml. Tous les autres sous fractions sont inactifs avec une CI<sub>50</sub>>10 µg/ml. Des études antérieures ont prouvé que les groupes lactones terminaux, fonction des acétogénines pourraient être mises en évidence avec des systèmes solvants similaires à ceux utilisés pour l'élution des sous fractions PS7 et PS8 (**Khetarpal *et al.*, 1991**). De même, il a été démontré que le système Hex-AE (80 :20→:20 :80) utilisé pour ces sous-fractions serait une combinaison convenable pour l'extraction des alcaloïdes (**Bett, 2015**). Ceci suggère que les groupements lactones caractéristiques des acétogénines et les alcaloïdes justifieraient l'activité des ces sous fractions dérivant de FPSbr(MeOH). On remarque aussi, PS8 (CI<sub>50</sub>= 4,42 µg/ml) a présenté une activité légèrement faible comparée à la fraction mère FPSbrMeOH (CI<sub>50</sub>= 3,24 µg/ml). Ce qui nous amène à dire que la baisse de l'efficacité à travers le fractionnement pourrait être dû à une rupture de l'interaction synergique entre les composés. Ainsi, il est possible de suggérer une synergie positive entre les acétogénines et les alcaloïdes dans cette sous fraction. Les études de **Rasoanaivo *et al.*, (2011)** ont démontré que les extraits bruts sont souvent plus actifs que les produits purs isolés.

La fraction potentielle méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* et les sous fractions PS7-PS8 ayant présentées l'activité ont été évaluées pour les tests de cytotoxicité sur les cellules HFF.

### III-3-5 Cytotoxicité des fractions FPSbr(MeOH), et PS7-PS8 sur les cellules HFF

Le tableau XIII ci-dessous nous montre les résultats du test de cytotoxicité des fractions et des sous fractions de *P. suaveolens*.

**Tableau XIII : Cytotoxicité de la fraction active FPSbr(MeOH) et des sous fractions**

<sup>a</sup> Sous-fractions	<sup>b</sup> CC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>FPSbr(MeOH)</b>	<b>&gt;30</b>
<b>PS7</b>	<b>&gt;30</b>
<b>PS8</b>	<b>&gt;30</b>
<b>ART</b>	<b>&gt;30</b>

<sup>a</sup> sous fractions obtenues par chromatographie sous colonne de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* (FPSbrAMeOH) aux systèmes solvants de polarité croissante ; <sup>b</sup>Cytotoxicité cellulaire des sous fractions évaluée sur les cellules HFF en triplicate.

Au regard du tableau ci-dessus, il ressort que la fraction méthanolique FPSbr(MeOH) et les 2 sous fractions actives ont présenté une innocuité sur les cellules HFF avec des CC<sub>50</sub> > 30 µg/ml. Ce qui expliquerait que les composés chimiques présents dans ces fractions ne seraient pas toxiques sur les déshydrogénases mitochondriales importantes pour la respiration des cellules HFF. On constate aussi que ces fractions sont plus sélectives pour *P. falciparum*. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Yamthe et al., (2015)** qui ont démontré que les fractions riches en acétogénines de *Annona muricata* (Annonaceae) et les sous fractions présentaient une innocuité sur les cellules HFF.

### III-3-6 Extraits et fractions inhibiteurs de la TI possédant une activité antiplasmodiale sur la souche K1 de *P. falciparum*

L'activité inhibitrice de la TI et de la souche K1 de *P. falciparum* des extraits et des fractions de *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* a été démontrée précédemment. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* ayant présenté la meilleure activité sur la transcriptase inverse du VIH, ne montre pas d'activité sur la souche K1 de *Plasmodium falciparum*. Ceci pourrait s'expliquer que cet extrait posséderait un principe actif à mode d'action différente que les polymérase. Cependant, on remarque que l'extrait brut méthanolique des feuilles (UvAfMeOH) et la fraction méthanolique des feuilles de *U. angolensis* (FUvAfMeOH) ont présenté une activité inhibitrice respectivement sur l'ADN polymérase ARN dépendent de la TI du VIH 1 (CI<sub>50</sub> = 46,50 µg/ml) et sur la souche K1 de *Plasmodium*

*falciparum* (CI<sub>50</sub> = 5,78 µg/ml). Ce qui suggère que *U. angolensis* posséderait des composés à cible d'action en commun sur les polymérase TI du virus VIH et du parasite *Plasmodium falciparum*. Les polymérase représentent les cibles d'action de choix des nouveaux médicaments antipaludiques et anti-VIH (**Berdis, 2008**). En effet l'inhibition de la TI du VIH1 et du *Plasmodium* par les extraits méthanoliques de *U. angolensis* seraient attribués aux flavonoides. Les flavonoides ont déjà été caractérisés chez les plantes du genre *Uvaria* (**Rosandy et al., 2013**). Ces métabolites constituent un large groupe des composés phénoliques. Il a été démontré que le groupe –OH phénolique serait responsable de l'activité antiplasmodiale en ciblant certaines biomolécules fonctionnelles telles que les enzymes et l'ADN essentielles pour la survie du paludisme (**Lim et Lee, 2007**). Les flavanoides inhiberaient les polymérase du *Plasmodium* qui interviennent dans la polymérisation de l'hémoglobine en hémotoxine (**Manu et al., 2013**). Ces composés ont également démontré une activité sur l'ADN polymérase du VIH (**Liu et al., 2002**).

Au terme du test d'activité antiplasmodiale *in vitro* des sous- fractions, la fraction riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* ayant présenté la meilleure activité a été retenue pour les tests antipaludiques *in vivo*.

### III-3 Essais *in vivo* de la fraction potentielle riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens*

#### III-3-1 Etude de la toxicité aigüe

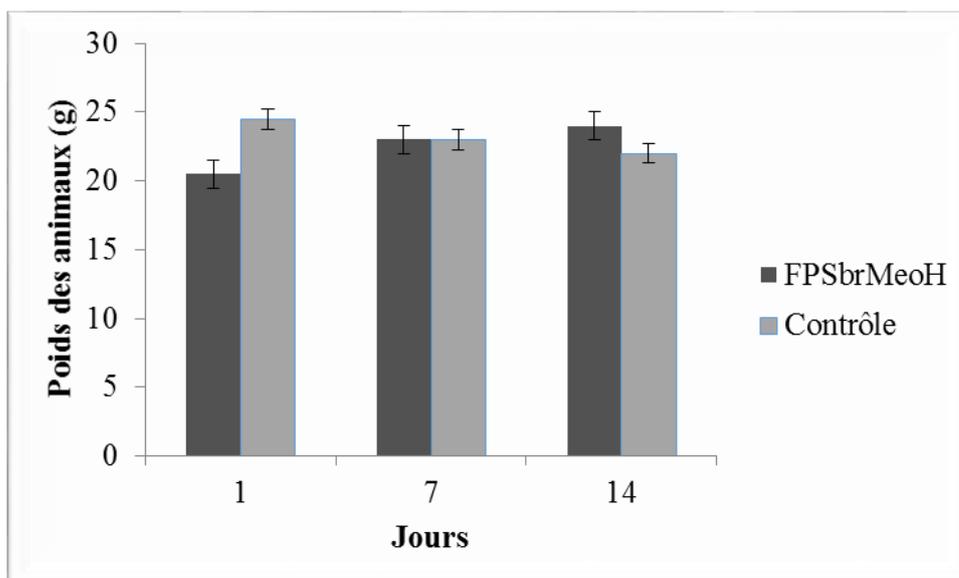
La toxicité de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* a été évaluée sur des souris saines par administration orale de la dose unique de 5000 mg/kg. A l'issue de cette expérimentation les signes de toxicité ont été observés (la fatigue, sensibilité au bruit, et au toucher, aspect des poils, la mobilité, la diarrhée, les frissons, la prostration) immédiatement 30 secondes, 1 h, 2,3 heures et 24 h après administration et quotidiennement pendant 7 jours et 14 jours. Les résultats sont exprimés dans le tableau XIV suivant.

**Tableau XIV : Manifestations comportementales observées chez les souris, 24h, 7 jours et pendant 14 jours après administration de la fraction active des brindilles de *P. suaveolens***

Groupes	Nombre de souris	Nombre de décès	Comportements			
			Aspect des poils	Mobilité	Sensibilité au toucher	Sensibilité au son
<b>5000mg/kg</b>	3	0	Dressé	Normale	Normale	Normale
<b>Contrôle</b>	3	0	Dressé	Normale	Normale	Normale

Au vue du tableau ci-dessus, nous pouvons dire que l'administration de la fraction FPSbr MeOH chez les souris ne provoquent aucune manifestation comparée au groupe contrôle.

La variation des poids de chaque lot d'animaux a été notée pour chaque groupe.



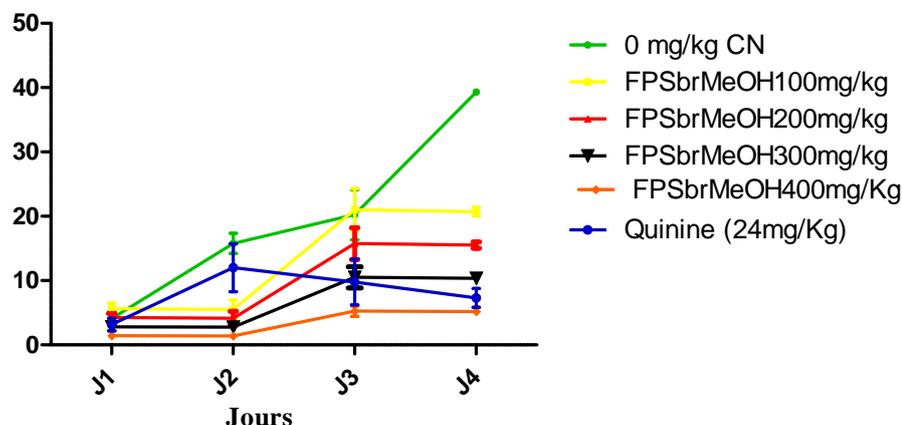
**Figure 22: Variation des poids moyens des animaux observée pendant 14 jours**

De cette figure 23, on constate que la variation du poids des lots expérimentaux n'est pas significative comparativement au lot témoin. Cette analyse suggère que la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* n'est pas toxique car elle n'entraîne pas de décès et n'affecte pas significativement les paramètres cliniques des souris après administration par voie orale. D'où la  $DL_{50} > 5\text{g/kg}$  de poids d'après la ligne directive 423 de l'OCDE, 2001.

### **III-3-2 Activité antimalariale suppressive de la fraction méthanolique active des brindilles de *P. suaveolens***

La figure 23 suivante représente l'effet de FPSbrMeOH sur la parasitémie en fonction de la durée du traitement.

### Evolution de la parasitémie en fonction du temps de traitement

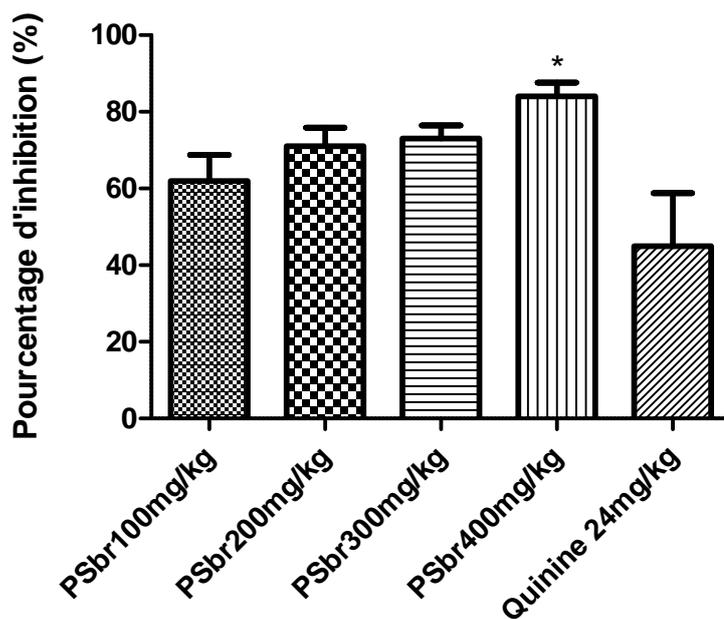


**Légende :** CN : contrôle négatif ; FPSbrMeOH= fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens*.

**Figure 23 : Effets de FPSbr(MeOH) à différentes doses sur la parasitémie des souris infectées à *P. berghei*.**

De cette figure 24, on remarque effectivement qu'il y'a une variation de la parasitémie en fonction du temps de traitement. En effet, de J1-J2, la parasitémie est relativement constante < 5%, de J2-J3 elle augmente et enfin devient constante de J3-J4. Au seuil de probabilité  $p < 0, 4584$ , il n'existe pas de différence significative de parasitémies entre les doses de J1-J2 et de J3-J4 tandis qu'il y'a une différence significative de J2-J3 à  $p < 0, 0439$ .

Les pourcentages d'inhibition ont été déterminés à partir des parasitémies moyennes pour chaque dose après le 4<sup>ème</sup> jour du traitement.



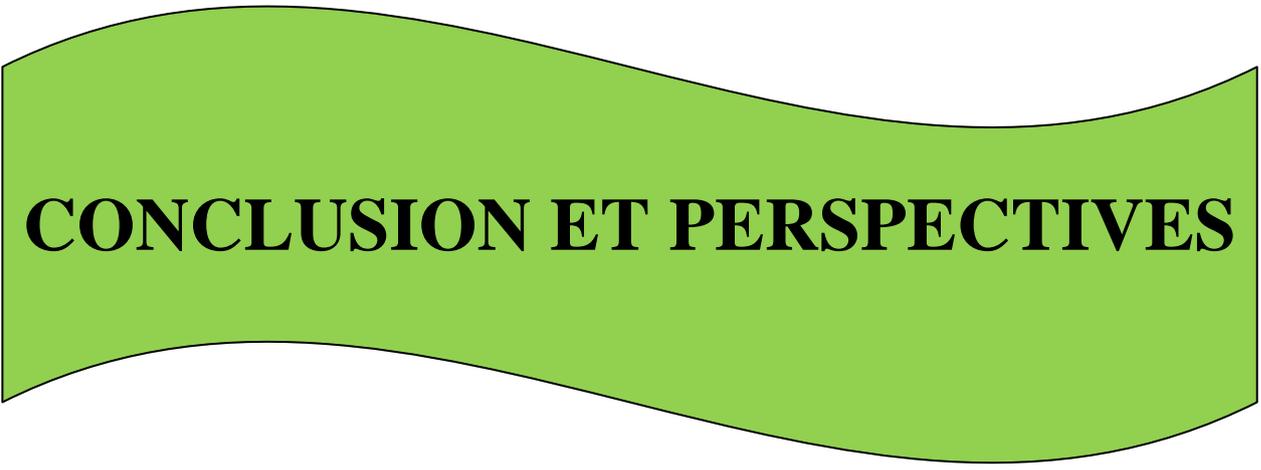
Légende : PSbr= fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens*

**Figure 24 : Pourcentages d'inhibition de FPSbrMeOH sur l'infection à *P. berghei***

Il ressort de cette figure que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à la dose testée. On constate une inhibition élevée (79,39%) à la plus forte dose 400 mg/kg qui montre une différence significative comparée à la dose 100 mg/kg au seuil de probabilité  $p < 0,05$ . La dose suppressive qui inhibe de 50% l'infection a été déterminée à l'aide de GraphPad Prism 5.0 ( $DS_{50} = 71,39 \pm 1,34$  mg/Kg). Ce résultat confirme celui obtenu *in vitro* et supporte l'usage de cette plante dans le traitement traditionnel du paludisme. De même l'inhibition *in vivo* observé pour cette fraction FPSbrMeOH serait due à l'effet synergique des métabolites présents (alcaïdes, acétogénines et composés phénoliques). Bien que très peu de travaux soient connus sur l'activité antiplasmodiale *in vivo* des plantes de la famille des annonacées, **Pimenta et al., 2014** ont rapporté une réduction de façon significative de la parasitémie ( $p < 0,001$ ) de 75 % après 4 jours d'administration de 15 mg/kg/jr de la fraction riches en alcaloïdes des feuilles de *Annona crassiflora*. Par ailleurs, une étude récente a montré l'effet suppressif *in vivo* sur l'infection à *P. berghei* des extraits de *Annona muricata* (**Somsak et al., 2016**).

En conclusion, la fraction méthanolique riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* a été la plus active sur la souche K1 de *P. falciparum*. La sous fraction PS8 a exercé une bonne inhibition sur le parasite avec une  $CI_{50}$  de 4,42  $\mu\text{g/ml}$ . La fraction potentielle riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* a montré

une innocuité sur les cellules HFF. Celle-ci était non toxique sur les souris saines à  $DL_{50} > 5000$  mg/kg de poids corporel et une activité antimalariale suppressive *in vivo* avec une  $DS_{50}$  de 71, 39 mg/kg sur les souris infectées par *P. berghei*.



**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail dont l'objectif général était d'évaluer l'activité des extraits et des fractions de *Polyalthia suaveolens*, *Monodora tenuifolia* et *Uvaria angolensis* contre les enzymes importantes du cycle de replication du VIH et *P. falciparum* il ressort des conclusions suivantes :

- L'extrait méthanolique des écorces de *U. angolensis* s'est révélé le plus actif à la fois sur les 2 fonctions catalytiques ADN polymérase et ARNase H de la TI respectivement. Le résidu solide 4, et la fraction aqueuse ont montré une inhibition intéressante sur la ribonucléase H de la transcriptase inverse du VIH1 avec une  $CI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ . L'analyse chimique chromatographique a révélé la présence des chalcones dans ces fractions. L'angoletine, un dihydrochalcone, palmitoyl glycérol et 1-stearoyl-glycerol ont été identifiés dans le résidu 4 solide de *U. angolensis*. Ce résidu et la fraction aqueuse ont montré une innocuité sur la lignée cellulaire A549.

- La fraction méthanolique riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* a été la plus active avec une  $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$  sur la souche K1 de *P. falciparum*. Les alcaloïdes, les composés phénoliques et les groupements lactones (acetogenines) ont été mises en évidence dans cette fraction méthanolique de *P. suaveolens*. Cette fraction a été non toxique *in vitro* sur les cellules HFF avec  $CC_{50} > 30 \mu\text{g/ml}$ .

- La fraction méthanolique riche en acétogénines des brindilles de *P. suaveolens* a montré une innocuité *in vivo* sur les souris saines et a démontré une  $DS_{50} = 71,39 \text{ mg/Kg}$  sur l'infection à *P. berghei*

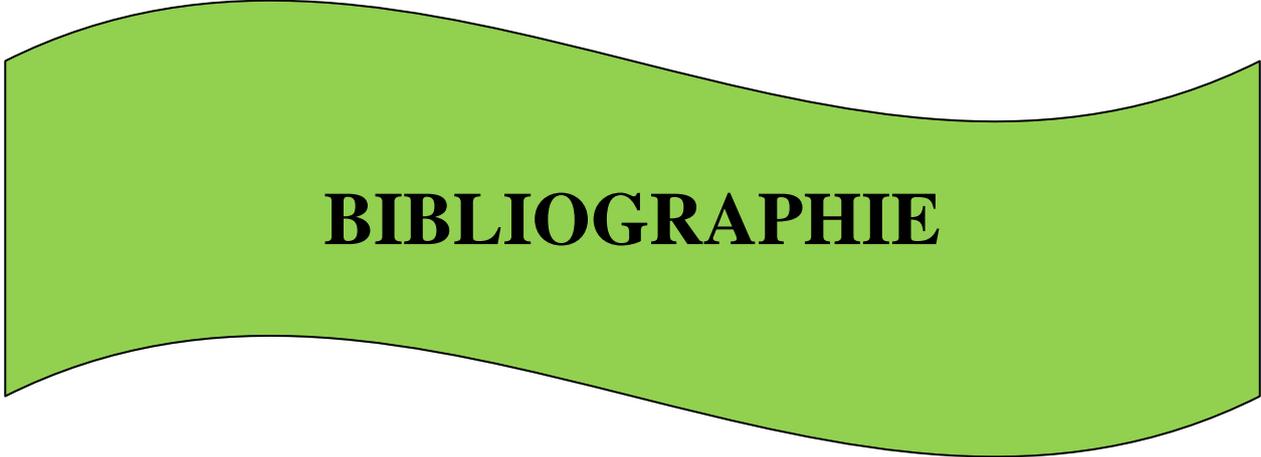
Dans l'ensemble, *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* et *U. angolensis* sont des plantes intéressantes de part les résultats obtenus. *U. angolensis* et *P. suaveolens* utilisées traditionnellement pour l'infection palustre seraient une source potentielle des nouvelles molécules ayant des propriétés inhibitrices de la transcriptase inverse du VIH et antiplasmodiales.

Ces résultats obtenus incitent à la poursuite des investigations. Nous nous attèlerons dans un futur à :

- D'isoler les principes actifs des fractions prometteuses de *Uvaria angolensis* et déterminer leur activité et mécanisme d'action sur l'ARNase H et la TI.

- Effectuer des études *in vivo* (curative et prophylactique) de la fraction méthanolique de *P. suaveolens*

➤ Faire une analyse chimique complémentaire de la fraction méthanolique des brindilles de *P. suaveolens* la plus active et étudier les mécanismes d'action des composés sur les polymérase de *Plasmodium*.



**BIBLIOGRAPHIE**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Raddad, L.J., Patnaik, P., Kublin, J.G., 2006.** Dual Infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Sciences*, 314 (5805):1603-1606.
- Adeoye, A.O., Oguntimein, B.O., 1986.** 3-dimethylallylindole: an antibacterial and antifungal metabolite from *Monodora tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, 49(3): 534-537.
- 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., Sofowara A., Tamze V. et 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, 194-201.
- Adjanohoun, E., et Assi, L.A., 1979.** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte-d'Ivoire. Centre national floristique, p.32.
- Alali, F.Q., Liu, X.X., and Mc Laughlin, J.L., 1999.** Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Product*, 62: 504-540.
- Alam, A., Goyal, M., Iqbal, M.S., Pal, C., Dey, S., Bindu, S., Maity, P., Bandyopadhyay, U., 2009.** Novel antimalarial drug targets: hope for new antimalarial drugs. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2: 469-489.
- Aly, M.R.E.S., Fodah, H.A.E.R., Saleh, S.Y., 2014.** Antiobesity, antioxidant and cytotoxicity activities of newly synthesized chalcones derivatives and their metal complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 76, 517-530.
- Alcaro, S., Artese, A.C., Ceccherini-Silberstein, F., Costaa, G., Ortuso, F., Parrotta, L., Perno, C.F., Svicher, V., 2011.** Molecular and structural aspects of clinically relevant mutations related to the approved non-nucleoside inhibitors of HIV-1 inverse transcriptase. *Drug Resistance Updates*. 7:1-10.
- Allen, S.J., Krawczyk, S.H., McGee, L.R., Bischofberger, N., Mulato, A.S., Cherrington, J.M., 1996.** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 7: 37-45.
- Ammassari, A., Murri, R., Pezzotti, P., Trotta, M.P., Ravasio, L., De Longis, P., Lo Caputo, S., Narciso, P., Pauluzzi, S., Carosi, G., Nappa, S., Piano, P., Izzo, C.M., Lichtner, M., Rezza, G., Monforte, A., Ippolito, G., d'Arminio Moroni, M., Wu, A.W., Antinori, A., 2001.** Self-reported symptoms and medication side effects influence adherence to highly

- active antiretroviral therapy in persons with HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, .28(5):445-449.
- ANOFEL, 2002.** Parasitologie Mycologie. 7eme Edition. Format Utile Editions. Saint-Maur. 494 pAnti-plasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *Journal*, 1219-1227.
- Arion, D., Sluis-Cremer, N., Min, K.L., Abram, M.E., Fletcher, R.S., Parniak, M.A.,2002.** Mutational analysis of Tyr-501 of HIV-1 inverse transcriptase. Effects on ribonuclease H activity and inhibition of this activity by N-acylhydrazones. *Journal of Biological. Chemistry*. 277, 1370-1374.
- Aromde, C., Wichitchote P., Jantakum N., 2005.** Spectrophotometric Determination of Total Lactone in *Andrographis paniculata* Nees. Songklanakarim. *Journal of Science Technology*, 27(6): 1227-1231.
- Arts, E.J., and Hazuda, D.J.,2015.** HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Hapbor Laboratory. 10:1-24.
- Ashley, E.A., Krudsood, S., Phaiphun, L., Srivilairit, S., McGready, R., Leowattana, W., 2004.** Randomized, controlled dose-optimization studies of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated multidrugresistant falciparum malaria in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 190(10):1773–1782.
- Atamna, H., and Ginsburg, H., 1995.** Heme degradation in the presence of glutathione. *The Journal of. Biological. Chemistry*. 270(42): 24876-24883.
- Aubry, P., 2015.** Infection par le VIH/Sida et tropiques, *Médecine Tropicales*, 1-9.
- Avupati, V, R., and Yejella, P, R., 2014.** Chalcones: a mini review. *Word Journal of Pharmacy and Pharmacological Sciences*, 3 (10): 1713-1742.
- Bakarnga-Via, Hounda, J.B., Fokou, T.P.V., Tchokouaha, Y.R.L., Gary-Bobo, M., Gallud, A., Garcia, M., Walbadet, L., Secka, Y., Dongmo, J.M.P., Boyom, F.F., Menut, C., 2014.** Composition and cytotoxic activities of essential oils from *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich, *Xylopiya parviflora* (A. Rich) Benth.) And *Monodora myristica* (Gaertn) growing in Chad and Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 (125):1-8.e
- Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M., Goldberg, D.E., 2002.** Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the. National. Academy of. Sciences. USA* 99: 990–995.
- Bani-Sadr, F., 1999.** Traitements antirétroviraux in *Maladies infectieuses*1. Perronne C. © Groupe Liaisons SA, 406: 171-174.

- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugéyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Bin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozemaum, W., and Montagnier, L., 1983.** Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868–871.
- Basco L.K., Ruggeri C., Le Bras J., (1994).** Molécules antipaludiques : mécanismes d'action, mécanisme de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins, Masson : 103-109.
- Basu, V.P., Song, M., Gao, L., Rigby, S.T., Hanson, M.N., Bambara, R.A., 2008.** Strand
- Beilhartz, G.L., and Götte, M., 2010.** HIV-1 ribonuclease H: structure, catalytic mechanism and inhibitors, *Viruses*, 2 (4), 900–926.
- Bele, M.Y., Focho, D. A. Egbe, E. A. and Chuyong, B. G., 2011.** Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. *African Journal of Plant Science*, 5(4): 237-247.
- Berdis, A.J., 2008.** DNA polymerase as therapeutic targets. *Biochemistry*, 47: 8253-8260.
- Benoit-Vical, F., Robert, A., Meunier, B., 2000.** In vitro and in vivo potentiation of Artemisinin and Synthetic endoperoxide antimalarial drug metalloporphyrins Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(10): 2836-2841.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., and Cortes, D., 2005.** Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Report*, 22(2): 269-303.
- 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, Université Paul Sabatier Toulouse*.
- Bett, S., 2015.** at <https://www.quora.com/Why-is-a-mixture-of-hexane-and-ethyl-acetate-used-in-this-alkaloid-extraction-procedure>, Feb. 26, 2015.
- Betti J.L., and Lejoly J., 2009.** Contribution to the knowledge of medicinal plants of Dja Biosphere Reserve Cameroon: Plants used for treating jaundice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12): 1056-1065.
- Betti, J.L., 2004.** An ethnobotanical study of medicinal plants among the baka pygmies in the dja biosphere reserve, Cameroon. *African Study Monographs*, 25(1): 1-27.
- Bhisutthibhan, J., Pan, X. Q., Hossler, P.A., Walker, D.J., Yowell, C.A., Carlton, J., Dame, J.B., Meshnick, S.R., 1998.** The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 16192–16198.

- Blackman, M.J., 2008.** Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cellular Microbiology*. 10:1925-1934.
- Borkow, G., Fletcher, R.S., Barnard, J., Arion, D., Motakis, D., Dmitrienko, G.I., Parniak, M.A., 1997.** *Biochemistry*, 36: 3179-3785.
- Bottius, E., Bakhis, N., and Scherf, A., 1998.** *Plasmodium falciparum* Telomerase: De Novo Telomere addition to Nontelomeric Sequences and Role in Chromosome Healing. *Molecular and Cellular Biology*, 18(2):919-925.
- Bouquet, A., 1969.** Féticheurs et Médecins traditionnelles du Congo (Brazzaville). ORSTON, Paris : 282 p.
- Boyom, F.F., Fokou, P.V.T., Tchokouaha, L.R.Y., Spangenberg, T., Mfopa, A.N.; Kouipou, R.M.T., Mbouna, C.D.J., Donfack, V.F.D., Zollo. P.H.A., 2014.** Repurposing the Open Access Malaria Box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 58(10), 5848–5854.
- 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., 2011.** Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 717–724.
- Boyom, F.F., 2004.** Huiles essentielles d'annonacées camerounaises: Analyses chimiques, Activité antioxydantes et Antiplasmodiales. *Thèse de Doctorat en Biochimie, Université de Yaoundé I* : 67-172.
- Braga, M. E.M., Ehlert, P.A.D., Ming, L.C., Meieles, M.A.A., 2005.** Supercritical fluid extraction from lippia alba: global yields, kinetic data and extract chemical composition. *Journal of supercritical fluids*, 34: 149-156.
- Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A., 1996.** 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Molecular Pharmacology*, 50:1551–1558.
- Burkill, H.M., 1985.** The Useful plants of West Tropical Africa. 2nd edition. Vol. 1, Families A-D-Royal Botanic Garden Kew, Richmond, United Kingdom. 960p.
- Burda, S.T., Viswanath, R., Zhao, J. Kinge, T., Anyangwe, C., Tinyami, E.T., Haldar, B., Rebecca L.R. P., Jarido, V., Hewlett, I.K., and Nyambi, P.N., 2010.** HIV-1 Inverse Transcriptase Drug-Resistance Mutations in Chronically Infected Individuals Receiving or Naïve to HAART in Cameroon. *Journal of Medical Virology*, 82(2): 187–196.

- Cares, M.G., Vargas, Y., Gaete, L., Sainz, J., Alarcon, J., 2009.** Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Physics. Procedia*, 3: 169-178.
- Carnevale, P., et Robert, V., 2009.** Les anophèles, Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD Editions: Collection Didactique. Marseille. 391
- CDC Cameroon (Centers for Diseases Control and Prevention), 2013.** Web: [www.cdc.gov/globalhealth](http://www.cdc.gov/globalhealth).
- CDC Malaria, 2007.** Treatment of Malaria (Guidelines for clinicians) [www.cdc.gov/malaria/clinicians.htm](http://www.cdc.gov/malaria/clinicians.htm) report: 1-5.
- 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(2): 59-61.
- Champy, P., Höglinger, G.U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévotte, O., Medja, F., Lombès, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, 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.
- Chin, W., and Coatney, G.R., 1971.** Relapse activity in sporozoite-induced infections with a West african strain of Plasmodium ovale. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20(6):825-7.
- Collier, A.C., Coombs, R.W., Schoenfeld, D.A., Bassett, R.L., Timpone, J., Baruch, A., Jones, M., Facey, K., Whitacre, C., McAuliffe, V.J., et al. 1996.** Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl Journal of Medicinal Chemistry*, 334:1011–1017.
- Cole, A.L., Hossain, S., Cole, A.M., an Phanstiel, O., 2016.** Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24: 2768–2776.
- Copeland, R.A., 2005.** Evaluation of enzymes inhibitors in Drug Discovery: a guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, *Wiley Interscience*, New Jersey, 1-11.
- Corona, A., Masaoka, T., Tocco, G., Tramontano, E., Le Grice, S. F.J. 2013.** Active site and allosteric inhibitors of the ribonuclease H activity of HIV reverse transcriptase. *Future Medicinal Chemistry*, 5(18), 2127–2139.

- Corona, A., Esposito, F., Tramontano, E., 2014.** Can the ever-promising target HIV transcriptase-associated RNase H become a success story for drug development? *Future virology*, 9 (5) 445-448.
- Cox-Singh, J., Timothy M.E.D., Kim-Sung, L., Sunita, S. G. Shamsul, A.M., Shanmuga R., Ratnam, Hasan A. R., David J.C., and Singh, B., 2008.** *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans is widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infectious Diseases*, 46, (21)65-171.
- Cravo, L., Perineau F., Delmas, M., Bessiere, J.M., 1991.** Chemical composition of the fruit and leaf oil of *Polyalthia suaveolens* Engl. and Diels. *Journal of Essential Oil Research*, 3: 459-461.
- Critchfield, J.W., Butera, S.T., Folks, T.M., 1996.** Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12, 39–46.
- Cuzzucoli, Crucitti, G., Métifiot, M., Pescatori, L., Messori, A., Madia, V.N., Pupo, G., Saccoliti, F., Scipione, L., Tortorella, S., Esposito, F., 2015.** Structure-Activity Relationship of Pyrrolyl Diketo Acid Derivatives as Dual Inhibitors of HIV-1 Integrase and Reverse Transcriptase Ribonuclease H Domain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58:1915–1928.
- D'Aquila, R.T., Hughes, M.D., Johnson, V.A., Fischl, M.A., Sommadossi, J.P., Liou, S.H., Timpone, J., Myers, M., Basgoz, N., Niu, M., 1996.** Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Annals of Internal Medicine*, 124:1019–1030.
- Daily, J.P., 2006.** Antimalaria drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *Journal of clinical Pharmacology*, 46: 1487-1497.
- Dhar, D.N., 1981.** The chemistry of chalcones and related compounds, Wiley Interscience, New York.
- Davies, J.F., Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S.R., Matthews, D.A., 1991.** Crystal Structure of the Ribonuclease H Domain of HIV- I Reverse Transcriptase. *Science*, 252, 88-95.
- De, B., 1998.** Alkaloids of *Strychnos nux-vomica*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 19: 432-439.
- Decastela F., Logros F. et Lagardère B., (2003).** Paludisme d'importation de l'enfant en France, *Archives de pédiatrie*, 10 : 58-765.

- Deharo, E., Garcia, R., Oporto, P., Sauvain, M., Gautret, P.h., Ginsburg, H., 2002.** A non-radiolabeled ferriprotoporphyrin IX biomineralization inhibition test (FBIT) for the high throughput screening of antimalarial compounds. *Experimental Parasitologie*, 100 (4): 252-256.
- Delhaes, L., Biot, C., Berry, L., Delcourt, P., Maciejewski, L.A., Camus, D., Brocard, J.S., Dive, D., 2002.** Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity. *Chem Bio Chem* 3: 418-423.
- Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C.A., Hadjipavlou-Litina, D., Kefalas, P., 2009.** Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 8073–8085.
- Dobson, M.J., 1999.** The malariology centenary. *Parassitologia*,41: 21-32.
- Dondorp, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, .KM., Ariey, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J., 2009.** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl Journal of Medicinal Chemistry*; 361(5):455-467.
- Dupré, F., 2013.** VIH/SIDA, Comment en parler ? guide édité par Sidaction, avec le soutien de gilead. Création : Isabelle bouffier - [www.isocele.me](http://www.isocele.me)
- Duraisingh, M.T., Drakeley, C.J., Muller, O., Bailey, R., Snounou G., Targett, G.A.T., Greenwood, B.M., Wahrust, C.D., 1997.** Selection for the tyrosine-86allele of the pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology* 114: 205-211
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna, S., 2003.** Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424: 957-961.
- Eggleston, K.K., Duffin, K.L., Goldberg, D.E., 1999.** Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 32411–32417.
- Ekeanyanwu, R.C., G.I. Ogu and P.U. Nwachukwu, 2010.** Biochemical characteristics of the African Nutmeg. *Monodora myristica*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 5: 303-308.
- Ekeanyanwu, R.C., Njoku, O.U., 2010.** Biochemical studies on Nigerian *Monodora tenuifoliaseed*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8 (4): 257-267.

- Emerman, M., Malim, M.H., 1998.** HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, 280:1880-1884.
- Emina, M.O., Odjimogho, S.E., 2010.** Ocular Problems in HIV and AIDS Patients in
- Engelman, A., and Cherepanov, P., 2012.** The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Reviews*, 10:279-290.
- Esposito, F., and Tramontano, E., 2014.** Past and future. Current targeting drug HIV1 integrase and inverse transcriptase associated - ribonuclease H activity: single and dual active site inhibitors. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(4): 129-144.
- Esposito, F., Corona, A., Tramontano, E., 2012.** HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Molecular Biology International*: 10, 1-23.
- Ezenwali, M. O., Njoku, O.U. and Okoli, C.O., 2010.** Studies on the anti-diarrheal properties of the seed extract of *Monodora tenuifolia*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2(4): 20-26.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligo, B., Stefano Buttò, S., 2010.** HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *AnnIst super sAnItà*, 46, (1): 5-14.
- Fauci, A.S., 2003.** HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature. Medicine*, 9:839-843.
- Ferrer, I., and Thurman, E.M., 2012.** “Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry” *Journal of Chromatography A*, 1259, 148-157.
- Fidock, A.D., Rosenthal, P., Croft, L.S., Brun. R., and Nwaka, S., 2004.** Antimalaria Drug Discovery Efficacy Models for Compounds Screening. *Nature Review* 3: 509-520.
- Flateau, C., Le Loup, G., Pialoux, G., 2011.** Consequences of HIV infection on Malaria and therapeutic implications: a systematic review. *Lancet, Infectious diseases*, 11:541-556.
- Focho, D.A., Egbe, E.A., Chuyong, G.B., Fongod, A.G.N., Fonge, B.A., Ndam, W.T. et Youssoufa, B.M., 2010.** An ethnobotanical investigation of the Annonaceae on Mount Cameroon. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20):2148-2158.
- Fournet, A., 1979.** *Plantes medicinales congolaises*. ORSTOM, ISBN 2-7099-0555-8.
- Frederich, M., Tits, M., Goffin, E., Philippe, G., Grellier, P., De Mol, P., Hayette, M.P., Angenot, L., 2004.** *In vitro* and *in vivo* antimalarial properties of isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos umbarensis*. *Planta Medica*, 70:520–525.
- Froebel, K., Howard, W., Schafer, J.R., Howie, F., Whitworth, J., Kaleebu, P., Brown, A.L., Riley, E., 2004.** Activation by malaria antigens renders mononuclear cells susceptible to HIV

infection and re-activates replication of endogenous HIV in cells from HIV-infected adults. *Parasite Immunology*, 26:213-217.

**Froebel, K., Howard, W., Schafer, J.R., Howie, F., Whitworth, J., Kaleebu, P., Brown, A.L., Riley, E., 2004.** Activation by malaria antigens renders mononuclear cells susceptible to HIV infection and re-activates replication of endogenous HIV in cells from HIV-infected adults. *Parasite Immunology*, 26:213-217.

**Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Ganesan, S., Chaurasiya, N.D., Sahu, R., Walker, L.A., Tekwani BL., 2012.** Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology*. 294(1):54-60.

**Ganesan, S., Chaurasiya, N.D., Sahu, R., Walker, L.A., Tekwani, B.L., 2012.** Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology*. 294 (1):54-60.

**Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I, Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C, Carucci, D.J, Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M, Barrell, B., 2002.** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* . *Nature*, 419.

**Gelderblom, H.R., Gentile, M., Scheidler, A., Özel, M., Pauli, G., Struktur, Z., Funktion, B., Goepfert, P.A., Lumm, W., Farmer, P., 1993.** Zur Struktur und Funktion bei HIV. AIFO, 231.

**Gentillini, M., CAUMES E., DUFLO B. (1993):** Médecine Tropicale, Médecine-Sciences 5ème ed. Flammarion Paris. 928p

**Gina, F., Renata, B.S., Ari DeFreita, H., Paul, M., Adrian, M.P., 2014.** Plants of Annonaceae traditionally used as antimalarials. A Review, 315-336.

**Goodman, C.D ., McFadden, G.I., 2013.** Targeting apicoplasts in malariaparasites. *Expert Opin HerTargets* 17: 167-177.

- Greenwood, B.M., Fidock, D.A., Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., Duffy, P.E., 2008.** Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation* 118:1266–1276.
- 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.
- Guidelines National ART 2009,** National anti-retroviral therapy guidelines, 2-9
- Harada, S., Haneda, E., Maekawa, T., Morikawa, Y., Funayama, S., Nagata, N., et al., 1999.** Casein kinase-II (CK-II)-mediated stimulation of HIV-1 reverse transcriptase activity and characterization of selective inhibitors in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22:1122- 1126.
- Harbone, J.B., 1976.** Phytochemical methods. A guide of modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall, London, 150p.
- Harrigan, P.R.; Hogg, R.S.; Dong, W.W.; Yip, B.; Wynhoven, B.; Woodward, J.; Brumme, C.J., Brumme, Z.L.; Mo, T., Alexander, C.S.; Montaner, J.S.,2005.** Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naive cohort initiating triple antiretroviral therapy. *Journal of. Infection*, 191, 339-347.
- Hasan C M., Healey T M., Waterman PG., Schwalbe C.H., 1982.** Chemical studies on the Annonaceae. Part 9 Indolosesquiterpenes and aporphine alkaloids from *Greenwayodendron (Polyalthia) suaveolens* stem bark. X-ray crystal structures of greenwayodendrin-3-one. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions1*, 12: 2807-2812.
- Hawley, R.S., Bray, G.P., MUNGTHIN, M., JILL, D., ATKINSON, P.M. O'NEILL, and STEPHEN, A.W., 1998.** Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerisation in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; 42: 682-686.
- Hobbs, C.V., De La Vega., Penzak, .S. R., Van Vliet, J., Krzych, U., Sinnis, P., Borkowsky, W., Duffy, P.E., 2013.** The effect of Antiretrovirals. on *Plasmodium falciparum* Liver stages. *AIDS*, 27(10): 1674-1677.
- Hochman, S., and Kim, K., 2009.** The impact of HIV and malaria coinfection: what is known and suggested venues for further study. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. New York, 10,(1155)ID 617954-617962.
- Hocquemiller R., Dubois G., Le boeuf M., Cave A., Kunesch N., Riche C., Chiaroni A.(1981).** Alkaloids of the Annonaceae. PartXXXI. Polyveoline, a new indolosesquiterpene isolated from *Polyalthia suaveolens*, Annonaceae. *Tetrahedron Letters*, 22: 5057-5060.

- Hoffmann,C., and Rockstroh, J.K., 2012.** HIV 2012/2013 by Medizin Fokus Verlag, Hamburg Layout and Printing: Schröders Agentur, Vopeliuspfad 6, 14169 Berlin Pictogram: Tobias Emskoetter, Hamburg ISBN: 978-3-941727-11-3: 2-287.
- Hoppe, H.C., van Schalkwyk, D.A., Wiehart, U.I.M., Meredith, S.A., Egan, J., Weber, B.W., 2004.** Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial. Agents Chemotherapy*, 48(7), 2370–2378.
- Hu, W.S., Hughes, S.H., 2011.** HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Meddoi*: 10/1101/cshperspect.a006882.
- Hufford, C.D., Oguntimein, B.O., 1982.** New dihydrochalcones and flavanones from *Uvaria angolensis*. *Journal of Natural Products*, 45 (3): 337-342.
- Hughes S.H., and Hu, W-S., 2011.** HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Meddoi*: 10/1101/cshperspect.a006882.
- Irvine, F.R., 1961.** Woody plants of Ghana with special reference to their uses. London: Oxford University Press. p 868.
- Ivanov,V.A., Valuev-Elliston,T.V., Ivanova,N.O., Kochetkov,N.S., Starodubova,S.E., Bartosch,B., and Isaguliants, G.M., 2016.** Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences, 10: 1-18.
- Jiofack T., Guedje N. Ayissi I., Fokunang C., L. Usongo and Nkongmeneck, B.A, (2010).** Upper Nyong valley forest in Cameroon: Ethnobotanical uses and implications for biodiversity conservation. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 2(11): 370-381.
- Jolad, S. D, Hoffman, J. J, Schram, K. H Cole, J. R.; Tempesta, M. S.; Kriek, G. R.; Bates, R.B.J.,1982.** Uvaricin, A New Antitumor Agent from *Uvaria acuminata* (Annonaceae), *Journal of Organic Chemistry*, 47: 3151-3153.
- Kaddouri, H.; Nakache, S.; Houzé, S.; Mentré, F.; Le Bras, J., 2006.** Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from Africa using *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase Immunodetection Assay and inhibitory Emax model for precise IC<sub>50</sub> measurement. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*. 50: 3343-3349.
- Kamkumo, G.R., Ngoutane,M.A.,Tchokouaha,Y.L.R., Fokou, T.V.P., Madiesse,A.K.E., Legac,J., Kezetas,B.J.J., Lenta, N.B., Boyom, F.F., Dimo,T., Mbacham, F.W., Gut,J. Rosenthal,J.P., 2012.** Compounds from *Sorindeia juglandifolia* (Anacardiaceae) exhibit potent anti-plasmodial activities in vitro and in vivo. *Malaria Journal*, 11(382):1-7.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R., 2009.** Antimalarials from nature. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (10)1-28.

- Khetarpal, V.K., Storbeck, L.S., Wells, D., Meacham, R.H. Jr., 1991.** Method for separation and determination of lactone and hydroxy acid forms of a new HMG CoA reductase inhibitor (RG 12561) in plasma. *Journal of Chromatography*, 567(2): 491-497.
- Kita, K., Miyadera, H., Saruta, F., Miyoshi, H., 2001.** Parasite Mitochondria as a Target for Chemotherapy. *Journal of Health Sciences*, 47: 219-239.
- Kitazato, K., Wang, Y., and Kobayashi, N., 2007.** Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. *Drug Discovery Therapy*, 1(1):14-22.
- Klarmann, G.J., Hawkins, M.E., Le Grice, S.T.J., 2002.** Uncovering the complexities of retroviral ribonuclease H reveals its potential as a therapeutic target. *AIDS Reviews*. 4, 183–194.
- Klumpp, K., and Mirzadegan, T., 2006.** *Current Pharmaceutical Design*, 12: 1909.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A., 1992.** Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256:1783–1790.
- Krishna S., Uhleman A.-C., Haynes R.K., 2004.** Artemisinin: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*, 7: 233-244.
- Krotoski, W.A., Garnham, P. C. C., Bray, R. S., Krotoski, D. M., Killick-Kendrick, R., Draper, C. C., Targett, G. A. T., and Guy, M.W., 1982.** Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 31:24-35.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, W.R., Sodroski, J., and Wayne, A.H., 1998.** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–659.
- Kyaw, M.T., Mallika I., Khin M.L., Aye, A. W., Tin, M.H., Thaung H., Khin L., Myat P.K., Katherine P., M Abul Faiz, M.D., Phaik Y. C, Sasithon Pukrittayakamee, Elizabeth A Ashley, Tim J C Anderson, Shalini Nair, Marina McDew-White, et al., 2015.** Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *The Lancet Infectious Diseases*, 15: 415–421.
- Lacroix, R., Mukabana, W.R., Gouagna, L.C., Koella, J.C., 2005.** Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biology*; 293:298.
- Lambros, C., and Vanderberg, J.P., 1979.** Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, 65: 418-420.

- Lamidi M., DiGiorgio C., Delmas F., Favel A., Eyele Mve-Mba C., Rondi ML., Ollivier E., Nze-Ekekang L., and Balansard G., 2005.** *In vitro* cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 185-190.
- Landgraf, B., Kollaritsch, H., Wiederman, G., Wernsdorfer, W.H., 1994.** Plasmodium falciparum: susceptibility in vitro and in vivo to chloroquine and sulphadoxine/pyrimethamine in Ghanaian schoolchildren. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 440–442.
- Le Bœuf, M., Cave, A., Bhaumik, B.K., and Mulker R., 1982.** The Phytochemistry of the Annonaceae, 21: 2783-2813.
- Le Nagard, H., Vincen, C., Mentré, F., Le Bras, J., 2011.** Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Computer. Methods and Programs in Biomedicine*, 104(1): 10-18.
- Le Thomas, A., (1969).** Flore du Gabon, Annonacées Labo.des phanerogamies, rue Buffon, Paris 5<sup>e</sup> 16 : 22-25,166-199.
- Letouzey, R., 1985.** Notice of phytographic map of Cameroon at 1/1.500.000. International Institute of Cartography, Toulouse.6 leaflets. p. 240.
- Le Ven, J.,2012.** Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonisme : identification et quantification d'acétogénines par dérégulation; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine, *Thèse de Doctorat, Chimie Pharmaceutique, Université Paris-Sud 11*, p43.
- 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 *Pawpaw Asimina tribola* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 45: 15-23.
- Lim, S.S., Kim, H.S., Lee, D.U., 2007.** *In vitro* Antimalarial activity of flavonoids and chalcones. *Bull Korean, Chemical Society*, 28(12): 2495-2496.
- Liu, S., Jiang, S., Wu, Z., Lv, L., Zhang, J., Zhu, Z., and Wu, S., 2002.** Identification of inhibitors of the HIV-1 gp41 six-helix bundle formation from extracts of Chinese medicinal herbs *Prunella vulgaris* and *Rhizoma cibotte*. *Life Sciences*, 71: 1779-1791.
- Liu, J.1., 2007.** The use of herbal medicines in early drug development for the treatment of HIV infections and AIDS. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16: 1355-1364.
- Loya, S., Tal, R. Kashman, Y., Hizi, A., 1990.** Illimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy*. 34, 2009–2012.

- Luciw, P.A., 1996.** Human immunodeficiency virus and their replication. In: Fields BN, Knippe DM, Howley PM (Ed.). Field virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1881-1952.
- Mabberley, D.J., 2008.** Plant-book. 3<sup>rd</sup>ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1021p.
- Macabeo, A.P.G., Martinez, F.P.A., Kurtán, T., Tóth, L., Mándi, A., Schmidt, S., Heilmann, J., Alejandro, G.J.D., Knorn, M., Dahse, H.M., Franzblau, S.G., 2014.** Tetrahydroxanthene-1,3(2 H)-dione derivatives from *Uvaria valderramensis*. Journal of Natural Product, 77: 2711–2715.
- Malvy, D., Djossou, F., Thiebaut, R., Le Bras, M., (2000).** Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris, Elsevier, 8 : 507 -520.
- Manu, S., Deshmukh, R., Prasad, K.M.N., Trivedi, V., 2013.** Screening and characterization of Antimalarial Heme Ploymerase Inhibitors from Garlic cloves. European Journal of Medicinal Plants, 3(3): 474-484.
- Mbacham, W., Evehe M., Mbulli A., Akaragwe I., Tawe B., Djoko C., Gang B., Masumbe, P., Atogho, B., Ebeng, R., 2005.** Therapeutic efficacy of Sulfadoxine-Pyrimethamine (Fansidar<sup>R</sup> and mutation rates to Antifolate genes in different regions in Cameroon. Acta Tropica, 95S: 337.
- Mbaveng, T.A., Kuete, V., Mapunya, M.B., Penlap, B.V., Nkengfack, A.E., Meyer, M.J.J., and Lall, N., 2011.** Evaluation of four Cameroonian medicinal plants for anticancer, antigonorrheal and antireverse transcriptase activities. Environmental Toxicology and Pharmacology, 32:162-167.
- McLaughlin, J.L., 2008.** Paw paw and cancer. Annonaceous acetogenins from discovery to commercial product. Journal of Natural Product, 71: 311-321.
- McWilliams, M.J., Julias, J.G., Sarafianos, S.G., Alvord, W.G., Arnold, E., Hughes, S.H., 2006.** Combining mutations in HIV-1 reverse transcriptase with mutations in the HIV-1 polypurine tract affects RNase H cleavages involved in PPT utilization. Virology, 348, 378-388.
- Mehellou, Y., De Clercq E., 2010.** Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go?Journal of Medicinal Chemistry. 28; 53(2):521-538.
- Meleddu, R., Cannas, V., Distinto, S., Sarais, G., DelVecchio, C., Esposito, F., Bianco, G., Corona, A., Cottiglia, F., Alcaro, S., Parolin, C., Artese, A., Scalise, D., Fresta, M., Arridu, A., Ortuso, F., Maccioni, E., Tramontano, E., 2014.** Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-diarylpropenones as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, Chem Med Chem 9: 1869-1879.

- Meleddu,R., Distinto,S., Corona, A., Bianco, G., Cannas,V., Esposito, F., Artese, A., Alcaro,S., Matyus,P., Bogdan,D., Cottiglia,F., Tramontano,E., Maccioni,E., 2015.** (3Z)-3-(2-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]hydrazin-1-ylidene)-2,3-dihydro-1H-indol-2-one derivatives as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 93: 452-460.
- Ménard, R., 2005.** Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature*, 433(7022):113-114.
- Metherel, A.H., Taha, A.Y., Izadi ,H., Stark, K.D.,2009.** The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples [flaxseed]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 81: 417-423.
- Mishra, L.C., Bhattacharya, A., Sharma, M., Bhasin, V.K., 2010.** HIV proteases inhibitors, indinavir or nelfinavir, augment antimalarial action of artemisinin in vitro. *The American Journal of Tropical and Medicine and Hygiene*, 82 (1): 148-150.
- Mohanty, P., Gupta, A., and Bhatnagar, S., 2015.** Modeling of *Plasmodium falciparum* Telomerase Reverse Transcriptase Ternary Complex: Repurposing of Nucleoside Analog Inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies*, 13 (10):628-637.
- Montagnier, L., 2010.** 25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. *Virology*, 397, 248-254.
- Montagnier, L., Gruet J., Chamaret, S., Dauguet, C., Axler, C., Guetard, D., Nugeyre, M.T., Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Bruner, J.B., Klatzman, D., Gluckman, J.C., 1984.** Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV - transformed B lymphoblastoïde cell Lines. *Science* 225; 63-66.
- Montaner, J., Guillemi, S., and Harris, M., 2013.** Therapeutic guidelines antiretroviral (ARV) treatment of adult HIV infection. *Providence health Care*. 308(4), 1-23.
- Morré, D.J., De Cabo, 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.
- Mouchet, J., 2004.** *Biodiversité du Paludisme dans le monde* John Libbey Eurotex.
- Moura, P.A., Dame, J.B., Fidock, D.A., 2009.** Role of *Plasmodium falciparum* digestive vacuole plasmepsins in the specificity and antimalarial mode of action of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrobial and. Agents Chemotherapy*. 53, 4968–4978.
- MSP, 2007.** Ministère de la Santé Publique du Cameroun. Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Cameroun 2007-2010. The Global Fund Draft, non publié:145.
- Mueller, I., Zimmerman, P.A., and Reeder, J.C., 2007.** *Plasmodium malariae* and *plasmodium ovale*, the bashful malaria parasites. *Trends in parasitology*. 23: 278-283.

- Muhammad, I., Waterman, P.G., 1985.** Chemistry of the *Annonaceae*, 18. Benzylated indoles and dihydrochalcones in *Uvaria angolensis* from Tanzania. *Journal of Natural Products*, 48(4): 571p.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Boudy, G., Callapa, J., Bergeron, G., Rojas, I., Bravo, J.A., Balderrama L., Ortiz R., 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: 131 p
- Muthaura, C.N., Keriko, J.M., Mutai, C., Yenesew, A., Gathirwa, J.W., Irungu, B.N., Nyangacha, R., Mungai, G.M., Dereese, S., 2015.** Antiplasmodial potential of traditional antimalarial phytotherapyremedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology* 170, 148–157.
- Nair, S.C., Striepen, B., 2011.** What do human parasites do with achloroplast anyway? *PLoS Biol* 9: e1001137.
- Naoto, K., and Tetsuaki, T., 2009.** Medicinal Chemistry of *Annonaceous* Acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules*, 17: 3621-3661.
- Ndoye, F.C., 2001.** Étude chimique et évaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des huiles essentielles d'espèces aromatiques tropicales en provenance de la province EST du Cameroun. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier II. France,:123-128.
- Newman, D.J., Cragg G.M., Snader K.M., (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037.
- Ngantchou, I., Nyasse, B., Denier, C., Blonski, C., Hannaert, V., Schneider, B., 2010.** Antitrypanosomal alkaloids from *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae): Their effects on three selected glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* ,(20): 3495–3498.
- Ngouana, K.T., Jiatsa M.C.D., Toghueo K.M.R., Tchuemogne, T.A.M., Zeuko'o, M.E., Ngouana, V., Mallié, M., Bertout, S., Boyom, F.F., 2015.** Potent and Synergistic Extract Combinations from *Terminalia Catappa*, *Terminalia Mantaly* and *Monodora tenuifolia* Against Pathogenic Yeasts. *Medicines* 2, 220-235.
- Nicolas, X., Granier, H., Martin, J., and Klotz, F., 2000.** Epidemiological and therapeutic aspects of plasmodial infection from *Plasmodium vivax*. *Medecine Tropicale*; 60 (4):402-428.
- Njoku, U.O., Akah P.A., and Okonkwo, C.C., 2012.** Antioxidant activity of seed extracts of *Monodora tenuifolia* (Annonaceae). *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 12: 80-87.

- Nolan, D.; Reiss, P.; Mallal, S., 2005.** Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection: a review of selected topics. *Expert. Opinion on. Drug Safety*, 4, 201-218.
- Noranate, N., Durand, R., Tall, A., Marrama, L., Spiegel, A., Sokhna, C., Pradines, B., Cojean, S., Guillotte, M., Bischoff, E., Ekalla, M.T., Bouchie, C., Fandeur, T., 2007.** Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PlosOne*, 139.
- Nosny, P., 1980.** [Alphonse Laveran and the discovery of the malarial parasite]. *Bulletin de l'Académie Nationale de Medecine* 164: 80-87.
- Nsanzabana, C., and Rosenthal, P., 2011.** *In vitro* activity of Antiretroviral Drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3: 5073-5077.
- Ntie-Kang, F., Onguéné, P., Lifongo, L.L., Ndom, J., Sippl, W., Mbaze, L., Nogueira, C., Lopes, L., White, N., Vogel, G., et al., 2014.** The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. *Malaria Journal*. 13:81-84.
- Nyasse, B., Ngantchou, I., Nono, J.J., Schneider B., 2006.** Antifilarial activity *in vitro* of polycarpol and 3-*O*-acetyl aleuritolic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. *Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products*, 20: 391-397.
- Nyegue, M., Amvam, Z.P.H, Etoa , X.F., Agnanié, H., and Menut ,C., 2008.** Chemical and Biological Investigations of Essential Oils from Stem Barks of *Enantia chlorantha* Oliv. And *Polyalthia suaveolens* Engler. & Diels. From Cameroon *Natural Product Communication Vol 3; No 7*, 1089-1096. of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Product*, 66 :1022-1037.
- Oberlies, N.H., Croy, V.L., Harrison, M., McLaughlin, J.L., 1997.** “Structure-activity Relationships of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/ADR) cells.” *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(13): 2102-2106.
- OCDE, 2001.** (Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). The OECD Guideline for Testing of Chemical. The Organization of Economic Co-Operation Development, Paris, 1-14.
- Odebeyi, O.O., Sofowora, E.A., 1978.** Phytochemical screening: Nigeria medical plants. *L. Coydia*, (41): 234-325.
- Ogutimein, B., Ekundayo, O., Laasko, I., Hitunem, R., 1989.** Constituents of the essential oil of *Monodora tenuifolia*. *Flav Frag* 4:193-195.

- Oloyede, O.I., 2005.** Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4: 379 – 381.
- OMS, 2017.** World malaria report 2017. ISBN 978-92-4-1565526.p1
- OMS, 2016.** World malaria report 2016. ISBN 978-92-4-151171-1p1
- OMS, 2014.** Rapport mondial du paludisme. [www.who.int/malaria](http://www.who.int/malaria) ISBN 978 92 4 156483 0.
- OMS, 2013.** Rapport mondial sur le paludisme 2013. Genève, World Health Organization, [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2013/en/)
- OMS, 2009** Paludisme : aide- mémoire N° 94, Organisation Mondiale de la Santé.
- OMS, 2009.** WHO Cameroon, (2009) en ligne) <http://www.afro.who.int/omscam.palud.html>, page consultée le 4 juin 2009.p2
- OMS, 2006.** Directives pour le traitement du paludisme/ organisation mondiale de la santé WHO/HTM/MAL/1108.OMS, 2000. La situation actuelle du paludisme dans le monde. Comité OMS expert du paludisme. p.3 Genève.
- OMS, 2005** Paludisme et VIH:interactions et répercussions sur les politiques de santé publique. ISBN 92 4 259335 4 (Classification NLM: WC 503.5).
- OMS, 2004.** WHO Malaria and HIV/AIDS and implications: conclusions of a technical consultation convened by WHO 23-25 June 2004 [http://www.who.int/malaria\\_hiv\\_flyer.pdf](http://www.who.int/malaria_hiv_flyer.pdf).
- OMS, 2001.** Les Combinaisons Thérapeutiques Antipaludiques, Rapport d'une consultation technique de l'OMS. WHO/CDS/RBM/ 35. <http://www.rbm.who.int>.
- Ondo, J., Lekana-Douki, J., Bongui, J., Zang, E.E, Zatra, R., Toure-Ndouo, F., Elomri, A., Lebibi, J., Seguin, E., 2012.** *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts and fractions of *Vitex madiensis*, medicinal plant of Gabon. *Tropical Med Int Health*. 3:316–321.
- O'Neill, P.M., Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A., Park, K.B., 1998.** 4-Aminoquinolines Past, present, and future; A chemical perspective. *Pharmacology and Therapeutics*, 77 (1): 29-58.
- ONUSIDA, 2004.** WHO/HIV2004.08 Malaria and hiv/aids interactions and implications: conclusions of a technical consultation convened by who, 23 – 25 June, 2004.
- ONUSIDA, 2017.** Global- AIDS monitoring 2017: indicators for monitoring the 2016. United Nations Political Declaration on HIV and AIDS Geneva. UNAIDS, 2017 ([http://www.unaids.org/sites/files/media\\_asset/2017-Global-AIDS-Monitoring\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/files/media_asset/2017-Global-AIDS-Monitoring_en.pdf)).
- Pages, F., Orlandi-Pradinesb, E., Corbelc, V., 2007.** Vecteurs du paludisme:biologie, diversité, contrôle et protection individuelle ; Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection. *Médecine et Maladies infectieuses* 37, 153–161.

- Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., and et al.1984.** Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224, 500-503.
- Parikh, S., Gut, J., Istvan, E., Goldberg, D.E., Havlir, D.E., Rosenthal, P.J., 2005.** Antimalarial activity of human immunodeficiencyvirus type 1 protease inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:2983-2985.
- Parniak, M.A., and Sluis-Cremer, N., 2000.** Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Advance.Pharmacology*. 49, 67–109.
- Picot, S., 2006.** Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Medecine et Maladies Infectieuses*; 36(8):406-413.
- Pimenta, S. P. L., Garcia, M.G., Geraldo do Vale Gonc alves. S., Dion' sio,L. B.,Braga, M. E. and Mosqueira, F.C.V, 2014.** *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoidsenriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research*.10:1-6.
- Portet, B., 2007.** Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var.berbicense. *Thèse de Doctorat (Chimie) Université de Toulouse III- Paul Sabatier/* 45-62.
- Pradines, B., Dormoi,J., Briolant, S., Bogreau,H., Rogier, C.,2010.** La résistance aux antipaludiques. *Revue francophone des laboratoires*, Elsevier Masson SAS, 422 :51-62.
- 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(4): 350-356.
- Rasoanaivo, P., Wright, C.W., Willcox, M.L.; Gilbert, B., 2011.** Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria Journal*, 10(Suppl. 1): S4.
- Rénia, L., Potter, S.M., 2006.** Co-infection of malaria with HIV: an immunological perspective. *Parasite Immunology*, 28: 589-595.
- Reshef, V., Mizrachi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., Carmeli, S. 1997.** New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *Journal of Natural Products*, 60: 1251–1260.
- Reutrakul, V., Chanakul, W., Pohmakotr, Met al., 2006.** Anti-HIV-1 constituents from leaves and twigs of *Cratoxylum arborescens*.*Planta Medica*, 72: 1433–1435.
- Rich, S.M., and Ayala, F.J., 2003.** Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Advances in Parasitology*, 54:255-280.

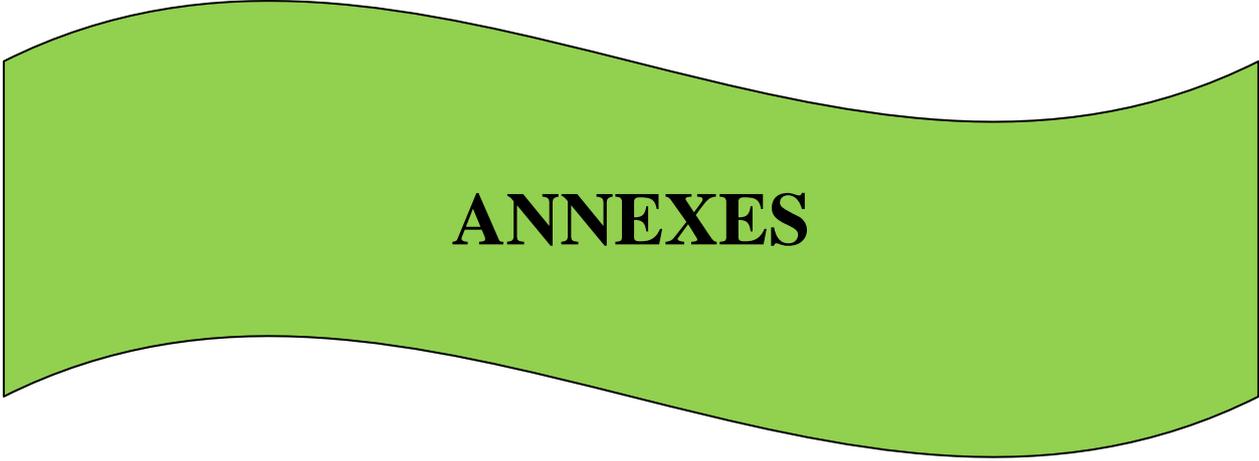
- Ripert, C., Pajot, F-X., Vincendeau, P., Esquerdo, Gomez, F., 1996.** Epidémiologie des maladies parasitaires-Tome 1-Protozooses. Editions Médicales Internationales© Technique and Documentation ISBN, 2-7430-0076-7.
- Roetynck, S., Baratin, M., Vivier, E., Ugolini, S., 2006.** Cellules natural killer et immunité innée contre le paludisme. Médecine/Sciences, 22 : 739-744.
- Rosandy, A.R., Din, L.B., Yaacob, W.A., Yusoff, N.I., Sahidin, I., Latip, J., Nataqain, S., Noor, M.N., 2013.** Isolation and characterization of compounds from the stem bark of *Uvaria rufa* (ANNONACEAE). The Malaysian Journal of Analytical Sciences, 17 (1): 50-58.
- Rosta, E., Nowotny, M., Yang, W., and Hummer, G.,2011.** “Catalyticmechanism of RNA backbone cleavage by ribonucleaseH from quantum mechanics/molecular mechanics simulations,”Journal of the American Chemical Society, 133, (23), 8934–8941.
- Roumy,V., 2007.** Etude phytochimique des plantes amazoniennes d’activité antiplasmodiale, dont *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapira guianensis* Aubl. *Thèse de Doctorat de l’Insitut National Polytechnique de Toulouse* ; spécialité : Sciences des Agronomes, Pharmacognosie : 1-16.
- Savarino, A., Lucia, M.B., Rastrelli, E., Rutella, S., Golotta, C., Morra, E., Tamburrini, E., Perno, C.F., Boelaert, J.R., Sperber, K., Cauda, R., 2004.** Anti HIV effects of chloroquine inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 35: 223-232.
- Schrumpf, D., Calmy, A., Chappuis,F., 2015.** Paludismeet VIH : quelles interactions ? Revue Médicale Suisse – www.revmed.ch. 1033-1037.
- Schultz, S.J., Champoux, J.J., 2008.** RNase H activity: Structure, specificity, and function in reverse transcription. Virus Research Journal, 134, 86- 103.
- Shanks, G.D., Biomndo, K., Hay, S.I., Snow, R.W., 2000.** Changing patterns of clinical malaria since 1965 in a highland area of Kenya: possible role of drug resistance.Trans. Royal. Society of. Tropical. Medicine and. Hygiene, 94:253–255.
- Shaw-Reid, C.A., Feuston, B., Munshi, V., Getty, K., Krueger, J., Hazuda, D.J., Parniak,M.A., Miller, M.D., Lewis, L., 2005.** Biochemistry, 44: 1595-1606. Shedding in HIV-Infected Adults: A Review of the Literature. Clinical Infectious Diseases. 52:
- Shenai, B.R., Sijwali, P.S., Singh, A. and Rosenthal, P.J., 2000.** Characterization of native and recombinant falcipain–2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. Journal of. Biological. Chemistry. 275, 29000–29010.

- Sherman, I.W., 1998.** Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection, édition n° 1. Édité par ASM Press, Washington, DC, USA. 590 pages.
- Singh A., and 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., Kim, S. L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh J., Alan, T., David, J. C., 2004.** A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. The Lancet. 363:1017-1024.
- Sirawaraporn, W., Sathitkul, T., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D.V., 1997.** Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America, 94:1124-1129.
- Skinner, T.S., Manning, L.S., Johnston, W.A., Davis, T.M.E., 1996.** *In vitro* stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. International Journal of Parasitology. 26(5): 519-525.
- Slusker, L., Marston, J.B., 2007.** HIV and Malaria: Interaction and implications. Current Opinion in Infectious Diseases, 20:3-10.
- Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J.X., Wilairat, P., Riscoe, M., 2004.** Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 1803–1806.
- Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor A.M., Myint, H.Y., Hay S.I., 2005.** The global identification of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 434 (7030): 214-217.
- Sofowara, A., 1993.** Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. 2<sup>nd</sup> ed. Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria, Pp:97-145.
- Somsak, V., Polwiang, N., and Chachiyo S., 2016.** In Vivo Antimalarial Activity of *Annona muricata* Leaf Extract in Mice Infected with *Plasmodium berghei*. Journal of Pathogens, 10:1-14.
- Spence, R.A., Kati, W.M., Anderson, K.S., Johnson, K.A., 1995.** Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. Science, 267:988–993.
- Spurr, I.B., and Brown, R.C.D., 2010.** Total Synthesis of Annonaceous Acetogenin Belonging to the Non-Adjacent Bis-THF and Non-Adjacent THF-THP subclasses. Molecules, 15: 460-561.
- Stalikas, C.D., 2007.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Review. Journal of Separation Science, 30: 3268 – 3295

- Staszewski, S., Miller, V., Rehmet, S., Stark, T., De, C.J., De, B.M., Peeters, M., Andries, K., Moeremans, M., De, R.M., et al., 1996.** Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with zidovudine, lamivudine and zalcitabine in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 10:1–7
- Steltz, T.A., 1998.** “A mechanism for all polymerases” *Nature*, 391, (6664), 231–232.
- Sunita, K., Kumari, S.D., Satish, P.V.V., Somaiah, K., Rekha, N.S., Brahmam, P., 2016.** Antimalarial activity of *Polyalthia longifolia* (False Ashoka) against chloroquine sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. *World Journal of. Pharmaceutical. Sciences.*, 4(6): 495-501.
- Sutton, M.D., Walker, G.C., 2001.** Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair and DNA recombination, *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 17:8342-8349.
- Taiye, R.F., Faderera A. A., Joseph A. A., Iheanyi O. O., 2011.** Antiviral Potentials of *Enantia chlorantha* Extracts on Yellow Fever Virus. *Nature and Science*, 9(9): 99-105.
- Talarmin F., Sicard J. M., Mounem M., Verrot D. et Husser J. A., (2002).** Paludisme d'Importation en Moselle: A propos de 75 cas en 3 ans. *Revue de Med.ecine Interne*, 22 : 42-246.
- Tarrago-Litvak, L., Andreaola, M.L., Fournier, M., Nevinsky, G.A., Parissi, V., de Soultrait, V.R., Litvak, S, 2002.** Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase: classical and emerging therapeutical approaches. *Current. Pharmaceutical Design* 8, 595–614.
- Tasdemir, D., Lack, G., Brun, R., Ruedi, P., Scapozza, L., Perozzo,R., 2006.** Inhibition of *plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *Journal of Medicinal. Chemistry*. 49 (11), 3345–3353.
- Tekwani, B.L., and Walker, L.A., 2005.** Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay. *Combinatorial. Chemistry and High Throughput Screening*. 8, 63–79.
- Telesnitsky, A., Goff, S. 1997.** *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 121-160.
- Ting, W., 2010.** Effects of traditional chinese medicinal herbal extracts on HIV -1 replication. Master Thesis of Science in the Department of Microbiology and Immunology, Indiana University. p18.
- Titanji, V.P., Ayafor J.F., Kimbu S.F., and Evehe M.S., 1990.** Novel *Onchocerca volvulus* filaricides from *Carapa procera*, *Polyalthia suaveolens* and *Pachypodanthium staudtii*. *Acta Leidensia*, 59: 377-382.

- Trager, W., and Jensen, J.B., 1976.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673–675.
- Tramontano, E., and Di Santo, R., 2010.** “HIV-1 RT-associated RnaseH function inhibitors: recent advances in drug development,” *Current Medicinal Chemistry*, 17, (26), 2837–2853.
- Tramontano, E., Esposito, F., Badas, R., Di Santo R., Costi, R., La Colla, P., 2005.** 6-[1-(4-Fluorophenyl) methyl-1H-pyrrol-2-yl)]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester a novel diketo acid derivative which selectively inhibits the HIV-1 viral replication in cell culture and the ribonuclease H activity in vitro. *Antiviral Research*, 65: 117–124.
- Trease, G.E., and Evans W.C., 1996.** A textbook of Pharmacognosy. 14<sup>th</sup>Edn, Bailliere Tindall Ltd, London, pp 60-75.
- Troupin, G., 1982.** Flore des plantes ligneuses du Rwanda. Musée Royal de l’Afrique Centrale, Tervuren (Belgique), 107p.
- Tsabang, N., Tsouh F.P.V., Tchokouaha, L.R.Y., Noguema B., Bakarnga-Via I., Dongmo, N.M.S., Nkongmeneck, B.A., 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.
- Vasuvat, J., Montree, A., Monsoom, S., Leartsakulpanich, U., Petmitr, S., Focher, F., Wright, E.G., Chavalitshewinkoon-Petmitr, 2016.** Biochemical and functional characterization of *Plasmodium falciparum* DNA polymerase  $\delta$ . *Malaria Journal*, 15:1-10.
- Van der Veen L.J., 1996.** “Maladies et remèdes en Afrique Centrale : perception, dénomination et classification”, in Actes du 3ème Colloque Européen d’Ethnopharmacologie et de la 1ère Conférence Internationale d’Anthropologie et d’Histoire de la Santé et des Maladies, Université de Genova, Italie.
- Vial, H.J., and Calas, M., 2001.** Inhibitors of phospholipid metabolism. Antimalarial chemotherapy, mechanisms of action, modes of resistance, and new directions in drug development. , Totowa ,Humana Press, 347-365.
- Villo, P., 2008.** Synthesis of Acetogenin Analogue. Master Thesis in organic chemistry University of Tartu: 8-9.
- Vlietinck, A., J., De Bruyne, T., Apers, S., and Pieters, L.A, 1997.** Plant-Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Planta Medica* 64, 97-109.
- Vo, T.S., Ngo, D.H., Ta, Q.V., Kim, S.K., 2011.** Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *European. Journal of. Pharmaceutical. Sciences*, 44: 11–20.

- Vrancheva, Z.R., Ivanov, G.I., Aneva, I.Y., Dincheva, I.N., Badjakov, I.K., Pavlov, A.I., 2014.** GC-MS based metabolite profiling of five Bulgarian *Fumaria* species. *J. BioSci. Biotech*, 3(3): 195-201.
- Wang, T., Chen, G., Ying Liu, Y., Song, X., Han, C., and He, J.J., 2015.** Inhibition of HIV-1 Replication by Traditional Chinese Medicinal Herbal Extracts. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*, 7(3): 76-82.
- Wang, Q., Ding, ZH., Liub, J-K., Zheng, Y-T., 2004.** Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antiviral Research*: 64, 189–194.
- White, N.J., 2008.** *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* ;46(2):172-173.
- Yamthe, T.L.R., Tsouh, V.F., Mbouna, J.D.C., Keumoe, R., Bruno Lenta Ndjakou, Djouonzo, T.P., Ngoutane, M.A., Legac, J., Tsabang, N., Jiri Gut, Rosenthal, J.P., and Boyom, F.F., 2015.** Extracts from *Annona Muricata* L. and *Annona Reticulata* L. (Annonaceae) Potently and Selectively Inhibit *Plasmodium Falciparum*. *Medicines* , 2, 55-66; doi:10.3390/medicines2020055
- Zucker, J.R., Campbell, C.C. 1993.** Malaria. Principles of prevention and treatment. *Infect. Dis.*, 7 (3): 547-567.



**ANNEXES**

## ANNEXES

### **Annexe 1: Composition du milieu de culture RPMI 1640**

Le milieu de culture est constitué tel qu'il suit:

Dans une bouteille stérile en verre, les constituants suivants sont additionnés :

- 1000 ml de RPMI 1640 contenant HEPES 25 mM
- 5 ml de tampon HEPES 1M
- 0,5 ml de gentamycine (50mg/ml)
- 10 ml de L- glutamine (100×)
- 100 ml de sérum inactivé préparé précédemment

Ce mélange est bien homogénéisé, filtré à 0,45 $\mu$ m, ensuite à 0,22  $\mu$ m et conservé à 4°C.

**Annexe 2: Préparation des réactifs et de la solution du mélange réactionnel nécessaires pour les tests enzymatiques Transcriptase inverse VIH1**

**Réactifs :**

- Solution 1 M KCl (Sigma-Aldrich, catalogue numéro: 60142-100ML-F)
- Solution 1 M MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, catalogue numéro: 63069-100ML)
- Solution 1M Dithiothreitol (DTT) (Life Technologies, Invitrogen™, catalogue numéro P2375)
- Solution 1M Tris-HCl (pH 7.8) préparée à partir d'une solution de base Trizma®(Sigma-Aldrich, catalogue numéro 93352)
- Solution 1M Tris-HCl (pH 8.1) préparée à partir d'une solution de base Trizma®(Sigma-Aldrich, catalogue numéro 93352)

Mélange réactionnel		H <sub>2</sub> O
1000 mM Tris HCl pH7.8	50	+205 µl
1000 mM MgCl <sub>2</sub>	6	+24,6 µl
1000 mM KCl	80	+ 328 µl
100 mM DTT	1	+ 41 µl
50 uM ARN/ADN	0,25	+20,5 µl
	H <sub>2</sub> O	+ 2660,9 µl =
	<b>Volume total</b>	<b>3280 µl</b>

➤ **Préparation du tampon de dilution d'enzyme transcriptase inverse(dEb)**

20mM Tris Hcl pH 7,8  
2mM DTT, 20% Glycérol

➤ **Préparation de la solution enzymatique**

Prendre un volume enzymatique de 1,52 µl et ajouter un volume de 998,47 µl tampon pour un volume final de 1000 µl

➤ **Solution de PICOGREEN**

TE20X	807,5 µl
PICOGREEN	28,5 µl
H2O	15343 µl
Total	16150 µl

**Annexe 3: Pourcentages d'inhibition des extraits bruts actifs de *M. tenuifolia* et *U. angolensis*, fractions aqueuses, au chlorure de méthylène, hexanique et le résidu 4 solide sur l'activité de ARNase H et ADN polymérase**

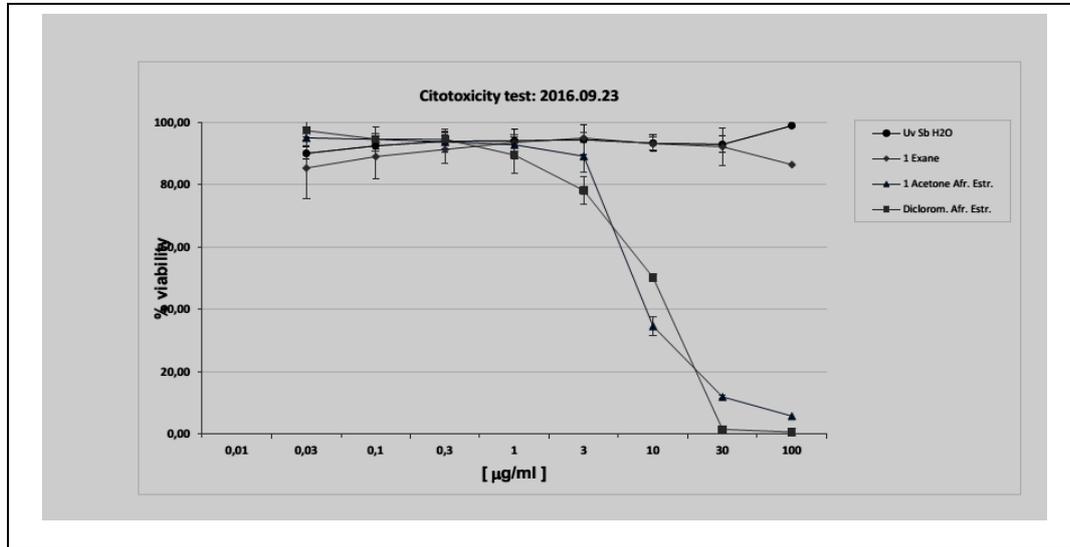
Extraits	ARNase H				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
<b>UvAbrH<sub>2</sub>O</b>	0,41	99,6	99,6	99,6	0,023
	1,23	98,3	98,3	98,3	0,024
	3,70	96,4	96,4	96,4	0
	11,11	85,4	85,4	85,4	0
	33,33	67,6	76,1	71,9	6,001
	100,00	28,8	37,61	33,2	6,223
<b>UvAecH<sub>2</sub>O</b>	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	Ecart type
	0,41	94,7	94,7	94,7	0
	1,23	58,1	72,6	65,35	10,25
	3,70	11,5	24,7	18,1	9,334
	11,11	1,5	1,95	1,725	0,31819805
	33,33	0,8	0,6	0,7	0,14142136
	100,00	0,9	0,7	0,8	0,14142136
<b>UvAfMeOH</b>	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	Ecart type
	0,41	86,76	86,76	86,76	0
	1,23	88,08	88,08	88,08	0
	3,70	83,83	83,83	83,83	0
	11,11	74,46	91,47	82,965	12,0278863
	33,33	51,65	67,34	59,495	11,0945054
	100,00	26,78	34,34	30,56	5,34572727
<b>UvAbrMeOH</b>	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	Ecart type
	0,41	100	100	100	0
	1,23	70,81	86,16	78,485	10,8540891
	3,70	35,72	54,67	45,195	13,3996735
	11,11	19,8	5,15	12,475	10,3591143
	33,33	2,26	2,26	2,26	0
	100,00	3,15	3,15	3,15	0
<b>UvAecMeOH</b>	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,41	84,88	68,78	76,83	11,3844192
	1,23	45,19	30,57	37,88	10,3379011
	3,70	6,38	4,97	5,675	0,99702056
	11,11	1,95	1,18	1,565	0,54447222
	33,33	1,63	1,63	1,63	0
100,00	3,98	3,98	3,98	0	
<b>RDS 1643( µM)</b>	0 ;02	83,79	81,15	82,47	1,87
	0,07	61,92	65,12	63,52	2,26
	0,20	34,73	35,98	35,35	0,88

<b>UvAecMeOH</b>	<b>ADN Polymerase</b>				
	Conc(µg/ml)	% Activité 1	% Activité 2	Moyenne	Ecart type
	0,41	92,8	92,8	92,8	0,0
	1,23	92	92	92	0
	3,70	91,5	91,5	91,5	0
	11,11	70,88	83,3	83,3	8,284
	33,33	63,57	66,5	66,5	1,98
	100,00	34,3	34,3	38,3	3,55
<b>UvAecH2O</b>	Conc(µg/ml)	% Activité 1	% Activité 2	Moyenne	Ecart type
	0,41	83,75	83,75	83,75	0
	1,23	77,49	76,515	76,515	0,65
	3,70	45,54	48,455	48,455	1,943
	11,11	47,08	47,08	47,08	0
	33,33	47,05	47,05	47,05	
	100,00	45	45	45	0
	<b>UvAfMeOH</b>	Conc(µg/ml)	% Activité 1	% Activité 2	Moyenne
0,41		89	89	89	0
1,23		88,9	88,9	88,9	0
3,70		88,8	88,8	88,8	0
11,11		88,72	88,72	88,72	0
33,33		51,89	57,34	54,615	2,725
100,00		37,77	31,63	34,7	3,07
Conc(µg/ml)		% Activité 1	% Activité 2	Moyenne	Ecart type
<b>UvAbrMeOH</b>	0,41	64,44	78,52	71,48	7,04
	1,23	44,18	39,56	41,87	2,31
	3,70	38,41	30,38	34,395	4,015
	11,11	24,7	15,41	20,055	4,645
	33,33	7,18	7,18	7,18	0
	100,00	6,35	6,35	6,35	0
	Conc(µg/ml)	% Activité 1	% Activité 2	Moyenne	Ecart type
<b>UvAbrH<sub>2</sub>O</b>	0,41	57,57	54,88	56,225	1,345
	1,23	37,85	28,51	33,18	4,67
	3,70	20,3	12,47	16,385	3,915
	11,11	12,3	12,3	12,3	0
	33,33	12	12	12	0
	100,00	11,6	11,6	11,6	0
	<b>Efavirenz</b>	Conc (nM)	% Activité 1	% Activité 2	Moyenne
3,7		86,26	90,74	88,5	2,24
11,11		45,4	50,6	48	2,6
33		21	26,73	23,865	2,865

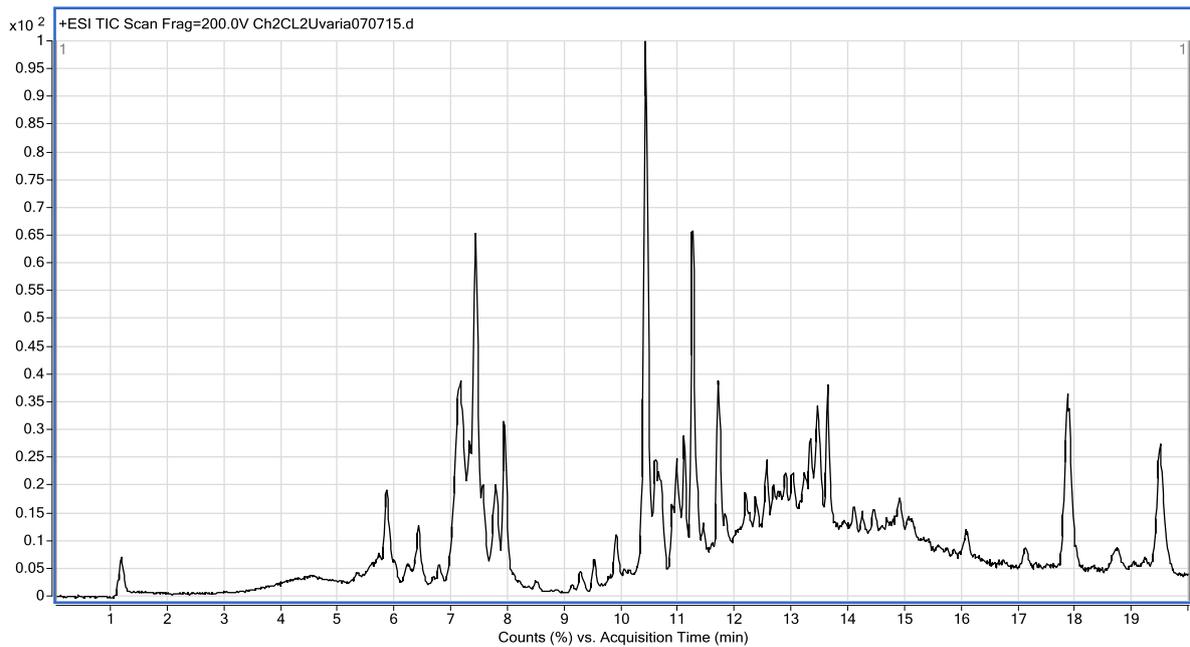
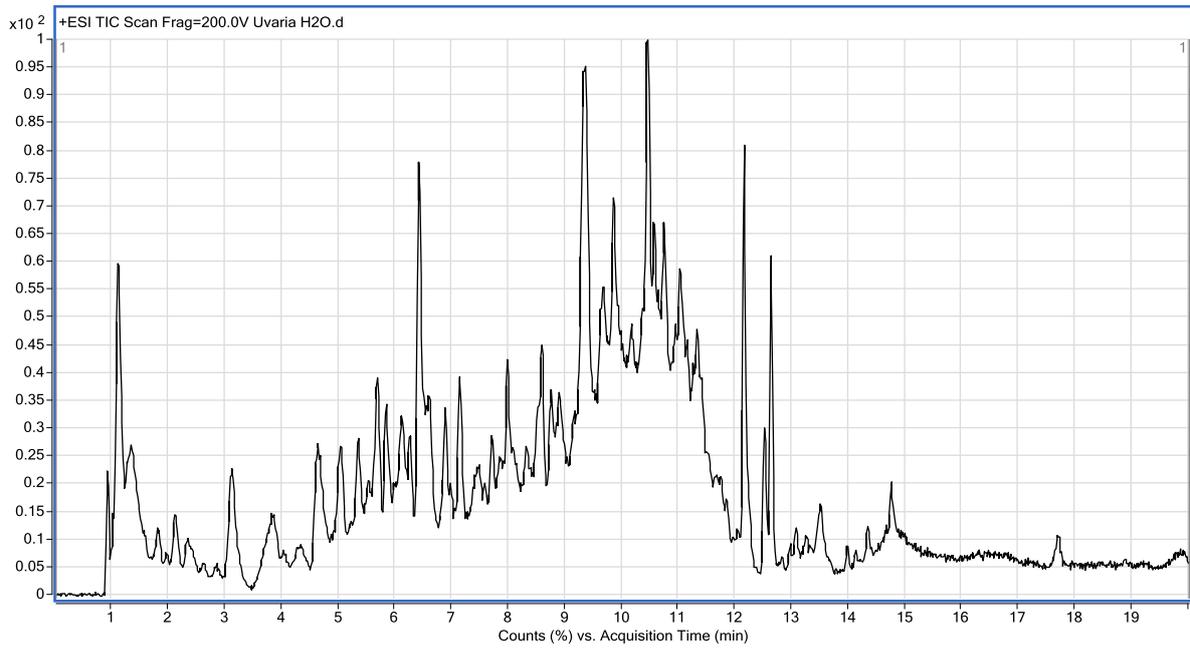
ARNaseH	<b>Fhexane</b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,1	98,6726	98,6726	98,6726	0
	0,39	93,9023	93,9023	93,9023	0
	1,56	88,8352	88,8352	88,8352	0
	6,25	51,1547	49,57625	50,36548	1,116133
	25	27,7611	22,67314	25,21712	3,597731
	100	5,62139	3,754095	4,687743	1,320377
	<b>Résidu 4 solide</b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,006	88,65439	88,65439	88,65439	0
	0,024	77,96421	77,96421	77,96421	0
	0,1	83,9004	70,35048	77,12544	9,58124
	0,39	20,0165	20,0165	20,0165	0
	1,56	5,30777	5,30777	5,30777	0
	6,25	1,40704	1,40704	1,40704	0
	25	1,54944	1,54944	1,54944	0
	100	1,5445	1,5445	1,5445	0
	<b>FCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
0,1	76,6301	69,02335	72,82673	5,378785	
0,39	42,552	31,61526	37,08363	7,733443	
1,56	9,39667	7,315135	8,355903	1,471868	
6,25	6,40007	6,40007	6,40007	0	
25	2,1682	2,1682	2,1682	0	
100	1,631	1,631	1,631	0	
<b>FH<sub>2</sub>O</b>					
Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET	
0,1	91,6629	91,6629	91,6629	0	
0,39	75,787	77,30837	76,54769	1,075771	
1,56	28,1798	16,57635	22,37808	8,204878	
6,25	7,45732	4,743951	6,100636	1,918642	
25	3,538	3,538	3,538	0	
100	0,476	0,476	0,476	0	
Conc (nM)	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET	
<b>RDS 1643</b>	3	55,31709	68,94515	62,13112	9,636494
	10	27,16608	24,60534	25,88571	1,810717
	30	21,32601	20,80778	21,0669	0,366444

RDDP	<b>Fhexane</b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,1	98,6726	98,67263	98,67262	2,12132
	0,39	93,9023	93,90225	93,90228	3,53553
	1,56	88,8352	88,8352	88,8352	0
	6,25	64,9839	72,81309	68,8985	5,53607334
	25	41,35491	54,94861	48,15176	9,612197451
	100	36,9656	44,8017	40,88365	5,540959448
	<b>Résidu 4 solide</b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,1	52,3296	59,92463	56,12712	5,370497216
	0,39	40,6927	40,4071	40,5499	0,201949697
	1,56	40,3654	36,544	38,4547	2,702137854
	6,25	35,30777	35,30777	35,30777	0
	25	32,0105	32,0105	32,0105	0
	100	29,9004	29,9004	29,9004	0
	<b>FCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,1	76,6301	62,7203	69,6752	9,835713905
	0,39	62,552	62,552	62,552	0
	1,56	35,06281	35,06281	35,06281	0
	6,25	34,0007	34,0007	34,0007	0
	25	32,1682	32,1682	32,1682	0
	100	31,1631	31,1631	31,1631	0
	<b>FH<sub>2</sub>O</b>				
	Conc µg/ml	% Activité1	% Activité2	Moyenne	ET
	0,1	91,6629	91,6629	91,6629	0
0,39	75,787	75,787	75,787	0	
1,56	68,1798	68,1798	68,1798	0	
6,25	58,78188	58,78188	58,78188	0	
25	43,01485	43,01485	43,01485	0	
100	42,02132	42,02132	42,02132	0	
Efavirenz	Conc nM	% Activité1	% Activité1	Moyenne	ET
	3	75,41923	74	74,70962	1,003547
	10	44,46551	50,6	47,53276	4,337739
	30	25,06719	26,73	25,8986	1,175784

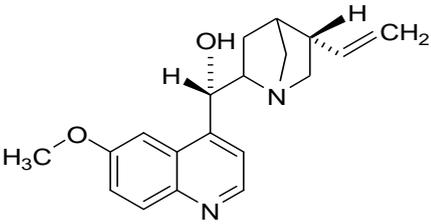
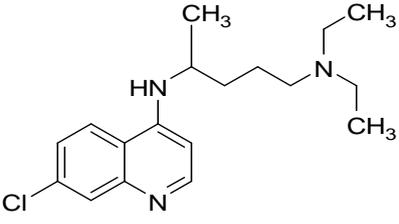
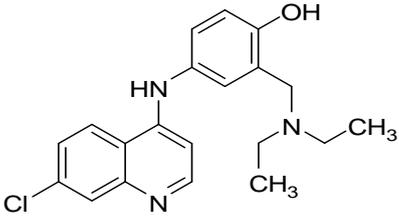
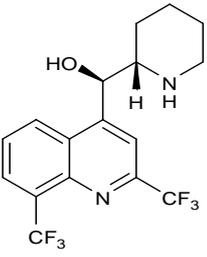
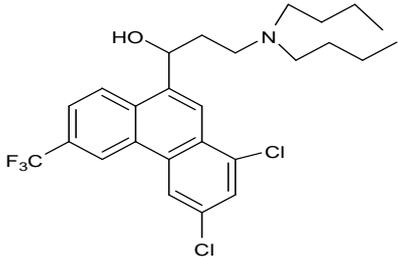
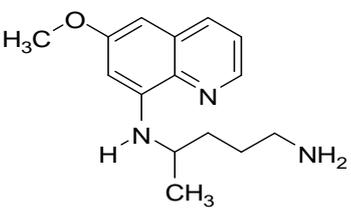
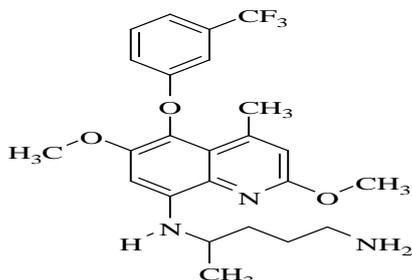
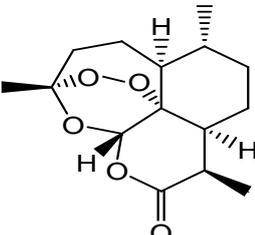
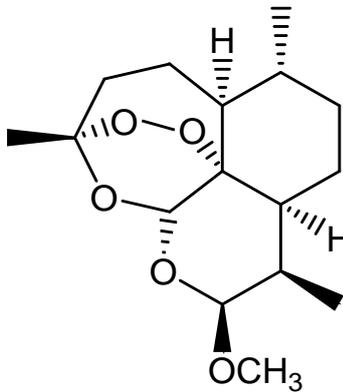
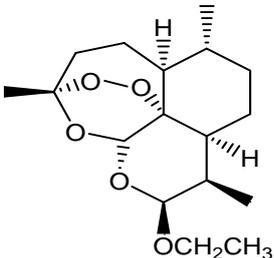
**Annexe 4 : Graphe du pourcentage de viabilité cellulaire des cellules A549 en fonction des concentrations des fractions aqueuses, hexaniques, au chlorure de méthylène et le résidu 4 solide de l'extrait méthanolique de *U. angolensis***

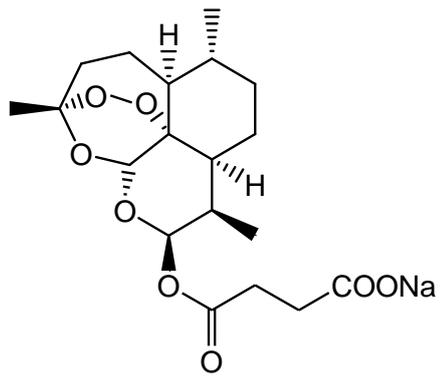


## Annexe 5: Chromatogramme des fractions aqueuses et au chlorure de méthylène de l'extrait méchanolique des écorces de *Uvaria angolensis*

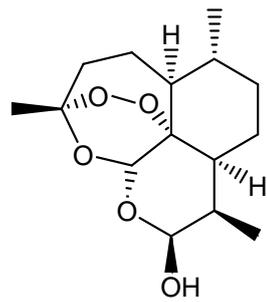


**Annexe 6: Structures de quelques antipaludiques**

 <p><b>Quinine</b></p>	 <p><b>Chloroquine</b></p>	 <p><b>Amodiaquine</b></p>
 <p><b>Méfloquine</b></p>	 <p><b>Halofantrine</b></p>	
 <p><b>Primaquine</b></p>	 <p><b>Talénoquine</b></p>	
 <p><b>Artémisinine</b></p>	 <p><b>Artémether</b></p>	 <p><b>Artéether</b></p>



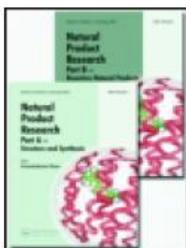
**Artésunate**



**Dihydroartémisinine**



**PUBLICATIONS**



## Uvaria angolensis as a promising source of inhibitors of HIV-1 RT-associated RNA-dependent DNA polymerase and RNase H functions

Alvine Ngoutane Mfopa, Angela Corona, Kodjo Eloho, Enzo Tramontano, Aldo Frau, Fabrice Fekam Boyom, Pierluigi Caboni & Graziella Tocco

To cite this article: Alvine Ngoutane Mfopa, Angela Corona, Kodjo Eloho, Enzo Tramontano, Aldo Frau, Fabrice Fekam Boyom, Pierluigi Caboni & Graziella Tocco (2017): Uvaria angolensis as a promising source of inhibitors of HIV-1 RT-associated RNA-dependent DNA polymerase and RNase H functions, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2017.1332615](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332615)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1332615>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 25 May 2017.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>



## *Uvaria angolensis* as a promising source of inhibitors of HIV-1 RT-associated RNA-dependent DNA polymerase and RNase H functions

Alvine Ngoutane Mfopa<sup>a,b</sup>, Angela Corona<sup>b</sup>, Kodjo Eloho<sup>b</sup>, Enzo Tramontano<sup>b</sup>, Aldo Frau<sup>b</sup>, Fabrice Fekam Boyom<sup>a</sup>, Pierluigi Caboni<sup>b</sup> and Graziella Tocco<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon; <sup>b</sup>Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy

### ABSTRACT

Reverse transcriptase (RT)-associated DNA polymerase (RDDP) and ribonuclease H (RNase H) functions are both essential for HIV-1 genome replication, and the identification of new inhibitors to block both of them is a goal actively pursued by the scientific community. In this field, natural extracts have shown a great potential as source of new antivirals. In the present work, we investigated the effect of *Uvaria angolensis* extracts on the HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities. The *U. angolensis* stem bark methanol extract inhibit both HIV-1 RNase H function and RDDP activity with  $IC_{50}$  values of  $1.0 \pm 0.2$  and  $0.62 \pm 0.15$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively and, after been fractionated with different solvents, its solid residue showed an  $IC_{50}$  of  $0.10 \pm 0.03$  and of  $0.23 \pm 0.04$   $\mu\text{g/mL}$  against RNase H and RDDP, respectively, hence laying the bases for further studies for identification of single active components.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 March 2017  
Accepted 13 May 2017

### KEYWORDS

*Uvaria angolensis*; HIV-1; reverse transcriptase; plant extracts; dual inhibitor



## 1. Introduction

Human Immunodeficiency virus type (HIV) is the cause of one of the most destructive pandemics and remains one of the major public health problems in developing countries.

**CONTACT** Angela Corona  angela.corona@unica.it

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332615>.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

**Table 1.** Activity of the crude extracts from *U. angolensis* against HIV-1 RT-associated activities.

Treatment	HIV-1 RT	HIV-1 RDDP
	RNase H	
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>b</sup>
Leaves (aqueous)	>100 (87%) <sup>c</sup>	30 ± 20
Twigs (aqueous)	74 ± 5.2	28.1 ± 5.5
Stem bark (aqueous)	2.0 ± 1.2	3.5 ± 0.6
Leaves (MeOH)	53 ± 22	46.5 ± 8.25
Twigs (MeOH)	3.5 ± 1.2	1.00 ± 0.14
Stem bark (MeOH)	1.0 ± 0.2	0.62 ± 0.15
Efavirenz	N.D.	0.003 ± 0.0003
RDS1643	2.7 ± 0.2	>100 (100%) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Compound concentration able to inhibit 50% of RNase H enzymatic activity.

<sup>b</sup>Compound concentration able to inhibit 50% of the RDDP enzymatic activity.

<sup>c</sup>Percentage of enzymatic residual activity in presence of 100 µM inhibitor.

Sub-Saharan Africa is the most affected region, with the presence of 24.7 million of infected people (about 70% out 35 million of people that lived with HIV in the world) (Global Report UNAIDS 2013; WHO 2013). The selection of viral strains resistant to the approved drugs makes the identification of new inhibitors a primary objective for the scientific community, possibly targeting viral encoded essential proteins.

HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) is a key multifunctional enzyme which combines an RNA-dependent DNA polymerase activity (RDDP) and a ribonuclease H (RNase H) function, both essential for the viral genome replication (Esposito et al. 2012) and are both widely explored drug targets (Corona et al. 2013). Up to date all the approved RT-targeting drugs inhibit only the polymerase activity. However, the simultaneous inhibition of both RT activities possibly by new mechanisms would provide a significant advantage against drug-resistant variants (Distinto et al. 2013).

In this respect, natural extracts proved to be a valuable source of active molecules, such as prenylchalcone flavonoids, terpenoids, coumarins and alkaloids (Wang et al. 2004; Bicchi et al. 2009; Esposito et al. 2013, 2016; Xu et al. 2015).

The genus *Uvaria* (Annonaceae), widely distributed over the tropical zones of Africa, Asia and Australia (Chalermglin 2001), contains several secondary metabolites endowed with antimalarial (Ntie-Kang et al. 2014; Salae et al. 2017) and antimycobacterial (Macabeo et al. 2014) and moderate anticancer properties (Nguyen et al. 2015, 2015). In Cameroon, *Uvaria* species are used by the healers, respectively, to treat malaria and related symptoms (fever, chills, headaches, and body pain) and dysentery (Focho et al. 2010; Mfopa et al. 2016). However, the activity of this plant on HIV-1 RT has not yet been reported.

In this study, we report the results of a preliminary screening on the inhibitory effect of different *Uvaria angolensis* extracts against HIV-1 RT-associated RDDP and RNase H functions in order to evaluate the potential of this plant as source of antiviral compounds.

## 2. Results and discussion

Different extracts of *U. angolensis* were prepared from powdered parts of plant harvested in Mount Kalla in Yaoundé City (Cameroon) and tested against HIV-1 RT-associated RDDP and RNase H functions (Table 1). In particular, the crude extracts that were studied in this work were prepared according to a typical procedure that can be exemplified as follows.

The leaves, twigs, stem bark and trunk were individually cut into small pieces and dried at room temperature for one week. Ten grams of ground plant materials was treated with 20 mL of methanol or water, sonicated for 30 min and stored at room temperature for 24 h. Then, the crude mixture was filtered on a cotton pad and the filtrate centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant mixture was finally filtered by using 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters to obtain a clear solution that, after concentration under vacuum gave the extract ready to be subjected to the subsequent series of extractions discussed below.

Results showed that both the methanol and water leaves extracts were poorly active, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 30 to 100  $\mu\text{g/mL}$  on both RNase H and RDDP activities. Differently, between the two twigs' extracts, the methanol-derived was remarkably more potent than the water-derived, showing against RNase H and RDDP activities of  $\text{IC}_{50}$  values of  $3.5 \pm 1.2$  and  $1.00 \pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$ . Overall, methanol and water stem bark extracts of *U. angolensis* were the most potent in inhibiting RNase H and the DNA polymerase functions with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from  $0.62 \pm 0.15$  to  $3.5 \pm 0.6$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

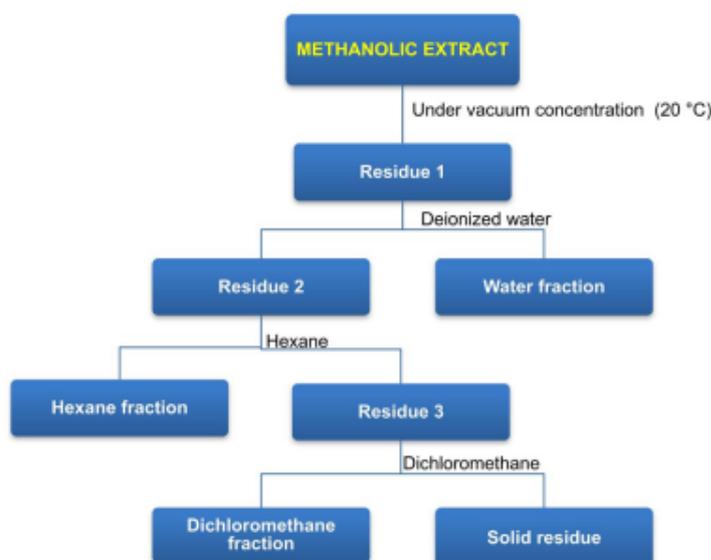
These data encouraged us to proceed in the bio-guided fractionation of stems bark methanol extract as described in Scheme 1. The parent methanol extract was firstly treated with water to solubilise all the hydrophilic components and particularly to separate the glycosides. Subsequently, the highly lipophilic compounds were separated by treating the previously isolated residue with hexane. The solid residue obtained therein was then washed with dichloromethane, a non-polar solvent that, conversely to hexane, possess a dipolar moment and thus is able to dissolve a wider range of compounds, like the chromanones and the chalcones that we evidenced in this fraction.

The separation provided water, hexane and dichloromethane fractions along with a solids residue. All the extracts were tested against both RT-functions, showing an increase in potency of inhibition (Table 2). Among them the hexane fraction was the less potent, with  $\text{IC}_{50}$  value of  $8.38 \pm 3.43$   $\mu\text{g/mL}$  against RNase H and  $17.17 \pm 0.10$   $\mu\text{g/mL}$  against RDDP activity. The water fraction was 9-fold more potent against RNase H ( $\text{IC}_{50}$   $0.97 \pm 0.08$   $\mu\text{g/mL}$ ) than against RDDP ( $\text{IC}_{50}$   $8.69 \pm 0.05$   $\mu\text{g/mL}$ ), while the dichloromethane fraction and the solid residue showed a similar activity, with the solids residue being the most active showing  $\text{IC}_{50}$  values of  $0.10 \pm 0.03$  and  $0.23 \pm 0.04$   $\mu\text{g/mL}$  on HIV-1 RT RNase H and RDDP, respectively. The dichloromethane fraction exhibited also a good activity with  $\text{IC}_{50}$  of  $0.29 \pm 0.06$  and  $0.80 \pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$  on the respective enzymes, while the water fraction displayed an activity only against RNase H function with an  $\text{IC}_{50}$  of  $0.97 \pm 0.08$   $\mu\text{g/mL}$ .

In order to determine the chemical composition, all the fractions, together with the Solid residue, were subjected to a HPLC/APCI-MS analysis.

In the water fraction, it was evidenced the presence of a lot of glycosides, few chalcone derivatives and a main peak related to the angoletin compound. Interestingly, angoletin was one of the main components of the Solid residue, together with two monoacyl glycerols such as 1-palmitoyl and stearyl glycerol (Figure S1). Besides, in the Dichloromethane fraction angoletin was not detected, while the predominant components showed to be chalcones and phenyl chromanones.

The most active fractions of the stems bark methanol extract of *U. angolensis* were assayed in order to exclude the presence of cytotoxic effects in normal cells (Table 3). The results showed no cytotoxic effect for water and hexane fractions ( $\text{CC}_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$ ). Differently, dichloromethane fraction and the solids residue showed  $\text{CC}_{50}$  values of 8.4 and 18.8  $\mu\text{g/mL}$ ,



**Scheme 1.** Bio-guided fractionation of the active stem bark methanol extract of *Uvaria angolensis*.

**Table 2.** Activity of *U. angolensis* stem bark methanol extract fractions against HIV-1 RT-associated activities.

Fractions	HIV-1 RT	HIV-1 RDDP
	RNase H	
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>b</sup>
Water	0.97 ± 0.08	8.69 ± 0.05
Hexane	8.38 ± 3.43	17.17 ± 0.10
Dichloromethane	0.29 ± 0.06	0.80 ± 0.14
Solid residue	0.10 ± 0.03	0.23 ± 0.04
RDS1643	2.7 ± 0.2	>100 (100%) <sup>c</sup>
EFV	ND	0.003 ± 0.0003

<sup>a</sup>Compound concentration able to inhibit 50% of RNase H enzymatic activity.

<sup>b</sup>Compound concentration able to inhibit 50% of the RDDP enzymatic activity.

<sup>c</sup>Percentage of enzymatic activity in presence of 100 µM inhibitor.

**Table 3** Cell growth inhibition of A549 cell line by *U. angolensis* stem bark methanol extract fractions.

Extract	A549
	<sup>a</sup> CC <sub>50</sub> (µg/mL)
Water	>100
Hexane	>100
Solid residue	8.4 ± 0.5
Dichloromethane	18.8 ± 8.8
Camptothecin	0.5 ± 0.02

<sup>a</sup>Extract concentration required to reduce cell growth by 50%.

respectively. Overall, the water fraction endowed with anti-RNase H activity below 1 µg/mL and no cytotoxic effect, represents the most promising starting point for a further isolation of the single components responsible for RT inhibition.

### 3. Experimental

#### 3.1 Plant material

The plant selected for this study (*U. angolensis*) was harvested on June 2014 at Mount Kalla in Yaoundé City (Cameroon). The identification of the species was done at the National Herbarium of Cameroon where the specimens were deposited (voucher number 50059 HNC). The leaves, twigs and stem bark were separated and distinctly treated at room temperature in the Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, at the University of Yaoundé I, Cameroon.

#### 3.2. Phytochemical study

##### 3.2.1. Bio-guided fractionation of the active stem bark methanol extract of *U. angolensis* (Scheme 1)

The crude stem bark methanol extract prepared as in *Results and discussion* section, was concentrated under vacuum at room temperature (20°C). The obtained brown glue residue (*Residue 1*) was washed, under stirring, with freshly deionised water (3 × 100 mL) and the mixture was then filtered under vacuum with a paper filter on a Buchner funnel to obtain an orange filtrate (*Water fraction*) and a sticky brown solid (*Residue 2*). Residue 2 was suspended, under stirring, in hexane (3 × 100 mL). The resulting mixture was centrifuged to give a light brown solid (*Residue 3*) and a yellow solution which was dried under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and then concentrated in vacuum at room temperature to give a yellow oil (*Hexane fraction*). Residue 3 was then treated with dichloromethane to obtain a suspension that was filtered on a Buchner funnel to give a beige solid (*Solid residue*) and a filtrate that, after concentration in vacuum at room temperature, gave a sticky dark yellow oil (*Dichloromethane fraction*). The *Solid residue* was solubilised in acetone.

##### 3.2.2. Chemical characterisation of the extracts

A qualitative analysis of all the residues and fractions was carried out by means of LC QTOF-MS.

An Agilent HPLC 1200 series instrument equipped with a 6520 QTOF detector was used. The chromatographic separation of the solid fraction was performed on a Varian column SUEVO C18100A (150 × 2.1 mm) No 5720–035. The mobile phase consisted of (A) aqueous formic acid 0.1% and (B) methanol. The solvent gradient (v/v) was generated starting from 10% B and reaching 100% B in 10 min and maintaining at 100% B for 10 min for a total run of 20 min. The solid was prepared with methanol at 2500 µg/mL, and then 4 µL of this solution was injected into the electrospray interface (ESI) operating in the positive-ion detection mode. Mass spectral data were acquired in the range *m/z* 100–1500, with an acquisition rate of 1.35 spectra s<sup>-1</sup>, averaging 10 000 transients. The source parameters were as follows: drying gas temperature 250°C, drying gas flow rate 5 L min<sup>-1</sup>, nebuliser pressure 45 psi and fragmentor voltage 150 V. Data acquisitions and processing were done using Agilent Mass Hunter Workstation Acquisition.

#### 3.3. Biochemical studies

Heterodimeric RT group M subtype B, was expressed essentially as previously described (Corona et al. 2016). The extracts were diluted in DMSO at 10 mg/mL final concentration and

sonicated (10" at 50 Hz). Starting from the 10 mg/mL solution the serial dilutions of extracts were made in Milli-Q purified water, and added to the reaction mixture.

### 3.3.1. Inhibition of HIV RT-associated RNase H function

The wild type (wt)HIV RT-associated RNase H activity was measured as described (Cuzzucoli Crucitti et al. 2015), using the RNase H inhibitor RDS1643 as a control (Corona et al. 2014). Briefly: in 100  $\mu$ L reaction volume containing 50 mM Tris HCl pH 7.8, 6 mM  $MgCl_2$ , 1 mM dithiothreitol (DTT), 80 mM KCl, hybrid RNA/DNA (5'-GTTTTCTTTCCCCCTGAC-3'-Fluorescein, 5'-CAAAGAAAAGGGGGGACUG-3'-Dabcyl) and 20 ng of wt RT according to a linear range of dose-response curve. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C, the reaction was stopped by addition of EDTA and products were measured with a Victor 3 (Perkin) at 490/528 nm.

### 3.3.2. Inhibition of HIV RT-associated RNA-dependent DNA polymerase

The HIV-1 RT-associated RNA-Dependent DNA Polymerase (RDDP) activity was measured as described (Meleddu et al. 2015) using the selective RDDP inhibitor Efavirenz as a control in 25  $\mu$ L volume containing 60 mM Tris-HCl pH 8.1, 8 mM  $MgCl_2$ , 60 mM KCl, 13 mM DTT, poly(A)-oligo(dT), 100  $\mu$ M dTTP, and 6 ng of wt RT according to a linear range of dose-response curve. After enzyme addition the reaction mixture was incubated for 30 min at 37°C and enzymatic reaction was stopped by addition of EDTA. Reaction products were detected by picogreen addition and measured with a Victor 3 (Perkin) at 502/523 nm.

### 3.3.3. Cytotoxicity assay

Cell lines were seeded in 96-well plates (Spectra Plate, PerkinElmer) at an initial density of  $10^5$  cells/mL in DMEM, containing 10% FBS, 1% Pen/Strept, in the absence or presence of serial dilutions of extracts prepared in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% Pen/Strept (ranging from 100 to 0,03  $\mu$ g/mL). Camptothecin was used as positive control. Plates were incubated for 72 h at 37°C in a humidified 5%  $CO_2$  atmosphere. Cell viability was determined adding PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen). After 1 h incubation at 37°C, relative fluorescence was read with a Victor3 (Perkin Elmer). The percentages of cell viability were based on the amount of living cells in compound-treated cells relative to untreated control cells (defined as 100% viability). Cytotoxicity graph was then generated by plotting percentage of cell viability versus concentration of extracts/compounds.

## 4. Conclusions

The present investigation into *U. angolensis* as a potential source of new antivirals showed that the stem bark methanol extract solid residue is able to inhibit both RDDP and RNase H HIV-1 RT-associated activities at low concentrations, hence laying the bases for further studies for identification of single active components.

## Acknowledgements

ANM thanks DREAM Project for support, AC and ET thank Italian MIUR for financial support (PRIN 2010, 2010W2KM5L\_003).

Part of this work was supported by the Seeding Labs Instrumental Access grant to FFB, University of Yaoundé 1, Cameroon.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca [grant number PRIN 2010], [grant number 2010W2KM5L\_003]; the DREAM Project [grant number AN14DM2795]; the Instrumental Access- Seeding Labs [grant number SL2012-2].

## References

- Bicchi C, Rubiolo P, Ballero M, Sanna C, Matteodo M, Esposito F, Zinzula L, Tramontano E. 2009. HIV-1-inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. *Planta Med.* 75:1331–1335. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19347799>
- Chalermglin P. 2001. Annonaceae plants. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Public Co Ltd.
- Corona A, Masaoka T, Tocco G, Le Grice SFJ, Tramontano E, Le Grice SFJ. 2013. Active site and allosteric inhibitors of the ribonuclease H activity of HIV reverse transcriptase. *Futur Med Chem.* 5:2127–2139. Available from: [http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/fmc.13.178?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&](http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/fmc.13.178?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&)
- Corona A, Di Leva FS, Thierry S, Pescatori L, Cuzzucoli Crucitti G, Subra F, Delelis O, Esposito F, Rigogliuso G, Costi R, et al. 2014. Identification of highly conserved residues involved in inhibition of HIV-1 RNase H function by diketo acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:6101–6110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092689>
- Corona A, Meleddu R, Esposito F, Distinto S, Bianco G, Masaoka T, Maccioni E, Menéndez-Arias L, Alcaro S, Le Grice SFJ, Tramontano E. 2016. Ribonuclease H/DNA polymerase HIV-1 reverse Transcriptase Dual Inhibitor: Mechanistic Studies on the Allosteric mode of action of isatin-based compound RMNC6. *PLoS One.* 11:e0147225. Available from: <https://plos.org/10.1371/journal.pone.0147225>
- Cuzzucoli Crucitti G, Métifiot M, Pescatori L, Messori A, Madia VN, Pupo G, Saccoliti F, Scipione L, Tortorella S, Esposito F, et al. 2015. Structure-activity relationship of pyrrolyl diketo acid derivatives as dual inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease H domain. *J Med Chem.* 58:1915–1928. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm501799k>
- Distinto S, Maccioni E, Meleddu R, Corona A, Alcaro S, Tramontano E. 2013. Molecular aspects of the RT/drug interactions. Perspective of dual inhibitors. *Curr Pharm Des.* 19:1850–1859. Available from: <https://plos.org/10.1371/journal.pone.0147225>
- Esposito F, Corona A, Tramontano E. 2012. HIV-1 reverse transcriptase still remains a new drug target: structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions. *Mol Biol Int.* 2012:586401. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Esposito F, Sanna C, Del Vecchio C, Cannas V, Venditti A, Corona A, Bianco A, Serrilli AM, Guarcini L, Parolin C, et al. 2013. *Hypericum hircinum* L. components as new single-molecule inhibitors of both HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and ribonuclease H activities. *Pathog Dis.* 68:116–124. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821410>
- Esposito F, Carli I, Del Vecchio C, Xu L, Corona A, Grandi N, Piano D, Maccioni E, Distinto S, Parolin C, Tramontano E. 2016. Sennoside A, derived from the traditional chinese medicine plant *Rheum L.*, is a new dual HIV-1 inhibitor effective on HIV-1 replication. *Phytomedicine.* 23:1383–1391. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711316301441>
- Focho DA, Egbe EA, Chuyong GB, Fongod AGN, Fonge BA, Ndam WT, Youssoufa BM. 2010. An ethnobotanical investigation of the annonaceae on Mount Cameroon. *J Med Plants Res.* 4:2148–2158.
- Global report. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. UNAIDS/JC2502/1/E. [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_en\\_1.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Global_Report_2013_en_1.pdf).

- Macabeo APG, Martinez FPA, Kurtán T, Tóth L, Mándi A, Schmidt S, Heilmann J, Alejandro GJD, Knorn M, Dahse HM, Franzblau SG. 2014. Tetrahydroxanthene-1,3(2 H)-dione derivatives from *Uvaria valderramensis*. *J Nat Prod.* 77: 2711–2715. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np500538c>
- Meleddu R, Distinto S, Corona A, Bianco G, Cannas V, Esposito F, Artese A, Alcaro S, Matyus P, Bogdan D, et al. 2015. (3Z)-3-(2-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]hydrazin-1-ylidene)-2,3-dihydro-1H-indol-2-one derivatives as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Eur J Med Chem.* 93:452–460. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25728026%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523415001282>
- Mfopa AN, Tchokouaha LRY, Mbouna CDJ, Marthe AT. 2016. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of extracts from *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis* and *Monodora tenuifolia* (Annonaceae). Preprints. 2016120044:1–17.
- Nguyen TH, Ho VD, Do TT, Bui HT, Phan VK, Sak K, Raal A. 2015. A new lignan glycoside from the aerial parts and cytotoxic investigation of *Uvaria rufa*. *Nat Prod Res.* 29:247–252. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2014.971790>
- Ntie-Kang F, Onguéné P, Lifongo LL, Ndom J, Sippl W, Mbaze L, Nogueira C, Lopes L, White N, Vogel G, et al. 2014. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. *Malar J.* 13:81. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-81>
- Salae A-W, Chairerk O, Sukkoet P, Chairat T, Prawat U, Tuntiwachwuttikul P, Chalermglin P, Ruchirawat S. 2017. Antiplasmodial dimeric chalcone derivatives from the roots of *Uvaria siamensis*. *Phytochemistry.* 135:135–143.
- Wang Q, Ding ZH, Liu JK, Zheng YT. 2004. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*. *Antiviral Res.* 64:189–194. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354204002013>
- WHO, UNICEF, UNAIDS, 2013. Global update on HIV treatment 2013: Results, impact and opportunities. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85326/1/9789241505734\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85326/1/9789241505734_eng.pdf?ua=1)
- Xu L, Grandi N, Del Vecchio C, Mandas D, Corona A, Piano D, Esposito F, Parolin C, Tramontano E. 2015. From the traditional Chinese medicine plant *Schisandra chinensis* new scaffolds effective on HIV-1 reverse transcriptase resistant to non-nucleoside inhibitors. *J Microbiol.* 53:288–293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25740376>



Available online at <http://www.ifgdg.org>

Int. J. Biol. Chem. Sci. 11(1): 118-130, February 2017

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal  
of Biological and  
Chemical Sciences

**Original Paper**

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

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

### ***In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of extracts from *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis* and *Monodora tenuifolia* (Annonaceae)**

Alvine Ngoutane MFOPA<sup>1</sup>, Cedric Derick Jiatsa MBOUNA<sup>1</sup>, Lauve Rachel Yamthe TCHOKOUAHA<sup>1,2,3</sup>, Marthe Aimée Tchuenmegne TCHUENTE<sup>4</sup>, Rufin Marie Toghuo KOUIPOU<sup>1</sup>, Patrick Valere Tsouh FOKOU<sup>1,2</sup>, Eugenie Aimée Madiesse KEMGNE<sup>1</sup>, Raceline Gounou KAMKUMO<sup>1,5</sup> and Fabrice Fekam BOYOM<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal Plants Studies, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box: 812, Yaoundé, Cameroon.

<sup>2</sup>Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), P.O. Box LG 581. Legon, Accra, Ghana.

<sup>3</sup>Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), P.O. Box 6163, Yaounde, Cameroon.

<sup>4</sup>Laboratory of Natural Products and Organic Synthesis, Department of Organic Chemistry, Faculty of

<sup>5</sup>Laboratory of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box: 812, Yaoundé, Cameroon.

\*Author correspondence; E-mail: [fabrice.boyom@fulbrightmail.org](mailto:fabrice.boyom@fulbrightmail.org); Tel.: +237 67727 6585.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the support by the Seeding Labs' Instrumental Access Grant (SL2012-2) to FFB.

#### **ABSTRACT**

The present study aimed at investigating the *in vitro* and *in vivo* susceptibility of malaria parasites to crude extracts and fractions from *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis*, and *Monodora tenuifolia*. The ethanolic extracts were partitioned using water, dichloromethane, hexane, and methanol. The most promising fraction was subjected to column chromatography. The antiplasmodial effect of extracts, fractions and sub-fractions against *P. falciparum* Chloroquine resistant (PfK1) strain was determined using SYBR green fluorescence assay. The promising fraction was assessed for cytotoxicity against Human Foreskin Fibroblast (HFF) cells and further for safety in Swiss albino mice and suppressive effect against *P. berghei*. The methanol sub-fraction of *P. suaveolens* [PStw(Ace)] showed the highest potency with IC<sub>50</sub> of 3.24 µg/mL. Sub-fraction PS8 from PStw(Ace) was the most active with IC<sub>50</sub> of 4.42 µg/mL. Oral administration of PStw(Ace) at 5000 mg/kg b.w in mice showed no signs of toxicity. Also, it exerted the highest suppressive effect against *P. berghei* at 400 mg/kg b.w throughout the 4 days experiment. Overall, the results achieved supported the use of the three plants in the traditional treatment of malaria in Cameroon. More interestingly, the PStw(Ace) fraction might be of interest in future development of an antimalarial phytodrug.

© 2017 International Formulae Group. All rights reserved.

**Keywords:** *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis*, *Monodora tenuifolia*, *Plasmodium falciparum* K1, Toxicity, Antimalarial.

## INTRODUCTION

Malaria mainly caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* represents a serious public health challenge since about 3.3 billion people are at risk worldwide. Sub-Saharan Africa is the most affected region with 90% of the 584 000 deaths recorded in 2013. Cameroon with 71% of the total population living in high-transmission areas and 4500 deaths recorded annually is one of the most affected countries in Africa (WHO, 2014). The currently prescribed treatments particularly the Artemisinin-based Combination Therapies (ACTs) are threatened by emerging resistance of *P. falciparum* strains (Dondorp et al., 2009). Given these limitations, there is a motivated search for new drugs against *Plasmodium* parasites.

Fortunately, there is evidence that plants traditionally used against malaria are valuable sources of potent antiparasitic lead compounds (Tsabang et al., 2012; Bele et al., 2011; Ginsburg and Deharo, 2011). It seems logical then to encourage studies on new plants to discover innovative antimalarial leads. Selecting plants based on their indigenous use against fever and/or malaria has been found as better approach to identify plants species with potent antimalarial lead compounds.

An ethnobotanical investigation in four malaria endemic areas of Cameroon revealed people's reliance on *Monodora tenuifolia*, *Uvaria angolensis*, and *Polyalthia suaveolens* to treat malaria and related symptoms (Tsabang et al., 2012). Thus, they were selected and studied for *in vitro* and *in vivo* antiparasitic activities.

Moreover, these plants belong to the Annonaceae family that is well known for biosynthesis of bioactive compounds (Leboeuf et al., 1982), particularly the acetogenins that have a broad spectrum of biological activities including antiparasitic

effect (Rupprecht et al., 1990). Thus, this study was designed to investigate the *in vitro* and *in vivo* antiparasitic activities of their extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant collection

Leaves, twigs and stem bark of each plant were collected at Mount Kalla (by Nkolbisson-Yaoundé, Mfoundi Division) in September 2014 and identified at the National Herbarium of Cameroon where voucher specimens were deposited under the identification numbers HNC 55313, HNC 500594 and HNC 1227 for *M. tenuifolia*, *U. angolensis* and *P. suaveolens* respectively.

### Plants extraction and fractionation

Each plant part was cut into small pieces, dried at room temperature till constant weight and powdered. Five hundred g of each powder were macerated with 2000 mL of ethanol for 72 hours at room temperature. The ethanol extracts were evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator (Rotavapor Buchi, Switzerland) and weighed. Each extract was further fractionated by liquid-liquid partition as previously described (Alali et al., 1999). Briefly, ethanolic residues were partitioned between dichloromethane and water (1:1) to yield water and dichloromethane fractions as well as interface precipitates. Then, dichloromethane fractions were further partitioned between hexane and methanol (1:1) to yield hexane and methanol fractions (methanol fractions referred to as acetogenin-rich fractions). All extracts and fractions were subjected to antiparasitic activity screening *in vitro* against *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant strain K1 (PfK1).

From this screening, the methanol fraction from the twigs of *P. suaveolens* [PStw(Ace)] was found to be the most active

against *P. falciparum*. It was therefore selected and submitted to qualitative phytochemical screening as previously described (Aromdee et al., 2005; Oloyede, 2005; Trease and Evans, 1996; Odebeyi and Sofowora, 1978; Harbone, 1976). Furthermore, it was fractionated using silica gel (70-230 mesh, Merck) column chromatography, eluting with solvent systems of increasing polarities, Hexane-Ethyl Acetate [100:0 - 0:100] and Ethyl Acetate - Methanol [95:5- 0:100]. Four hundred and thirty eight (438) sub-fractions of 100 mL each were collected and subsequently pooled on the basis of their thin layer chromatography (TLC) profiles into twelve (12) major sub-fractions PS1-PS12 [PS1-Hex 100%, PS2-Hex-EtOAc (98 :2), PS3-Hex-EtOAc (97 :3→95: 5), PS4-Hex-EtOAc (95 :5→93 :7), PS5-Hex-EtOAc (93 :7), PS6-Hex-EtOAc (93 :7→85 :15), PS7-Hex-EtOAc (85 :15→78 :22), PS8-Hex-EtOAc (78 :22→60 :40), PS9-Hex-EtOAc (60 :40→ 50 :50), PS10-Hex-EtOAc (50 :50→20 :80), PS11-Hex-EtOAc (20 :80→10 :90) / EtOAc-MeOH (98 :2), PS12-EtOAc-MeOH (95 : 5)/MeOH 100%]. All these sub-fractions were assessed *in vitro* for antiplasmodial activity and cytotoxicity as described below.

#### ***In vitro* antiplasmodial activity of crude extracts, fractions and sub-fractions**

Stock solutions of crude extracts, fractions and sub-fractions were prepared at 1 mg/mL in DMSO 100%, while solution of artemisinin was prepared in distilled water and tested at 1 $\mu$ M highest concentration. The stock solutions were serially diluted in 96-wells plates using RPMI 1640 to achieve the range of tested concentrations from 0.24 $\mu$ g/mL to 125  $\mu$ g/mL.

*PfK1* (*P. falciparum* chloroquine-resistant *K1* strain) was continuously maintained in fresh "O" positive human

erythrocytes suspended at 4% (v/v) haematocrit in complete medium, consisting of 16.2 g/L RPMI 1640 (Sigma) containing 25 mM HEPES, 11.11 mM glucose, 0.2% sodium bicarbonate (Sigma), 0.5% Albumax I (Gibco), 45  $\mu$ g/L hypoxanthine (Sigma) and 50  $\mu$ g/L gentamicin (Gibco) and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. The used medium was replaced daily with fresh complete medium to propagate the culture. Giemsa-stained blood smears were examined microscopically under oil immersion to monitor cell cycle transition and parasitaemia (Trager and Jensen, 1976). Prior the antiplasmodial assay, the culture was synchronized into ring stage parasites by 5% sorbitol (w/v) treatment as previously described (Lambros and Vanderberg, 1979).

For drug activity screening, the SYBR green I based fluorescence assay was used as previously described (Smilkstein et al., 2004). This dye interacts with malaria parasite to produce a fluorescent complex. Ninety six microliters of synchronized ring stage parasites at 2% haematocrit and 1% parasitaemia were added into triplicate wells of 96-wells plates containing 4  $\mu$ L of each inhibitor concentration. Negative control consisted of 0.4% DMSO and positive control of 1  $\mu$ M Artemisinin (ART) highest concentration. The treated cultures were incubated for 48 hrs at 37 °C in an atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. Upon incubation, 100  $\mu$ L of SYBR green I buffer [0.2  $\mu$ L of 10,000  $\times$  SYBR Green I (Invitrogen) per mL of lysis buffer {Tris (20 mM; pH 7.5), EDTA (5 mM), saponin (0.008%; wt/vol), and Triton X-100 (0.08%; vol/vol)}] were added to each well and mixed gently and further incubated in the dark at 37 °C for 1 h. Fluorescence was subsequently measured using a fluorescence multi-well plate reader (Perkin Elmer) with excitation and emission at 485 and 530 nm respectively. Fluorescence counts for ART were deducted

from counts in each well and a dose-response curve was constructed by plotting fluorescence counts against the drug concentration and activity expressed as 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) using the IC Estimator-version 1.2 software (<http://www.antimalarial-icestimator.net/MethodIntro.htm>) where estimated parasite growth in the negative control (0.4% DMSO) is 100 %, and 0% in the positive control (ART) (Le Nagard et al., 2011; Kaddouri et al., 2006).

#### **Cytotoxicity of PStw(Ace) sub-fractions**

The cytotoxic effects of the mother fraction [PStw(Ace)] and derived sub-fractions (PS1-12) on mammalian cells was determined using human foreskin fibroblasts (HFF) cells cultured in complete medium containing 13.5 g/L DMEM, 10% fetal bovine serum, 0.2% sodium bicarbonate (w/v) (Sigma) and 50 µg/mL gentamycin (Boyom et al., 2014). Cells (1x10<sup>4</sup> cells/ml/well) were seeded into 96-well flat-bottom tissue culture plates in complete medium. After 24 h of seeding, 80 µL of each test solution were added and cells incubated for 48 h in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For each extract, the concentrations tested were ranged from 0.24-125 µg/mL. 0.4% DMSO v/v was tested as negative control. Twenty microliters of a kit solution of MTS/PMS (Promega) were added to each well, gently mixed and incubated for another 3 h at 37 °C. After gentle supernatant removal and addition of 100 µL DMSO (quench agent) to the cell pellets, formazan formation was measured by recording optical density (OD) in each well using a microtiter plate reader (Biotek EL800, USA) at 490 nm. Mean ODs were plotted versus drugs concentrations and the 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) values were determined using the GraphPad Prism5.0 software. Selectivity indices of

extracts were subsequently calculated on the basis of their antiplasmodial activities (IC<sub>50</sub>) and HFF cell cytotoxicity (CC<sub>50</sub>).

#### **Safety and efficacy of twigs methanol fraction of *P. suaveolens* [PStw(Ace)] in mice**

##### **Experimental mice**

Six weeks old female Swiss albino mice (20–25 g) provided by the animal house of the Faculty of Medicine and Biomedical Sciences of the University of Yaoundé I were housed under standard conditions with 12 hours photoperiod and access to water and food *ad libitum* and used for the experiments. Animal welfare and ethical requirements were respected during the experiments according to the American Psychological Association (APA) guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research.

##### **Evaluation of the acute toxicity of fraction PStw(Ace)**

The acute toxicity of the methanol fraction from twigs of *P. suaveolens* [PStw(Ace)] was assessed in female Swiss albino mice prior to the *in vivo* antimalarial study. The study was performed according to the Organization for Economic Cooperation and Development guideline 423 (OECD, 2001). Mice were starved for about 4 h but allowed free access to water and weighed prior to test substances administration. Healthy mice were studied in 2 groups of 3 animals each. The test group received orally 1 mL of a single limit dose of 5000 mg/kg b.w of the fraction dissolved in 7% Tween 80/ 3% ethanol/ H<sub>2</sub>O. The negative control group received 1 mL of 7% Tween 80/3% Ethanol/ H<sub>2</sub>O solution. After the substances were administered, food was further withheld for 1 h, then animals were carefully observed for 4 h, and thereafter daily for 7 days during which several parameters such as mortality, moribund status, body weights, tremors,

convulsions, lethargy, sleep, and other changes in the normal behavior were recorded daily (OECD, 2001).

#### **Evaluation of in vivo suppressive activity against *Plasmodium berghei***

The fraction PStw(Ace) that showed no signs of acute toxicity in mice was studied against *P. berghei* strain B (MRA-406, MR4, ATCC W Manassas Virginia) rodent malaria parasite model that was obtained from BEI Resources ([www.beiresources.org](http://www.beiresources.org)). The test was carried out based on the four-day suppressive test described by Fidock et al. (2004). Swiss albino mice weighing 20–25 g were put randomly into test and control groups, each group containing five mice and were supplied with adequate amount of mouse cubes and clean drinking water. The parasitized erythrocytes for each test were collected from an infected donor mouse with rising parasitaemia of 20–30%. The mice were sacrificed after anesthesia with Chloroform and blood was collected in tube containing Heparin (0.5% trisodium citrate) by cardiac puncture. The blood was then diluted with physiological saline (0.9%) in proportion of 1:4. Each mouse was then inoculated with 0.2 mL of blood containing about  $10^6$  *P. berghei* infected erythrocytes on day 0 through intra-peritoneal route. After four hours of parasite inoculation, four test groups of mice were administered with 100, 200, 300 and 400 mg/kg of fraction PStw(Ace). The negative control group mice were treated with 0.2 mL of the vehicle (7% Tween 80/ 3% Ethanol/ H<sub>2</sub>O) and the positive control groups were treated with 24 mg/kg Quinine Sulfate.

Daily, a drop of blood was taken from tail snip of each mouse on frosted slide and smears were prepared, fixed with methanol and stained with 10% Giemsa solution at pH 7.2 for 15 min. Then, three fields were randomly selected on each stained slide and examined under microscope with an oil

immersion objective ( $\times 100$  magnification). The parasitaemia was determined by counting the number of parasitized erythrocytes (RBC) on randomly selected fields of the slide. Percentage of parasitaemia and suppression were calculated using the following formulas:

- (1) %Parasitaemia =  $100 \times (\text{Number of parasitized RBCs} / \text{Total number of RBCs counted})$
- (2) % Suppression =  $100 \times [(\text{Parasitaemia in } N_c - \text{Parasitaemia } T_g) / \text{Parasitaemia } N_c]$  where  $N_c$  is negative control, and  $T_g$  is treated group.

#### **Data analysis**

Mean values of triplicate experiments were calculated using MS excel for windows 10.0. The IC<sub>50</sub> values were obtained using the IC Estimator-version 1.2 software (<http://www.antimalarial-icestimator.net/MethodIntro.htm>). CC<sub>50</sub> were calculated using GraphPad Prism 5.0 software. Results are means  $\pm$  SD (standard deviation).

## **RESULTS**

### **Plant extraction, partition and antiplasmodial screening**

A total of 36 extracts and fractions were prepared from organs collected from *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* and *U. angolensis* with yields ranging from 0.02% for the interface precipitate of the twigs of *P. suaveolens* (PStw(I)) to 4.94% (w/w) for the crude ethanolic stem bark extract of *U. angolensis* (UvAsb(EtOH)) (Table 1).

The results of the screening of extracts and fractions against *P. falciparum* (Table 1) indicated that from the 9 crude ethanolic extracts that were tested, 6 [PSI(EtOH), PStw(EtOH), MoTel(EtOH), MoTetw(EtOH), UvAl(EtOH), and UvAtw(EtOH)] exhibited antiplasmodial activity with IC<sub>50</sub> values ranging from 4.53 to

10 µg/mL. The most active was the crude ethanolic extract from the leaves of *P. suaveolens* [PSI(EtOH), IC<sub>50</sub>= 4.53 µg/mL]. The subsequent fractions afforded through liquid-liquid partition of all extracts also exhibited varying effects on the parasites. Among the water fractions, only the leaves of *M. tenuifolia* (MoTel(H<sub>2</sub>O)) and *U. angolensis* (UvAl(H<sub>2</sub>O)) showed moderate antiplasmodial activity at IC<sub>50</sub> values of 7.75 and 9.78 µg/mL respectively. Also, 2 interface precipitates from the stem bark of *P. suaveolens* (PSsb(I)) and from the leaves of *M. tenuifolia* (MoTel(I)) exerted good activities at the respective IC<sub>50</sub> values of 3.84 and 4.53 µg/mL.

The acetogenin-rich (methanolic) fractions globally showed better potency compared to other types of fractions, and were the most active with 6 out of 9 fractions [PStw(Ace), PSsb(Ace), MoTel(Ace), MoTetw(Ace), UvAl(Ace), and UvAtw(Ace)] showing IC<sub>50</sub> values ranging from 3.24 to 7.78 µg/mL. Overall, the acetogenin-rich fraction of the twig extract of *P. suaveolens* [PStw(Ace)] showed the best antiplasmodial activity (IC<sub>50</sub> = 3.24 µg/mL) and was therefore selected for further studies.

A qualitative phytochemical screening of the promising *P. suaveolens* [PStw(Ace)] fraction indicated the presence of three main classes of secondary metabolites, including alkaloids, phenols, and lactones.

This fraction was further fractionated to afford 12 major sub-fractions that were screened for antiplasmodial activity and cell cytotoxicity.

#### **Antiplasmodial activity of sub-fractions from the twigs acetogenin-rich fraction of *P. suaveolens* [PStw (Ace)]**

The results presented in Table 2 indicated that from the 12 sub-fractions afforded from the twigs acetogenin-rich

fraction of *P. suaveolens*, only PS7 and PS8 showed antiplasmodial activity. They were respectively eluted with Hex-EtOAc (85:15→78:22) and Hex-EtOAc (78:22→60:40). PS8 exerted the more potent inhibition of the growth of malaria parasites (IC<sub>50</sub> = 4.42 µg/mL), compared to PS7 that rather exhibited a moderate antiplasmodial inhibition with IC<sub>50</sub> of 8.55µg/mL. Apart from these two sub-fractions, all the others were inactive against *P. falciparum* in culture.

Overall, from the bio-guided studies of the mother *P. suaveolens* twigs acetogenin-rich fraction [PStw(Ace)], it appeared that fractionation led to activity decline. Of note, PStw(Ace) (IC<sub>50</sub>= 3.24 µg/mL) was more active and selective than the subsequent sub-fractions afforded from column chromatography. This potency decrease through fractionation might result from rupture of synergistic interactions between the components, and also suggests that if left unfractionated, this fraction might be further developed as potential antimalarial ameliorated plant extract. It is within this framework that the PStw(Ace) fraction was evaluated for safety in mice, and for antimalarial efficacy using the rodent model *Plasmodium berghei* parasites.

#### ***In vivo* activities of the twigs acetogenin-rich fraction of *P. suaveolens* [PStw(Ace)]. Acute toxicity profile of PStw(Ace) fraction**

The study of the promising twigs methanolic fraction of *P. suaveolens* showed safety at the dose of 5000 mg/kg b.w. through oral administration in mice. Briefly, no death was recorded among experimental animals. Moreover, no major behavioral changes (moribund status, body weight loss, tremors, convulsions, salivation, diarrhea, persistent lethargy or sleep) were recorded during the 7 days observation beyond plant

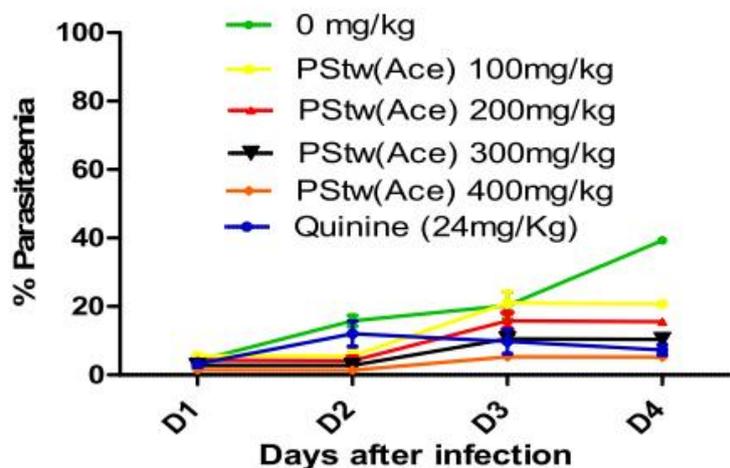
fraction administration. Overall, test animals globally behaved like controls (untreated mice). Therefore, the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) was > 5000 mg/Kg b.w, and the plant fraction categorized as nontoxic according to the OECD guidelines (OECD, 2001).

**Suppressive antiplasmodial activity of PStw(Ace) fraction in mice**

From the four days activity assessment, the suppressive effect of the twigs acetogenin-rich fraction of *P. suaveolens* against *P. berghei* in mice was determined as presented in Figure 1. On day one of the experiment, the percent parasitaemia was globally similar in all six

groups of mice, indicating that infection was establishing in all inoculated animals.

Subsequently, the quality control assay (dose 0) indicated rising parasitaemia from day 1 to day 4 of the experiment (Figure 1). Besides, PStw(Ace) fraction exerted a dose-dependent suppression of the parasitaemia, and the more pronounced effect was observed at the highest dose of 400 mg/kg b.w. At this highest dose (400 mg/kg b.w), PStw(Ace) exhibited a strongest suppressive effect throughout the study period compared to the positive control. These results further emphasized the promising feature of fraction PStw(Ace) that otherwise showed to be safe in mice at doses below 5000 mg/kg b.w.



**Figure 1:** Effect of PStw(Ace) at different doses on parasitemia level in *P. berghei* infected mice. Mice were treated with four doses of the fraction for four consecutive days. Mean % parasitaemias in each experimental group was determined daily by microscopic observation of tail blood thin smears stained with 5% Giemsa, and determination of % erythrocytes infected with *P. berghei*.

**Table 1:** Extraction yield and antiplasmodial activity of extracts and fractions from *P. suaveolens*, *M. tenuifolia* and *U. angolensis* (Annonaceae).

Plant & voucher specimen number	Extract/fraction	Plant part	Extract code	*Extraction Yield (% w/w)	**IC <sub>50</sub> (µg/mL±SD) against <i>PfK1</i>	
<i>Polyalthia suaveolens</i> HNC 1227/SRF/CAM	Crude Ethanolic	Leaf	PSl(EtOH)	4.28	4.53± 0.82	
		Twig	PStw(EtOH)	1.80	5.75 ±1.83	
		Stem bark	PSsb(EtOH)	6.30	>10	
	Water	Leaf	PSl(H <sub>2</sub> O)	0.90	>10	
		Twig	PStw(H <sub>2</sub> O)	0.34	>10	
		Stem bark	PSsb(H <sub>2</sub> O)	0.46	>10	
	Interface precipitates	Leaf	PSl(I)	0.07	>10	
		Twig	PStw(I)	0.02	>10	
		Stem bark	PSsb(I)	0.06	3.84±0.86	
	Methanolic Acetogenin-rich fractions	Leaf	PSl(Ace)	1.63	>10	
		Twig	PStw(Ace)	0.45	3.24± 0.1	
		Stem bark	PSsb(Ace)	1.45	4.90 ± 0.73	
	<i>Monodora tenuifolia</i> HNC55313/SRF/CAM	Crude ethanolic	Leaf	MoTel(EtOH)	3.98	5.48±0.19
			Twig	MoTetw(EtOH)	1.79	8.93±0.19
			Stem bark	MoTesb(EtOH)	4.03	>10
Water		Leaf	MoTel(H <sub>2</sub> O)	2.11	7.75± 0.33	
		Twig	MoTetw(H <sub>2</sub> O)	1.24	>10	
		Stem bark	MoTesb(H <sub>2</sub> O)	1.94	>10	
Interface precipitates		Leaf	MoTel(I)	0.33	4.53±0.44	
		Twig	MoTetw(I)	0.82	>10	
		Stem bark	MoTesb(I)	0.12	>10	
Methanolic Acetogenin-rich fractions		Leaf	MoTel (Ace)	0.82	3.84± 0.37	
		Twig	MoTetw (Ace)	1.23	5.02 ± 0.80	
		Stem bark	MoTesb (Ace)	1.21	>10	
<i>Uvaria angolensis</i> HNC50059/SRF/CAM		Crude ethanolic	Leaf	UvAl(EtOH)	3.27	9.98± 2.87
			Twig	UvAtw(EtOH)	3.83	10.00± 0.87
			Stem bark	UvAsb(EtOH)	4.94	>10
	Water	Leaf	UvAl(H <sub>2</sub> O)	0.76	9.78 ± 1.87	
		Twig	UvAtw(H <sub>2</sub> O)	0.06	>10	

	Stem bark	UvAsb(H <sub>2</sub> O)	0.05	>10
Interface precipitates	Leaf	UvAl(I)	0.74	>10
	Twig	UvAtw(I)	0.18	>10
	Stem bark	UvAsb(I)	0.23	>10
Methanolic Acetogenin-rich fractions	Leaf	UvAl(Ace)	1.39	5.78 ± 0.75
	Twig	UvAtw(Ace)	1.31	7.78 ± 0.13
	Stem bark	UvAsb(Ace)	1.98	>10

\*Plant parts were extracted by maceration in ethanol and further partition using different solvents and the yield calculated in percentage relative to the weight of the starting materials. \*\*50% inhibitory concentration; the susceptibility of *P. falciparum* K1 strain to plant extracts was assessed in culture using triplicate experiments; S.D. = standard deviation.

**Table 2:** Antiplasmodial and cytotoxic activities of sub-fractions of the *P. suaveolens* twigs acetogenin-rich fraction [PStw(Ace)].

Fraction/ <sup>a</sup> sub-fractions	<sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL ± SD) against <i>PfKI</i>	<sup>c</sup> CC <sub>50</sub> against HFF (µg/mL)	<sup>d</sup> SI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
PStw(Ace)	3.24 ± 0.10	>30	>9.26
PS1	>10	-	-
PS2	>10	-	-
PS3	>10	-	-
PS4	>10	-	-
PS5	>10	-	-
PS6	>10	-	-
PS7	8.55 ± 2.05	>30	> 3.51
PS8	4.42 ± 0.87	>30	> 6.79
PS9	>10	-	-
PS10	>10	-	-
PS11	>10	-	-
PS12	>10	-	-
ART	0.005 ± 0.0008	>30	>6000

<sup>a</sup>The 12 sub-fractions were afforded by column chromatography eluting with solvent systems of increasing polarity; <sup>b</sup>50% inhibitory concentration; the susceptibility of *P. falciparum* K1 strain to sub-fractions was assessed in culture using triplicate experiments; S.D. = standard deviation; <sup>c</sup>Cell cytotoxicity of sub-fractions was assessed on normal human foreskin fibroblast cells (HFF) using triplicate experiments; <sup>d</sup>Selectivity indices were calculated using the IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> of each sub-fraction; ART (Artemisinin) was tested as positive control.

## DISCUSSION

The present study aimed at investigating the *in vitro* and *in vivo* susceptibility of malaria parasites to crude extracts and fractions from *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria angolensis*, and *Monodora tenuifolia*. The crude ethanolic extracts exerted varying degrees of inhibition against *P. falciparum* K1 *in vitro*. Following a bio-guided approach, the extracts were partitioned using the acetogenin extraction protocol designed by Alali et al. (1999). The results achieved in this investigation indicated that methanol fractions (acetogenin-rich fractions) have the overall best activity against *P. falciparum* K1. This potency of acetogenin-rich fractions has previously been reported (Boyom et al., 2011) in a similar study targeting the Chloroquine-resistant *P. falciparum* W2 strain. Globally, the observed inhibitory effect of methanolic fractions could be attributed to the presence of acetogenins. Indeed, these compounds have been shown to inhibit 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 *P. falciparum* and the effects of inhibitors impair parasite oxidative and cytosolic ATP production, leading to apoptosis. Acetogenins have been also reported as potent cytotoxics with insecticidal, ascaricidal, fungicidal, antiparasitic, bactericidal and antiplasmodial activities (Rakotomanga et al., 2004; Guadaño et al., 2000). Beside the few previous works reported above, Boyom (2004) also showed that essential oils from the stem bark of *P. suaveolens* and *U. angolensis* have *in vitro* inhibitory potential against *P. falciparum* W2. Also, extracts from closely related *P. longifolia* were recently found to display moderate to good antiplasmodial activity against chloroquine sensitive *P. falciparum* 3D7 strain (Sunita et al., 2016).

Little is known about the antiplasmodial activity of extracts from *M. tenuifolia*. However, the methanol (acetogenin-rich) fractions from a closely related species, *M. myristica* have previously showed moderate antiplasmodial activities with IC<sub>50</sub> values ranging 5.52-9.03 µg/mL (Boyom et al., 2011). Also, recent studies on other *Uvaria* spp., viz. *Uvaria lucida* and *Uvaria scheffleri* showed inhibition of *P. falciparum* W2 with IC<sub>50</sub> values of 10.3 and 6.8 µg/mL respectively (Muthaura et al., 2015).

To find out which components might be eliciting the antiplasmodial activity in the promising PStw(Ace) fraction, a qualitative phytochemical screening indicated the presence of three main classes of secondary metabolites, namely alkaloids, phenols, and lactones. They might be individually and/or collectively responsible for the exhibited antiplasmodial activity. Indeed, these groups of compounds were previously reported to have significant inhibitory effects on *P. falciparum* (Kaur et al., 2009; Jimenez-Romero et al., 2008; Tasdemir et al., 2006). Functional terminal lactones or butenolide often characterize the acetogenins (Li et al., 2008). To further purify sub-fractions of the promising fraction with improved activity, PStw(Ace) was submitted to bio-guided column chromatography. Two sub-fractions (PS7 and PS8) exhibited antiplasmodial activity. They might contain lactones that are readily extracted using solvents systems in the same range as those used to afford sub-fractions PS7 and PS8 (Khetarpal et al., 1991). Also, alkaloids were previously shown to be suitably extracted using Hex-EtOAc (80:20 v/v) solvent system (Khalik et al., 2016). It is therefore assumable that components of the active fraction PStw(Ace) might be alkaloid-like and or bear lactone functional groups. However, the subsequent sub-fractions PS7 and PS8 showed to be less

active than PStw(Ace). This latter was therefore progressed and showed to be also active *in vivo* against the rodent model *P. berghei*. Furthermore, it also showed to be selective and safe in mice through oral administration, emphasizing its potential for antimalarial drug development.

### Conclusion

The results achieved from the investigation of *P. suaveolens*, *M. tenuifolia*, and *U. angolensis* have indicated that some of the plant extracts possess antiplasmodial activity. Of particular note, the methanol fraction PStw(Ace) (acetogenin-rich) obtained from liquid-liquid partition of the *P. suaveolens* twigs ethanol crude extract has shown the overall best antiplasmodial activity. Further study of this fraction has also indicated its safety in mice, and suppressive potential of *P. berghei* parasitaemia over a four days study. This acetogenin-rich fraction should be studied in details to determine its qualitative and quantitative compositions in an attempt to formulate a standardized phytodrug against malaria.

### COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interest.

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

FFB designed and supervised the study; ANM, LRYT, CDJM, MATT, RMTK, PVTF, EAMK, and RGK performed the chemical and biological (*in vitro* and *in vivo* studies) parts of the study and drafted the manuscript; FFB, EAMK, and RGK critically revised the manuscript. All authors agreed on the final version of the manuscript.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the practical support of Mr. Victor Nana in plant collection and identification.

### REFERENCES

- Alali FQ, Liu XX, Mc Laughlin JL. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.*, **62**: 504–540.
- Aromdee C, Wichitchote P, Jantakun N. 2005. Spectrophotometric determination of total lactones in *Andrographis paniculata* Nees. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, **27**(6): 1227-1231.
- Bele MY, Focho DA, Egbe EA, Chuyong BG. 2011. Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. *Afr. J. Plant Sci.*, **5**(4): 237-247.
- Boyom FF, Tsouh FPV, Tchokouaha YLR, Ngoutane MA, Kemgne EAM, Mbacham FW, Tsamo E, Amvam ZPH, Gut J, Rosenthal PJ. 2011. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.*, **134**: 717–724.
- Boyom FF. 2004. «Huiles essentielles d'Annonaceae Camerounaises: Analyse chimique, Activités antioxydante et Antiplasmodiale». Doctorate d'Etat thesis, Biochemistry, University of Yaoundé I, pp. 67-172.
- Boyom FF, Fokou PVT, Tchokouaha LRY, Spangenberg T, Mfopa AN, Kouipou RMT, Mbouna CDJ, Donfack VFD, Zollo PHA. 2014. Repurposing the Open Access Malaria Box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii* and *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, **58**(10): 5848–5854.
- Dondorp AM, Nostern F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An Sen S, Yeung S, Singhasivann P, Day NPJ, Lindergardh N, Socheat D, White NJ. 2009. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Engl. J. Med.*, **361**: 455-467.

- Fidock DA, Rosenthal JP, Croft LS, Brun R, Nwaka S. 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat. Rev. Drugs Discov.*, **10**: 509-520.
- Ginsburg H, Deharo E. 2011. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments—an introduction. *Malaria J.*, **10**: 1-7.
- Guadaño A, Gutiérrez C, DelaPeña E, Cortes D, González CA. 2000. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *J. Nat. Prod.*, **63**: 773-776.
- Harbone JB. 1976. *Phytochemical Methods. A Guide of Modern Techniques of Plants Analysis* (1<sup>st</sup> Edn). Chapman and Hall, St Edmunds Burg Press: London; 1-295.
- Jimenez-Romero C, Ortega-Barría E, Arnold AE, Cubilla-Rios L. 2008. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria sp.* *Pharm. Biol.*, **46**(10-11): 1-4.
- Kaddouri H, Nakache S, Houzé S, Mentré F, Le Bras J. 2006. Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from Africa using *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase Immunodetection Assay and inhibitory Emax model for precise IC<sub>50</sub> measurement. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, **50**: 3343-3349.
- Khalik WM, Abdullah MP, Baharudin FK, Zulkepli SA. 2016. Optimization of Extraction Procedure for Determination of Caffeine Residue in Water. *J. Mater. Environ. Sci.*, **7**(3): 720-728.
- Kau, K, Jain M, Kaur T, Jain R. 2009. Antimalarials from nature. *Bioorg. & Med. Chem.*, **10**: 1-28.
- Khetarpal VK, Storbeck LS, Wells D, Meacham RH Jr 1991. Method for separation and determination of lactone and hydroxy acid forms of a new HMG CoA reductase inhibitor (RG 12561) in plasma. *J. Chromatography*, **567**(2): 491-497.
- Lambros C, Vanderberg JP. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.*, **65**: 418-420.
- Le Nagard H, Vincent C, Mentré F, Le Bras J. 2011. Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Comput. Methods Programs Biomed.*, **104**(1): 10-8.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukherjee R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**: 2783-2813.
- Lewis MA, Arnason JT, Philogene BJR, Rupprecht JK, McLaughlin JL. 1993. Inhibition of respiration at site I by asimicin, an insecticidal acetogenin of the Pawpaw *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pest. Biochem. Physiol.*, **45**: 15-23.
- Li N, Shi Z, Tang Y, Chen J, Li X. 2008. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein J. Org. Chem.*, **4**(48): 1-62.
- Morré DJ, DeCabo R, Farley C, Oberlies NH, McLaughlin JL. 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 Sci.*, **56**: 343-348.
- Muthaura CN, Keriko JM, Mutai C, Yenesew A, Gathirwa JW, Irungu BN, Nyangacha R, Mungai GM, Derese S. 2015. Antiplasmodial potential of traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *J. Ethnopharmacol.*, **170**: 148-157.
- Odebeyi OO, Sofowora EA. 1978. Phytochemical screening: Nigeria medical plants. *Lloydia*, **41**: 234-325.
- Oloyede OI. 2005. Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakist. J. Nutrition*, **4**: 379-381.

- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2001. *Guideline for Testing of Chemical, Acute Oral Toxicity-Up-and-Down Procedure*. OECD, 423: 1-14.
- Rakotomanga M, Razakantoanina V, Raynaud S, Loiseau PM, Hocquemiller R, Jaureguiberry G. 2004. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *J. Chemother.*, **16**: 350-356.
- Rupprecht JK, Chang JM, McLaughlin JL. 1990. Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.*, **53**: 237-278.
- Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. 2004. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, **48**: 1803-1806.
- Sunita K, Kumari SD, Satish PVV, Somaiah K, Rekha NS, Brahmam P. 2016. Antimalarial activity of *Polyalthia longifolia* (False Ashoka) against chloroquine sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. *World J. Pharm. Sci.*, **4**(6): 495-501.
- Tasdemir D, Lack G, Brun R, Ruedi P, Scapozza L, Perozzo R. 2006. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J. Med. Chem.*, **49**(11): 3345-3353.
- Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**: 673-675.
- Trease GE, Evans WCA. 1996. *Textbook of Pharmacognosy* (14<sup>th</sup> Edn). Bailliere Tindall Ltd: London; pp. 60-75.
- Tsabang N, Tsouh FPV, Tchokouaha LRY, Noguem B, Bakarnga-Via I, Dongmo NMS, Nkongmeneck BA, Boyom FF. 2012. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*, **139**: 171-180.
- World Health Organization. 2014. World Malaria Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.