

## Activités trypanocides comparées de quelques composés naturels isolés des plantes médicinales camerounaises.

*Igor NGANTCHOU, Jean-Jules NONO*

Laboratoire de Chimie Bio-organique et Médicinale, Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812 Yaoundé, Cameroun.

E-mail : [nwete@yahoo.fr](mailto:nwete@yahoo.fr)

**Résumé:** L'étude phytochimique de quelques plantes médicinales camerounaises (*Entada abyssinica*, *Polyalthia suaveolens*, *Flueggea virosa*, *Enantia chlorantha*) a permis d'isoler entre autres composés naturels, cinq dont les activités trypanocides ont été démontrées sur les cellules de *Trypanosoma brucei* et sur l'enzyme GAPDH de ce parasite.

**Introduction :** La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou Maladie du sommeil causée par *Trypanosoma brucei* est une des nombreuses maladies dites « orphelines » qui a longtemps décimé les populations africaines et qui est transmise à travers la piqûre d'une mouche tsé-tsé (Glossine) infectée. Signalée pour la première fois en 1374 lors de la mort du Sultan malien décédé après une longue maladie se terminant dans un état de sommeil continu, elle n'est découverte en Afrique Centrale et au Cameroun que vers les années 1920, durant sa deuxième pandémie grâce aux travaux du Dr. Eugène Jamot [1]. De nombreux foyers sont alors découverts progressivement à travers tout le territoire national. Les principaux foyers sont enregistrés pour l'Ouest à Fontem et Manfé, pour l'Est dans la région du Nyong et à Bafia, pour la côte camerounaise c'est le Wouri et Campo et en fin pour le grand Nord dans le Logone et Chari [2]. C'est dans la vallée du Nyong que le Dr. Jamot mettra en œuvre ses principes de lutte qui marquent encore profondément les services des grandes endémies d'Afrique Centrale et Occidentale. La maladie re-émerge dans les années 1980 [3] et l'OMS en 1998 estime à 60 millions les populations à risque et 36 000 nouveaux cas enregistrés [4]. Depuis lors, de nombreux travaux ont été menés pour lutter efficacement contre cette maladie. Cette thérapeutique a évolué en deux phases principales : les traitements symptomatiques (opérations chirurgicales, applications des produits vésicants, utilisation des plantes médicinales) et la chimiothérapie marquée par des médicaments tels l'Atoxyl, la Suramine, la Pentamidine, le Méflarsoprol et l'Eflornithine. Malheureusement ces médicaments sont rares, toxiques, chers, pas toujours efficaces à tous les stades de la maladie et font face à la résistance des parasites [5, 6, 7, 8]. Il est donc plus que nécessaire de continuer de chercher de nouveaux composés naturels qui pourraient constituer de nouveaux chefs de file dans la synthèse de nouveaux médicaments et qui offriraient le meilleur rapport qualité/prix. C'est dans ce contexte que nous avons choisi, sur la base des connaissances ethno pharmacologiques, quatre plantes utilisées dans la médecine traditionnelle camerounaise. Il s'agit de *Entada abyssinica* (Mimosaceae) principalement utilisée pour soigner la Maladie du sommeil et le paludisme [9, 10, 11], *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae) utilisée essentiellement contre les douleurs rhumatismales [12], *Flueggea virosa* (Euphorbiaceae) employée comme astringent, tonique, laxatif [13] et *Enantia chlorantha* (Annonaceae) principalement utilisée comme antipaludéen [14]. Nous présentons donc ici, cinq composés organiques parmi ceux isolés qui sont les plus significatifs et nous comparons leurs résultats sur les tests d'inhibition de *Trypanosoma brucei* de même que sur l'enzyme glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de *T. brucei*.

**Résultats et discussion :**

## Chimie

L'acide 15-méthylester kolavique (1), diterpène, est une poudre blanche (PF : 162-163°C) isolée à partir de l'extrait au chlorure de méthylène des écorces du tronc de *Entada abyssinica* (Mimosaceae), au cours de l'élution de la colonne de chromatographie de gel de silice avec des mélanges à portions croissantes d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

A partir de l'extrait à l'hexane des écorces du tronc de *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae), entre autre composé organique, nous avons isolé la Polycarpol (2), triterpène, sous forme de poudre blanche (PF : 184-186°C) et la Polyveoline (3), alcaloïde indolosesquiterpénique, sous forme de cristaux incolores (PF : 170-171°C), en utilisant les mêmes techniques d'analyse chromatographique que pour 1.

La Bergénine (4), isocoumarine, quant à elle a été isolée sous forme de cristaux incolores (PF : 132-135°C) à partir de l'extrait au méthanol des feuilles de *Flueggea virosa* (Euphorbiaceae) qui faisait suite à une précédente extraction à l'hexane.

La Palmatine (5), alcaloïde berbérinique, a été isolée sous forme de cristaux jaunes (PF : 206-208°C) à partir de l'extrait au méthanol des écorces du tronc de *Enantia chlorantha* (Annonaceae).

Toutes les structures ont été établies sur la base d'évidences spectroscopiques et par comparaison des nos résultats aux données spectrales déjà publiées [9], [13], [15] et [16].

## Biologie

Les composés 1-5 ont été testés sur les cellules de *Trypanosoma brucei* et sur la GAPDH, enzyme clé de la glycolyse de *T. brucei*. Les résultats des tests sur la cellule sont consignés dans le Tableau 1.

De ce tableau, il ressort que 3 et 5 sont inactifs. Dans les conditions expérimentales 1, 2 et 4 ont une activité modérée sur *T. brucei* car leurs  $IC_{50}$  respectives sont toutes comprises entre 1 et 10  $\mu$ M ;

En se basant sur le fait que les formes sanguines de trypanosomes dépendent complètement de la glycolyse jusqu'au stade du pyruvate comme unique source d'énergie [9, 13, 14], nous avons choisi une des enzymes clés de cette glycolyse : la GAPDH, comme cible. Les composés 1-5 ont donc été testés sur cette enzyme et les résultats sont reportés dans le Tableau 2.

A partir de ce tableau, 1 apparaît comme le composé le plus actif et comme un inhibiteur sélectif de la GAPDH du parasite, sélectivité qui est 66 fois plus importante pour la GAPDH de *T. brucei* ( $IC_{50}$  : 0,012mM) que sur celle du muscle du lapin ( $IC_{50}$  : 0,800mM) choisi ici comme mammifère de référence. Les meilleures activités inhibitrices sont ensuite celles de 3 et 4 qui sont deux fois plus importantes sur la GAPDH de *T. brucei* que sur celle du muscle du lapin.

De plus, la faible activité inhibitrice observée sur la GAPDH du muscle du lapin ( de l'ordre de 0,800mM) serait intéressante compte tenu du rôle important que joue la GAPDH dans plusieurs pathologies humaines telles l'apoptose [17] et le cancer [18].

## Partie expérimentale

### Généralités :

Les points de fusion (PF) ont été déterminés sur un appareil de type Büchi Melting Point B-540 et ne sont pas corrigés. Les analyses CCM ont été réalisées sur des plaques préfabriquées de silice de 0,25 mm d'épaisseur (Merck, Silica gel 60 F254), elles étaient visualisées sous lumière UV et préférentiellement en aspergeant de l'acide sulfurique dilué à 50% suivi d'un chauffage ultérieur (spots noirs). Les chromatographies sur colonne ont été faites sur gel de silice (Merck silica gel 60 ; 70-230 mesh). Les spectres de RMN ont été enregistrés sur

différents appareils : **1, 2, 3** et **4** sur un spectromètre Brucker de 500MHz à 25°C et **5** sur un spectromètre JEOL, JMN EX de 400MHz dans ~5% de solution à 25°C. Tous les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Mattson Polaris FTIR dans la phase solide KBr.

#### **Matières végétales :**

Les écorces du tronc de *Entada abyssinica* (Mimosaceae) ont été récoltées à Dschang (Province de l'Ouest, Cameroun) en Décembre 2001, celles de *Polyalthia suaveolens* (Annonaceae) au Mont Eloumden (Province du Centre, Cameroun) en Décembre 2001, celles de *Enantia chlorantha* (Annonaceae) à Edéa (Province du Littoral, Cameroun) en Mars 1995 ; et les feuilles de *Flueggea virosa* (Euphorbiaceae) le long de la route à Obala (Province du Centre, Cameroun) en Mars 1999. En dehors de *P. suaveolens* qui a été identifiée par Koufani Anaclef de l'Herbier National du Cameroun, toutes les autres l'ont été par le Pr. B. Sonké de l'Herbier National du Cameroun et du « National Botanic Garden » de Belgique. Des spécimens Voucher de toutes ces espèces ont été déposés à l'Herbier National du Cameroun.

#### **Extractions et isolements :**

5 Kg d'écorces du tronc de *Entada abyssinica* (Mimosaceae) ont été pulvérisées et macérées à froid à température ambiante avec le chlorure de méthylène pendant six jours. Le résidu obtenu après évaporation sous pression réduite a été épuisé à l'hexane. Nous avons pu obtenir ainsi 73g d'un extrait à l'hexane. Cet extrait a été chromatographié avec succès sur gel de silice en utilisant comme éluant le système hexane/acétate d'éthyle (4/1). Nous avons obtenu 330mg du composé **1**.

6 Kg d'écorces du tronc de *P. suaveolens* (Annonaceae) ont subi la même technique d'extraction mais en utilisant seulement l'hexane, on a pu obtenir ainsi 150g d'extrait à l'hexane. Les analyses chromatographiques successives menées nous ont permis d'isoler 350mg de **2** et 500mg de **3**. Leurs données spectrales (RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H) sont consignés dans les tableaux 3 et 4 respectivement.

De même, 2,5Kg des feuilles de *Flueggea virosa* (Euphorbiaceae) ont été pulvérisés et macérés à froid et à température ambiante pendant 48h avec le méthanol. L'extrait au méthanol a été concentré et déposé à température ambiante, après quelques heures il y a eu un dépôt qui a été filtré pour donner 20g de **4** impur. Le filtrat et l'extrait au méthanol ont été mélangés et concentrés à sec sous pression réduite. La fraction résultante a été chromatographiée sur gel de silice pour donner 3g de Bergénine (**4**) pure.

D'autre part, 2Kg d'écorces du tronc de *Enantia chlorantha* (Annonaceae) ont été macérées à froid et à température ambiante dans le méthanol pendant trois jours. Après filtration et évaporation sous pression réduite, les 200g d'extrait obtenu ont été traités avec 2l de HClaq (10%) pour former un précipité qui après filtration a donné 30g d'un mélange solide jaune (A). Le filtrat a été extrait plusieurs fois au CHCl<sub>3</sub> et lyophilisé pour donner 80g d'un solide (B). La moitié de B a été chromatographié sur gel de silice en utilisant des portions croissantes de CHCl<sub>3</sub> dans l'hexane. Cette technique nous a permis d'obtenir 2g d'un cristal jaune qui après recristallisation dans le méthanol a donné 1,2g de **5**.

Les données spectrales de ces composés ont précédemment été publiées, respectivement [9], [13], [15] et [16].

#### **Activité inhibitrice de *T. brucei* :**

Les screenings primaires sur *Trypanosoma brucei brucei* ont été réalisés dans les Laboratoires d'évaluation et de screening WHO/TDR/DDR.

#### **Etudes d'inactivation de la GAPDH de *T. brucei* :**

Les activités enzymatiques inhibitrices des composés 1-5 ont été réalisées par spectrophotométrie suivant les travaux de Willson M. et col. de 1994 [19]. Les enzymes GAPDH de *T. brucei* ont été produits et purifiées selon Hannaert et col. 1995 [20] et celles du muscle du lapin obtenues de « Boehringer Mannheim » et « Sigma-Aldrich Chemical Company ».

#### Remerciements :

Ces travaux ont été réalisés grâce aux apports financiers conjoints de FIS-OMPAC (Fond International pour la Science - Organisation Mondiale pour la Prohibition des Armes Chimiques), de l'Union Européenne (INCO-DC, ICA4-CT-2001-10075) à B. Nyasse. Les auteurs expriment toute leur reconnaissance aux collaborateurs B. Sonké, PAM Michels, V. Hannaert, R. Pink, F. Opperdoes, D. Cotton, R. Brun, C. Philouze, C. Morin, C. Fontaine, C. Denier, L. Gilmore, G. Oliva pour leur parfaite collaboration.

#### Références :

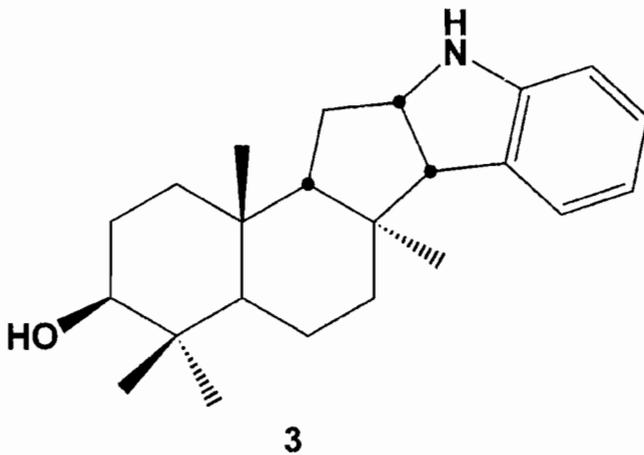
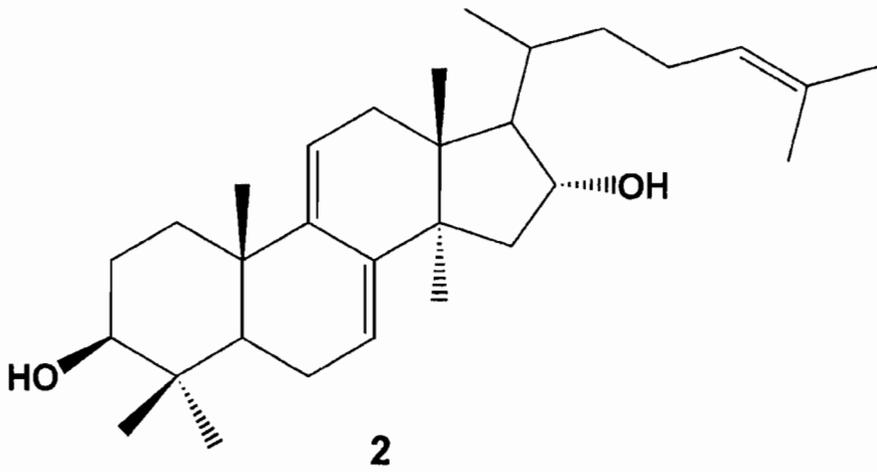
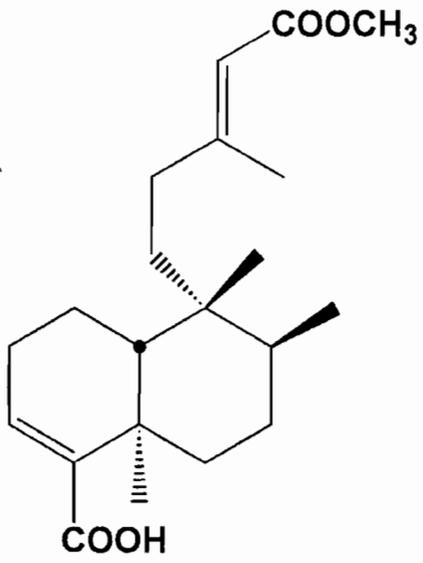
- [1]. [www.sleeping-sickness.com/histoire1.htm](http://www.sleeping-sickness.com/histoire1.htm)
- [2]. [www.sleeping-sickness.com/tha\\_cameroun.htm](http://www.sleeping-sickness.com/tha_cameroun.htm)
- [3]. WHO (1998). La trypanosomiase africaine : lutte et surveillance. Rapport d'un comité d'experts de l'OMS. Série de rapports techniques N° 881. Geneva :WHO.
- [4]. [www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr2001.htm](http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr2001.htm)
- [5]. Stanghellini A., Josenando T. (2001). *Trop. Med. Int Health* **6** : 330-334.
- [6]. Legros D, Evans S, Maiso F, Enyaru JCK, Mbulamberi D (1999). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93** : 439-442.
- [7]. Iten M, Matovu E, Brun R, Kaminsky R (1995). *Trop. Med. Parasitol.* **46**: 190-195.
- [8]. Pepin J. Milord F. (1994). *Adv. Parasitol.* **33**: 1-47.
- [9]. Nyasse B, Ngantchou I, Tchana EM, Sonke B, Denier C, Fontaine C (2004). *Pharmazie* **59** : 873-875.
- [10]. Olajide OA, Alada ARA (2001). *Fitoterapia* **72**: 492-496.
- [11]. Cos P, Hermans N, De Bruyne T, Apers S, Sindanbiwe JB, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ (2002). *J. Ethnopharmacol.* **79**: 155-163.
- [12]. Surville N (1955). Notes sur quelques plantes médicamenteuses du Sud-Cameroun, ORSTOM-IRC. Page 2.
- [13]. Nyasse B, Nono J, Sonke B, Denier C, Fontaine C (2004). *Pharmazie* **59** : 492-494.
- [14]. Nyasse B, Nkwengoua E, Sondengam B, Denier C, Willson M (2002). *Pharmazie* **57**: 358-361.
- [15] Choudhury H.M, Healey T.M, Waterman PG (1982). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*; 2807-2812.
- [16]. Wafo P, Nyasse B, Fontaine C (1999). *Phytochem.* **50** : 279-281.
- [17]. Sunaga K, Takahashi H, Chang DM, Ishitani R (1995). *Neurosci. Lett.* **200** : 133-136.
- [18]. Epner DE, Partin AW, Shalken JA, Isaacs JT, Coffey DS. (1993). *Cancer Res.* **53** : 1995-1997.
- [19]. Willson M, Lauth N, Périé J, Callens M, Opperdoes FR (1994). *Biochemistry* **33**: 214-220.
- [20] Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PAM (1995). *Protein expression and purification* **3**: 224.

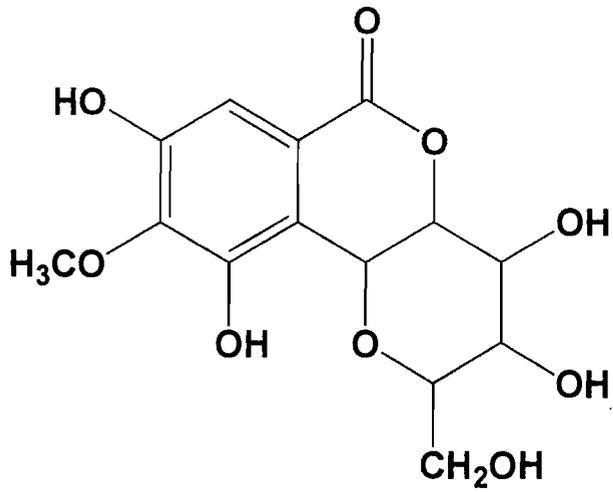
Tableau 1 : Activités inhibitrices de 1-5 sur *T. brucei*. (IC<sub>50</sub> en µM)

Composés	<i>T. brucei</i>	Drogues de Référence
1	1,7	Suramine : 0,044
2	7,7	Mélarsozol : 0,00395
3	18,2	Mélarsozol : 0,00395
4	1,0	Suramine : 0,22
5	40,0	-

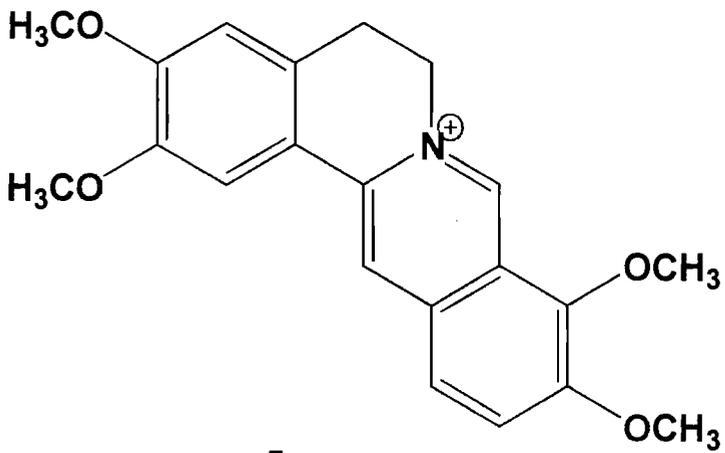
Tableau 2 : Inhibition de la GAPDH de *T. brucei* (IC<sub>50</sub> en mM)

Composés	GAPDH de <i>T. brucei</i>	GAPDH du Muscle du Lapin
1	0,012	0 800
2	0,660	0,830
3	0,300	0,650
4	1,000	2,000
5	0,035	-





4



5