

Etude des potentialités antiplasmodiales de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso

Olivia **JANSEN**
Pharmacien

Qu'il me soit permis de remercier chaleureusement tous ceux qui ont rendu possible la réalisation de ce travail et qui y ont apporté, de près ou de loin, leur précieuse contribution.

Je tiens à adresser mes plus respectueux remerciements aux Professeurs Luc Angenot et Michel Frédérick, co-promoteurs de cette thèse, ainsi qu'au Professeur Monique Tits, du Laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg, pour leur accompagnement scientifique et humain tout au long de ce travail. Je les remercie également pour leur grande disponibilité et leurs suggestions judicieuses lors de la rédaction de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Luc Angenot, pour la confiance qu'il m'a toujours accordée depuis mon DEA en 2002 et surtout pour m'avoir donné l'opportunité de réintégrer le service en tant qu'assistante en 2007 et permis de développer mon propre sujet de recherche sur les plantes médicinales du Burkina Faso. Sa rigueur scientifique et ses vastes connaissances dans des domaines variés – de la Pharmacognosie et des alcaloïdes de *Strychnos* à l'Histoire de Liège et de la Pharmacie, en passant par la flore rwandaise – m'inspirent un profond respect. Son enthousiasme à partager tout ce savoir a largement contribué à enrichir ma culture générale et scientifique au fil des années passées dans le service.

Je remercie également le Professeur Michel Frédérick, pour la confiance renouvelée, ainsi que pour la transmission de ses connaissances, notamment en matière de paludisme et de détermination structurale. Son expérience et sa passion pour la recherche, qu'il partage avec nous au sein du service, ainsi que son implication dans des projets de développement, sont pour moi une source d'inspiration et un exemple.

Mes plus sincères remerciements vont aussi au Prof. Monique Tits, pour sa gentillesse, son suivi scientifique rigoureux et son soutien moral tout au long de ce travail. Toujours à l'écoute, ses conseils pertinents et ses encouragements ont été d'une aide inestimable dans l'accomplissement de cette thèse.

Je tiens à remercier également les membres du jury ayant fait partie de mon comité de thèse, pour leurs conseils et leur suivi, en particulier le Professeur B. Pirotte qui en a accepté la présidence et le Professeur P. De Mol, qui en a été le président pendant 4 ans. Je remercie aussi les autres membres du jury, les Professeurs E. Ollivier (Université d'Aix Marseille II) et L. Pieters (Université d'Anvers) pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que le Dr Jean-Pierre Nicolas, fondateur de l'association Jardins du monde, pour son accompagnement scientifique efficace en matière d'ethnobotanique. Ses qualités humaines et ses vastes compétences en la matière ont grandement contribué à enrichir ma réflexion autour de l'ethnopharmacologie.

La réalisation de ce travail a été possible grâce à la collaboration de différents laboratoires de l'ULg et d'autres Universités. Qu'il me soit permis de remercier Mr. JC Van Heugen (ATC) et Dr J. Widart (ULg) pour leur aide à la réalisation des expériences en spectrométrie de masse ; le

Dr A. Tchinda pour son assistance précieuse dans l'analyse des spectres RMN ; ainsi que le Dr A. Chariot, du Laboratoire de Chimie Médicale (ULg), pour le suivi scientifique lors des comités de thèse et la mise à disposition de la plate-forme technique du GIGA pour les tests de cytotoxicité. Je remercie également l'équipe du Dr C. Di Giorgio (Université d'Aix Marseille II), pour la réalisation des tests de génotoxicité ; ainsi que l'équipe du Prof. R. Kiss (ULB), pour l'évaluation du potentiel anticancéreux par vidéomicroscopie quantitative.

Mes remerciements chaleureux vont également à l'équipe locale de Jardins du monde au Burkina Faso et aux différents volontaires qui se sont succédé depuis 2005 et ont contribué à ce travail, en particulier Séverine, Céline, Nicolas, Marie-Cécile, Léna, ainsi que les salariés locaux, Baba et Gha, qui assurent l'interface entre les travaux de laboratoire et le terrain.

Au Burkina Faso, je remercie aussi particulièrement le Prof. J-B. Nikiéma et le Dr K. Djierro, de la Direction Générale de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires, ainsi que les Dr B. Ouattara et F. Kini, pour leur accueil à Ouagadougou, leur contribution à ce travail, et pour la collaboration belgo-burkinabè fructueuse qui continuera, je l'espère, à se développer au-delà de celui-ci. Je tiens également à remercier toutes les autres personnes qui, dans ce contexte, ont participé à nourrir ma réflexion autour de la valorisation des médecines et pharmacopées traditionnelles: Prof. R. Sanogo (Université de Bamako), Dr M. Olivier (projet PHAVA), Prof. H. Millogo (WANNPRES),...

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans la présence et le soutien quotidien des autres membres du laboratoire de Pharmacognosie. Je remercie tout particulièrement Virginie Esters, pour sa disponibilité et son soutien tout au long de ces années, ainsi que pour l'amitié développée au-delà du laboratoire. Je remercie aussi Jean-Noël Wauters pour son aide et son expertise technique précieuses ; Delphine, notamment pour le soutien logistique efficace lors des TP ; Nathalie, Gene, ainsi qu'Ewa, Martine et Marie, pour leur aide à l'encadrement des étudiants et à la culture palu ; sans oublier Raymond, Mariano et César qui ont contribué à mettre une petite part d'Afrique dans le labo ; ainsi que tous les stagiaires et chercheurs qui ont croisé ma route dans le labo ces dernières années. Merci à tous pour votre aide et l'ambiance amicale partagée. Je remercie également le Dr Pierre Francotte et Eric Goffin, du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique pour leur soutien scientifique et amical.

Mes remerciements vont également à ma famille, mes amis et mes proches, pour les bons moments passés ensemble. Je remercie en particulier du fond du cœur, Nico, toujours à mes côtés, pour ses encouragements, sa compréhension, et tout ce qu'il m'apporte au quotidien. Sans toi rien ne serait pareil ! Merci également pour la conception graphique *made in NK's*.

Enfin, je dédie cette thèse à ma Maman, qui m'a toujours encouragée à poursuivre mes études et mes rêves, et sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour m'avoir donné cette chance !

Ce travail a été mené dans l'objectif d'évaluer les propriétés antiplasmodiales de plantes médicinales du Burkina Faso à travers une démarche ethnopharmacologique, en vue d'isoler de nouveaux composés à potentialités antipaludiques et d'envisager la valorisation locale des plantes actives.

Une première étape d'enquêtes ethnobotaniques nous a permis de répertorier les espèces végétales utilisées dans le traitement traditionnel du paludisme et des fièvres au Burkina Faso. Parmi les 72 espèces recensées, nous en avons sélectionné treize pour l'étude de leur activité antiplasmodiale en laboratoire.

Des extraits préparés à l'aide de différents solvants (dichlorométhane, méthanol, eau), à partir des échantillons végétaux récoltés, ont ensuite été testés *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* en utilisant une méthode colorimétrique (pLDH assay). Ce screening antiplasmodial a mis en évidence une activité significative pour 8 espèces ($IC_{50} < 50\mu\text{g/ml}$), dont 3 ont montré une bonne activité ($IC_{50} < 15\mu\text{g/ml}$), ce qui témoigne de la présence de constituants antiplasmodiaux dans ces végétaux, validant dès lors leur usage traditionnel. Ce travail constitue le premier rapport de l'activité antiplasmodiale de 5 de ces plantes. *Dicoma tomentosa* et *Gardenia sokotensis* ont été sélectionnées pour un fractionnement bioguidé afin d'en isoler les composés responsables de leur activité. Des tests complémentaires de toxicité (hémolyse, cytotoxicité sur fibroblastes et génotoxicité) ont également été réalisés afin d'évaluer la sécurité d'usage de ces plantes qui paraissent prometteuses étant donné leur activité sur le parasite.

L'étude de *Dicoma tomentosa* Cass. a mené à l'isolement de son principe actif majoritaire (PA), une lactone sesquiterpénique de type mélampolide : l'urospermal-A-15-O-acetate (UA15OA). Ce composé a montré une activité particulièrement prometteuse sur *P. falciparum* ($IC_{50} < 1\mu\text{g/ml}$). Les extraits et l'UA15OA n'ont cependant montré qu'une sélectivité modérée lors des tests de cytotoxicité ($IS \sim 3$, pour les extraits et l'UA15OA). Les tests de génotoxicité (numération des micronoyaux) ont également décelé une activité significative, aussi bien pour le PA que pour les extraits. Ces résultats laissent suspecter une toxicité (chronique) et doivent inciter à la prudence quant à l'utilisation traditionnelle de cette plante, malgré son potentiel antiplasmodial réel. Par ailleurs, l'UA15OA ayant montré des propriétés cytotoxiques sur diverses lignées de cellules cancéreuses (dont certaines résistantes à l'apoptose), l'étude de ses potentialités antitumorales pourrait constituer une perspective complémentaire dans le cadre de nos travaux sur *D. tomentosa*.

L'étude de *Gardenia sokotensis* Hutch. a révélé que l'activité antiplasmodiale de l'extrait au dichlorométhane de la plante n'est pas attribuable à un principe actif majoritaire mais résulte d'une complémentarité d'action entre différents composés. Quatre terpènes ont été isolés, dont un identifié comme un nouveau triterpène de type 3,4,seco-cycloartane : la sokotensine A. Les produits purifiés ont tous montré une activité proche de celle de l'extrait de départ sur *P. falciparum* ($IC_{50} \sim 12\mu\text{g/ml}$) et pas (ou peu) de sélectivité vis-à-vis du parasite lors des tests de cytotoxicité. Des études complémentaires, concernant la toxicité potentielle de *G. sokotensis*, ainsi que son efficacité clinique seraient nécessaires afin de statuer sur son intérêt en médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme.

Mots Clés : Paludisme, ethnopharmacologie, Burkina Faso, *Dicoma tomentosa*, lactone sesquiterpénique, *Gardenia sokotensis*, cycloartane

The aim of this work was to evaluate the antiplasmodial properties of medicinal plants from Burkina Faso through an ethnopharmacological approach, in view to isolate new antiplasmodial compounds and to consider the local valorization of active plants.

Ethnobotanical field studies allowed us to list 72 vegetal species used in traditional medicine in Burkina Faso to treat malaria. Thirteen plants were selected for laboratory investigations of their antiplasmodial activity.

Plant extracts were prepared using different solvents (dichloromethane, methanol, water) and tested *in vitro* against *Plasmodium falciparum*, using the pLDH assay. This screening highlighted the significant antiplasmodial activity of 8 species ($IC_{50} < 50\mu\text{g/ml}$) and 3 of them displayed a good activity ($IC_{50} < 15\mu\text{g/ml}$). This confirms the presence of antiplasmodial compounds in these plants and thereby validates their traditional use. This work is the first report of antiplasmodial properties for five of them. We selected *Dicoma tomentosa* and *Gardenia sokotensis* for a bioguided fractionation in order to isolate their active constituents. Complementary toxicity tests were performed to evaluate the safety of use of these plants, which seem promising regarding their activity against the parasite.

The study of *Dicoma tomentosa* Cass. led to the isolation of its major active compound, a melampolide-type sesquiterpene lactone, urospermal A-15-O-acetate (UA15OA). This compound showed very promising activity against *P. falciparum* ($IC_{50} < 1\mu\text{g/ml}$). However the antiplasmodial extracts, as well as UA15OA, displayed only a moderate selectivity in cytotoxicity assay ($IS \sim 3$). A genotoxic activity was also detected (micronucleus assay) for extracts and the pure compound. These findings point towards potential toxicity in chronic use for humans and therefore underline the need for caution regarding to the traditional use of this plant, despite its real antiplasmodial potential. On the other hand, the cytotoxic activity detected with UA15OA towards different cancer cell lines encourages us to further investigate its antitumoral potential, which represents an additional outcome from our studies about *D. tomentosa*.

The study of *Gardenia sokotensis* Hutch. showed that the activity of the dichloromethane extract cannot be attributed to a major active compound, but results from the combined action of many compounds in the plant. Four terpenes were isolated and one of them was identified as a new 3,4-seco-cycloartane triterpene, named sokotensine A. All purified compounds displayed the same level of activity as the whole extract against *P. falciparum* ($IC_{50} \sim 12\mu\text{g/ml}$) and no (or low) selectivity in cytotoxicity assays. The potential toxicity of *G. sokotensis* as well as its clinical efficacy should be further investigated to determine the relevance of its use in traditional medicine in malaria treatment.

Keywords: Malaria, ethnopharmacology, Burkina Faso, *Dicoma tomentosa*, sesquiterpene lactone, *Gardenia sokotensis*, cycloartane

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Résumé/Abstract

Table des matières	i
Liste des abréviations.....	vi
Liste des illustrations	vii
Liste des tableaux	xi

1 INTRODUCTION GENERALE

1.1. Le paludisme	1
1. 1.1 Vecteur et transmission	1
1. 1.2 Le <i>Plasmodium</i>	3
1.1.2.1 Les différentes espèces	3
1.1.2.2 Cycle de développement	5
1.1.3 Aspects cliniques	7
1.1.4 Epidémiologie et impact socio-économique	8
1.1.5 Lutte contre le paludisme	12
1.1.5.1 Moyens de prévention.....	12
1.1.5.2 Traitements	14
1.1.5.3 Principales difficultés de la lutte contre le paludisme	18
1.2. De l'usage traditionnel au médicament	21
1.2.1 Substances naturelles en thérapeutique	21
1.2.2 Médecines et pharmacopées traditionnelles	23
1.2.2.1 Définitions	23
1.2.2.2 Itinéraire thérapeutique et recours à la médecine traditionnelle	23

1.2.2.3	Position de l'OMS sur la médecine traditionnelle	26
1.2.3.	La démarche ethnopharmacologique appliquée	27
1.2.3.1	Ethnopharmacologie : Définitions et enjeux	27
1.2.3.2	Méthodologie générale	27
1.2.3.3	Présentation de l'association Jardins du monde	34
1.2.4	Composés purs <i>versus</i> extraits végétaux : le cas du paludisme	36
1.2.5	Médicaments traditionnels améliorés (MTA)	38
1.2.5.1	Définitions	38
1.2.5.2	Avantages et Inconvénients des MTA	39
1.2.5.3	Quelques exemples de MTA antipaludiques en Afrique de l'Ouest	40
1.3	Le Burkina Faso	42
1.3.1.	Géographie et biodiversité	42
1.3.2	Données socio-économiques	44
1.3.3	Situation sanitaire – médecine traditionnelle	45
1.3.4.	Le paludisme au Burkina Faso	47
1.3.5	Travaux antérieurs sur la pharmacopée traditionnelle locale	50
1.4	Contexte et objectifs du travail	51
1.5	Bibliographie (1)	53
2	ENQUÊTES ETHNOBOTANIQUES, SÉLECTION DES PLANTES D'INTÉRÊT ET COLLECTES DES ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX.	
2.1	Avant-propos	61
2.2	« Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso : sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues »	62
2.2.1	Introduction	62
2.2.2	Objectifs	62

2.2.3 Matériel et méthode	63
2.2.3.1 Recensement des usages d'espèces utilisées dans le traitement traditionnel de la malaria au Burkina Faso	63
2.2.3.2. Critères de sélection	66
2.2.4 Résultats	67
2.2.5 Discussions et perspectives	69
2.3 Bibliographie (2)	76

3 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE SUR *P. FALCIPARUM*

3.1 Avant-propos	81
3.2 "Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties."	82
3.2.1 Introduction	82
3.2.2 Materials and Methods	84
3.2.3 Results	87
3.2.4 Discussion	90
3.2.5 Conclusion et perspectives	97
3.3 Avant-propos aux chapitres 4 et 5 : commentaire sur le choix des plantes sélectionnées pour une étude approfondie	99
3.4 Bibliographie (3)	104

4 CONTRIBUTION A L'ETUDE DE *DICOMA TOMENTOSA* Cass.

4.1 Avant-propos	111
4.2 <i>Dicoma tomentosa</i> Cass. : Données de la littérature	112
4.3 Investigation phytochimique préliminaire de <i>Dicoma tomentosa</i> Cass.	118
4.3.1 Screening phytochimique	118
4.3.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	118

4.3.3 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	120
4.4 “Antiplasmodial activity of <i>Dicoma tomentosa</i> (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound”	123
4.4.1 Background	124
4.4.2 Methods	125
4.4.3 Results and discussion	130
4.4.3.1 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> anti-plasmodial activity of crude extracts	130
4.4.3.2 Cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts	132
4.4.3.3 Bioguided fractionation: isolation and identification of the major active compound	132
4.4.3.4 Anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic properties of urospermal A-15-O-acetate	138
4.4.4 Conclusion	139
4.5 Evaluation de la quantité d’UA15OA dans les extraits (HPLC)	140
4.6 Etude du potentiel génotoxique de <i>Dicoma tomentosa</i>.....	142
4.6.1 Principe du test et protocole	143
4.6.2 Résultats et Discussion	145
4.7 Etude de la cytotoxicité de l’UA15OA sur cellules cancéreuses	149
4.7.1 Test de cytotoxicité sur différentes lignées cancéreuses (MTT)	149
4.7.1.1 Méthodologie	149
4.7.1.2 Résultats et Discussion	150
4.7.2 Test de cytotoxicité par vidéomicroscopie quantitative (VMQ)	151
4.7.2.1 Méthodologie	151
4.7.2.2 Résultats et Discussion	152
4.8 <i>Dicoma tomentosa</i> : Discussion générale, conclusion et perspectives	154
4.9 Bibliographie (4)	155

5	CONTRIBUTION A L'ETUDE DE <i>GARDENIA SOKOTENSIS</i> Hutch.	
5.1	Avant-propos	161
5.2	<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch. : Données de la littérature	162
5.3	“ Antiplasmodial activity of <i>Gardenia sokotensis</i> Hutch. and isolation of a new moderately active 3,4-seco-cycloartane ”	166
5.3.1	Introduction	167
5.3.2	Materials and methods	169
5.3.3	Results	174
5.3.3.1	Antiplasmodial activity of crude extracts from <i>G. sokotensis</i>	174
5.3.3.2	Bioguided fractionation and activity of pure compounds	176
5.3.4	Discussion	184
5.3.5	Conclusion and perspectives ..	186
5.4	<i>Gardenia sokotensis</i> : Discussion, conclusion et perspectives	187
5.5	Bibliographie (5)	189
6	DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	195
7	ANNEXES	203
7.1	Production scientifique supplémentaire	204
7.2	Charte éthique de Jardins du monde	213
7.3	Comparaison par CCM de <i>Psorospermum senegalense</i> et <i>P. guineense</i>	215
7.4	Modes opératoires pour le screening phytochimique	216
7.5	Spectres RMN de l'UA15OA	221
7.6	Spectres RMN de la sokotensine A	225

Liste des abbréviations

ACT: Artemisinin-based combination therapy	ITM: Improved Traditional Medicine
APAD: 3-acetyl pyridine adenine dinucleotide	JDM : « Jardins du monde »
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	MDR : Multi-Drug Resistance
CH₂Cl₂: Dichlorométhane	MeOH : Méthanol
CCM: Chromatographie sur Couche Mince	MS : Mass Spectrometry
CMC: Concentration Minimale Clastogène	MT : Médecine Traditionnelle
CQ: Chloroquine	MTA : Médicament Traditionnel Amélioré
DAD: Diode Array Detector	ND : Non Déterminé
DCM : Dichlorométhane	NMR : Nuclear Magnetic Resonance
DCVC: Dry Column Vacuum Chromatography	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
DDT: Dichlorodiphényltrichloroethane	ONG : Organisation non gouvernementale
DGPML : Direction Générale de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires	po: per os (administration)
DMPT : Direction pour la promotion de la Médecine et de la Pharmacopée Traditionnelles	PG: <i>Psorospermum guineense</i>
DT: <i>Dicoma tomentosa</i>	PNUD : Programme des Nations Unies pour le Développement
EMEA : Agence Européenne du Médicament	PS: <i>Psorospermum senegalense</i>
EtOAc: acetate d'éthyle	RITAM: Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods
EtOH: Ethanol	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
GGR : Global Growth Ratio	SI: Selectivity Index
GS: <i>Gardenia sokotensis</i>	sp : espèce (végétale)
GSD: <i>G. sokotensis</i> dichloromethane extract	TLC: Thin Layer Chromatography
GSH: <i>G. sokotensis</i> hexane extract	UA15OA: Urospermal A 15-O-acetate
H₂O: eau	UV: Ultra-Violet
HMPC: Herbal Medicinal Products Committee	vs: <i>versus</i>
HPLC: High Performance Liquid Chromatography	VMQ: Vidéomicroscopie Quantitative
IC₅₀: Inhibitory Concentration 50%	WANNPRES : West African Network of Natural Products Research Scientists
ip: intra-péritoneal (administration)	WHO: World Health Organization
IR: Infra-Rouge	ΔT: chauffage

Liste des figures

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1-1 : Moustique anophèle lors d'un repas sanguin

Figure 1-2 : Répartition mondiale des principaux *Anopheles sp.* vecteurs de la malaria (Kiszewski, 2004)

Figure 1-3 : Distribution des espèces de *Plasmodium* en fonction de l'hôte (d'après Prugnolle et al. 2010)

Figure 1-4 : Répartition des infections à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. falciparum + P. vivax* (Feachem et al., 2010)

Figure 1-5 : Cycles de développement du *Plasmodium* chez l'homme et l'anophèle (Pasvol, 2010)

Figure 1-6: Frottis sanguins coloré au Giemsa de globules rouges infectés par *P. falciparum* : trophozoïtes (gauche) et schizontes (droite)

Figure 1-7 : Globules rouges parasités libérant des mérozoïtes

Figure 1-8 : Carte mondiale des pays à risque de malaria en 2010 (WHO, 2011)

Figure 1-9 : Répartition mondiale des cas (total : 219 000 000) et des décès (total : 655 000) attribués au paludisme en 2010 (WHO, 2012)

Figure 1-10 : Lien entre niveau de pauvreté et malaria (Dunavan, 2005)

Figure 1-11 : Quinine et quinquina (*Cinchona sp.*) http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cinchona_officialis_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-180.jpg

Figure 1-12 : Chloroquine, primaquine, méfloquine

Figure 1-13 : Proguanil, pyriméthamine et sulfadoxine

Figure 1-14 : *Tabebuia chrysostricha*, lapachol et atovaquone

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3e/1p%C3%AA_%28Avar%C3%A9%29_REFON.jpg

Figure 1-15 : Doxycycline et azithromycine

Figure 1-16 : *Artemisia annua*, artémisinine et dérivés (Dihydroartémisinine: R =H ; Artéméter: R=CH₃, Artéether: R: CH₂CH₃; Artésunate: COCH₂CH₂COOH)

Figure 1-17 : Distribution des résistances aux principaux traitements antipaludiques (WHO, 2009)

Figure 1-18 : Pays touchés par la malaria pour lesquels une résistance aux insecticides à été identifiée chez au moins un de leurs principaux vecteurs (WHO, 2012)

Figure 1-19 : Illustration de l'importance des substances naturelles et de leurs dérivés pour les anti-infectieux

Figure 1-20 : Herboriste sur le marché de Koudougou (Photo : JDM©)

Figure 1-21 : Criblage antiplasmodial *in vitro* d'extraits végétaux sur *P. falciparum*

Figure 1-22 : Quelques exemples de réalisations de Jardins du monde

Figure 1-23 : N'dribala préparé à partir des racines de *C. planchonii* (en bas, ci-contre) et Sumafoura préparé à partir des parties aériennes d'*A. mexicana* (en haut, Photo du Dr Jacques Falquet, dans [Graz, 2010])

Figure 1-24 : Carte du Burkina Faso (45 provinces) source : www.worldmapfinder.com

Figure 1-25 : Savane arborée, province du Sanguié, saison sèche et saison humide

Figure 1-26 : Répartition géographique des principales ethnies au Burkina Faso

Figure 1-27 : Endémicité de *P. falciparum* (MAP, 2010) et distribution des cas confirmés de paludisme (WHO, 2012)

Figure 1-28 : Protection d'un enfant contre les mauvais esprits (feuilles de neem – *Azadirachta indica*)
Photo : © IRD

2 ENQUÊTES ETHNOBOTANIQUES, SÉLECTION DES PLANTES D'INTÉRÊT ET COLLECTES DES ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX

Figure 2-1 : Photos de 4 plantes recensées mais non sélectionnées : 1. *Cochlospermum tinctorium*, 2. *Vernonia colorata*, 3. *Combretum micranthum*, 4. *Azadirachta indica* (source JDM)

Figure 2-2 : Zones de collecte des échantillons au Burkina Faso

Figure 2-3 : Quelques photos des plantes récoltées

3 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DES EXTRAITS SUR *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Figure 3-1: Classification of the species according to antiplasmodial IC₅₀

Figure 3-2: Inhibition of *P. falciparum* 3D7 growth according to log concentration for the 4 most active extracts

4 CONTRIBUTION A L'ETUDE DE *DICOMA TOMENTOSA* Cass. (ASTERACEAE)

Figure 4-1 : *D. tomentosa*, vue générale

Figure 4-2 : *D. tomentosa*, tiges feuillées

Figure 4-3 : *D. tomentosa*, fleur

Figure 4-4 et 4-5 : *D. tomentosa*, feuilles (face inférieure) et rameaux

Figure 4-6 : Lactones sesquiterpéniques de *D. tomentosa*

Figure 4-7 : Flavonoïdes de *D. tomentosa*

Figure 4-8 : Profil CCM des terpènes de différents extraits de *D. tomentosa*

Figure 4-9 : Profil CCM des flavonoïdes et acides phénols de différents extraits de *D. tomentosa*

Figure 4-10 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux ($\lambda = 230\text{nm}$)

Figure 4-11 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux ($\lambda = 340\text{nm}$)

Figure 4-12: *In vivo* antiplasmodial activity of *Dicoma tomentosa* extracts

Figure 4-13: TLC analysis of *D. tomentosa* extracts tested *in vitro* for antiplasmodial activity

Figure 4-14: Bioguided fractionation of *D. tomentosa* : TLC profiles of total CH₂Cl₂ extract, E1 and E2 (= successive hexane and CH₂Cl₂ extracts) and IC₅₀ in $\mu\text{g/ml}$ (*P. falciparum* 3D7)

Fig 4-15: Bioguided fractionation of *D. tomentosa* : TLC of the fractions collected from preparative HPLC (E2) and IC₅₀ in $\mu\text{g/ml}$ (*P. falciparum* 3D7)

Figure 4-16 : NMR ¹H spectrum of urospermal A 15-O-acetate

Figure 4-17 : NMR ¹³C spectrum of urospermal A 15-O-acetate

Figure 4-18 : compound 1 = urospermal A-15-O-acetate (MM = 320.34)

Figure 4-19 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux ($\lambda = 230\text{nm}$)

Figure 4-20 : Processus de formation des micronoyaux.

Figure 4-21 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait CH₂Cl₂ de *D. tomentosa*

Figure 4-22 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait MeOH de *D. tomentosa*

Figure 4-23 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait aqueux de *D. tomentosa*

Figure 4-24 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'urospermal A 15-O-acetate

Figure 4-25 : Inhibition de la croissance cellulaire en fonction du log de la concentration après exposition à l'UA150A (72h) et IC_{50} (μ M) calculées pour les différentes lignées

Figure 4-26 : Dispositif pour l'analyse par vidéomicroscopie quantitative (© R. Kiss)

Figure 4-27 : Photos des cellules SKMEL-28 (mélanome humain) traitées par l'UA150A 15 μ M (TT) vs control à 24h, 48h et 72h (CT) et calcul du GGR

Figure 4-28 : Photos des cellules U373n (glioblastome humain) traitées par l'UA150A 5 μ M (TT) vs control (CT) à 24h, 48h et 72h et calcul du GGR.

5 CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE *GARDENIA SOKOTENSIS* Hutch. (RUBIACEAE)

Figure 5-1 : *G. sokotensis*, vue générale

Figure 5-2 : *G. sokotensis*, fleur et feuilles

Figure 5-3 : *G. sokotensis*, fleur et feuilles

Figure 5-4 : *G. sokotensis*, fruit (haut) et bourgeon terminal résineux (droite)

Figure 5-5 : Bioguided fractionation : scheme of extraction

Figure 5-6: TLC profiles of *Gardenia sokotensis* crude extracts (terpenes)

Figure 5-7: TLC profile of the same CH_2Cl_2 extract from *G. sokotensis* kept in the dark (D-left) and exposed to light (L-right) during 4 hours

Figure 5-8 : TLC profile of extracts obtained by successive extractions of *G. sokotensis* leaves by hexane (GSH) followed by dichloromethane (GSD)

Figure 5-9: Bioguided fractionation : TLC profiles and antiplasmodial IC_{50} (μ g/ml) of GSD extract and fractions (F1-F13) obtained from the preparative HPLC (yield are given in mg)

Figure 5-10: TLC of compounds isolated from *G. sokotensis*

Figure 5-11 : Structure of compound 1 (sokotensine A) $C_{30}H_{44}O_5$ (MM = 484.3)

Figure 5-12: 1H NMR spectrum of sokotensine A

Figure 5-13: ^{13}C NMR spectrum of sokotensine A

Figure 5-14 : TLC analysis of aqueous decoctions prepared at pH6, pH8 ($NaHCO_3$) and pH11 (Na_2CO_3)

Liste des Tableaux

2 ENQUÊTES ETHNOBOTANIQUES, SÉLECTION DES PLANTES D'INTÉRÊT ET COLLECTES DES ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX

Tableau 2-1 : Liste des espèces recensées pour leur usage traditionnel dans le soin du paludisme au Burkina Faso

Tableau 2-2 : Espèces végétales sélectionnées pour l'étude de leurs potentialités antiplasmodiales

Tableau 2-3 : Echantillons de plantes récoltés au Burkina Faso

3 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DES EXTRAITS SUR *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Table 3-1: Selected plants and collected samples

Table 3-2: Antiplasmodial activity (IC_{50}) of the 51 extracts against *Plasmodium falciparum* 3D7 strain.

Table 3-3: Antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (3D7 and W2 strains) and cytotoxicity on WI-38 normal human fibroblasts, for the most active extracts

4 CONTRIBUTION A L'ETUDE DE *DICOMA TOMENTOSA* Cass. (ASTERACEAE)

Table 4-1 : *In vitro* anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts obtained from *Dicoma tomentosa* (n = 3)

Table 4-2: Spectroscopic data of compound 1

Table 4-3 : *In vitro* anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts and pure compound (1) obtained from *Dicoma tomentosa* (n = 3)

Tableau 4-4 : Evaluation de la quantité d'UA15OA dans les extraits

Tableau 4-5 : Résumé des activités clastogéniques/aneugéniques des extraits et de l'UA15OA : Concentrations minimales clastogènes (CMC)

5 CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE *GARDENIA SOKOTENSIS* Hutch. (RUBIACEAE)

Table 5-1 : Antiplasmodial activity of the crude extracts (*P. falciparum* 3D7) obtained from *G. sokotensis* leaves

Table 5-2 : Antiplasmodial and cytotoxic activity of extracts and pure compounds.

Table 5-3 : Spectroscopic data of compound 1 (sokotensine A)

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Le paludisme

Initialement associé à la présence de zones marécageuses, d'où il tire son nom (du latin paludis, « marais »), le **paludisme** est une maladie caractérisée par des fièvres intermittentes. Également appelée **malaria** (de l'italien *mal'aria*, « mauvais air »), ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle que son agent causal fut mis en évidence. Il s'agit d'un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles*.

Cette maladie parasitaire touche principalement les pays du Sud où elle représente un problème majeur de santé publique. Malgré les moyens de prévention et les traitements existants, le paludisme reste actuellement une des maladies infectieuses parmi les plus mortelles dans le monde, avec les infections respiratoires, les maladies diarrhéiques, le VIH/SIDA et la tuberculose.

1.1.1 VECTEUR ET TRANSMISSION

Le paludisme est essentiellement transmis à l'homme par la piqûre d'un **moustique femelle** du genre *Anopheles* qui, en prenant le repas sanguin nécessaire à sa ponte, injecte le parasite à son hôte. Ces moustiques sont surtout actifs entre le coucher et le lever du soleil.



Figure 1-1 : Moustique anophèle lors d'un repas sanguin

Parmi les 484 espèces du genre *Anopheles* (Famille : *Culicidae*), seules une soixantaine d’entre elles peuvent transmettre la malaria, dont une vingtaine sont localement prédominantes. Les moustiques anophèles sont présents sur tout le globe, excepté en zone polaire et dans certaines îles du Pacifique, de l’Atlantique et de l’Océan Indien. ***Anopheles gambiae***, le principal vecteur sur le continent africain, est également un des plus efficaces en termes de transmission du parasite.

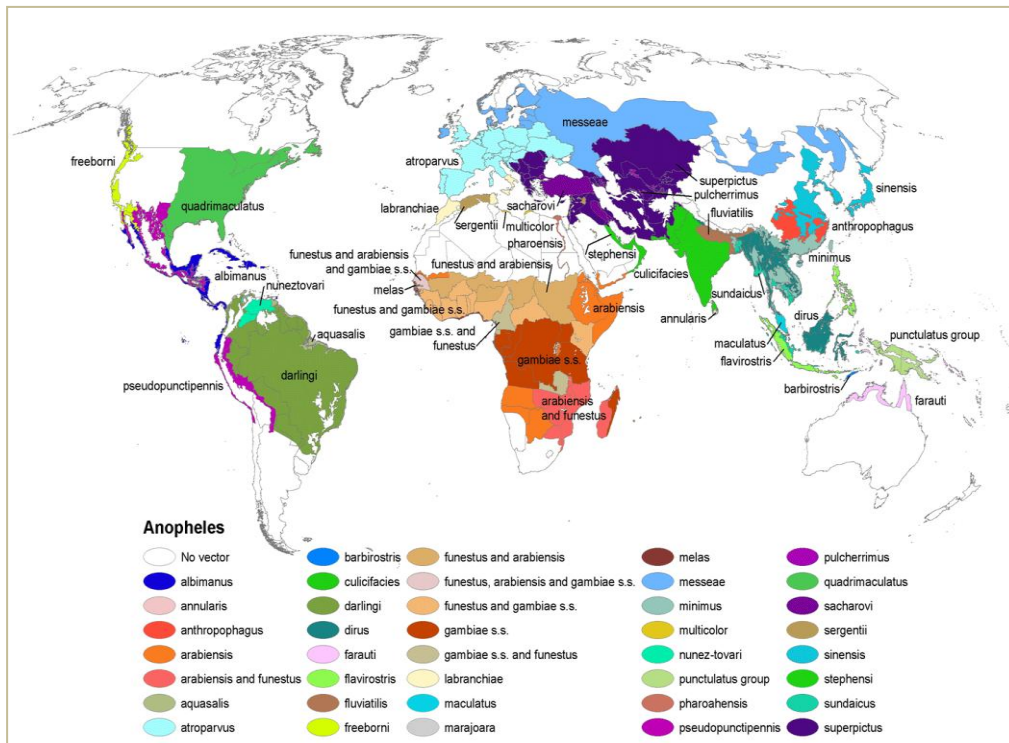


Figure 1-2 : Répartition mondiale des principaux *Anopheles sp.* vecteurs de la malaria (Kiszewski, 2004)

Les parasites peuvent aussi être transmis de la femme enceinte au fœtus par voie transplacentaire (paludisme congénital). La transfusion sanguine peut également constituer une voie alternative de contamination.

1.1.2 LE *PLASMODIUM*

1.1.2.1 Les différentes espèces

Le paludisme est causé par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* (Famille : *Plasmodiidae* ; Sous-ordre : *Haemosporidiidae* ; Ordre : *Haemosporida*).

Plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium*, parasitant des espèces animales variées (reptiles, oiseaux et mammifères) ont été décrites.

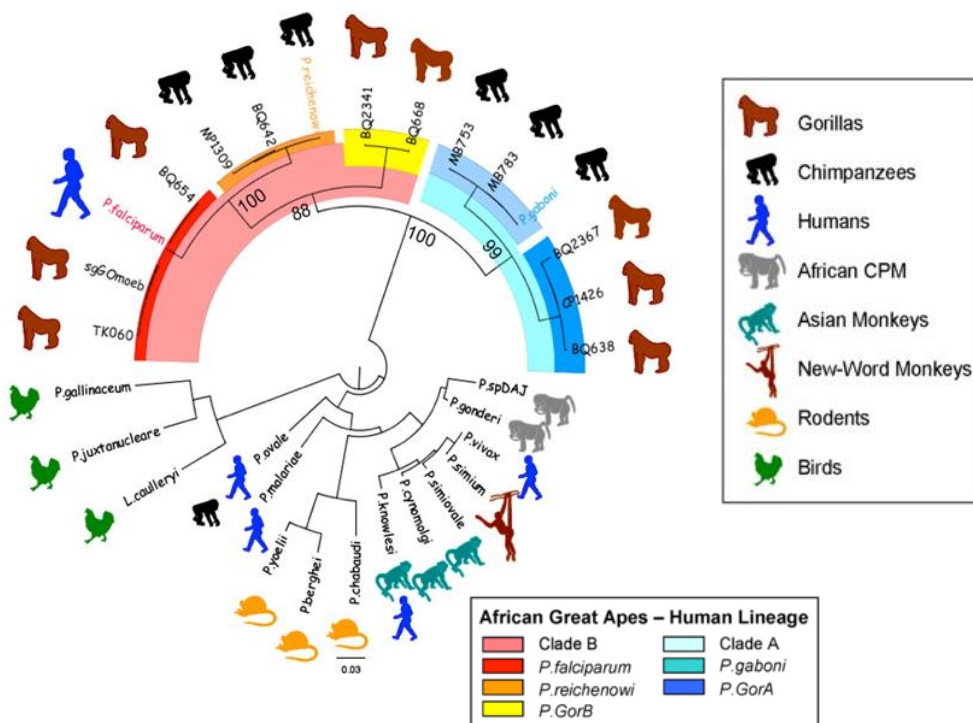


Figure 1-3 : Distribution des espèces de *Plasmodium* en fonction de l'hôte (d'après Prugnolle et al. 2010)

Cinq espèces sont capables d'infecter l'homme :

- ***Plasmodium falciparum*** : Il s'agit de l'espèce la plus pathogène et responsable de la plupart des cas mortels. Elle est présente dans les régions tropicales d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie et constitue l'espèce prépondérante en Afrique subsaharienne. *P. falciparum* se multiplie rapidement dans le sang et cause des

crises aiguës graves. Son cycle de développement dure 48h ; il est à l'origine de la fièvre tierce maligne et peut, de plus, être responsable d'une complication grave : le paludisme cérébral, aussi appelé neuropaludisme ou accès perniciosus. Celui-ci résulte de l'adhérence des parasites aux vaisseaux sanguins, obstruant les capillaires cérébraux entraînant des troubles de la conscience et un coma ; la mort peut survenir en moins de 24 heures. Par ailleurs, les séquelles neurologiques sont fréquentes chez les patients ayant survécu à la forme cérébrale de la malaria.

- ***Plasmodium vivax*** : Il s'agit, avec *P. falciparum*, d'une des espèces les plus courantes. Les 2 espèces coexistent d'ailleurs dans de nombreuses parties du monde (Figure 1-4). *P. vivax* est responsable de la fièvre tierce bénigne. Les symptômes principaux sont fièvre et splénomégalie. Les accès aigus sont moins sévères que pour *P. falciparum*. Cependant, des formes dormantes de *P. vivax* (hypnozoïtes) peuvent rester inactives dans les cellules hépatiques et se réactiver plusieurs mois voire années après la primo-infection. Cette espèce est la moins exigeante en température et on la retrouve dans certaines régions tempérées.

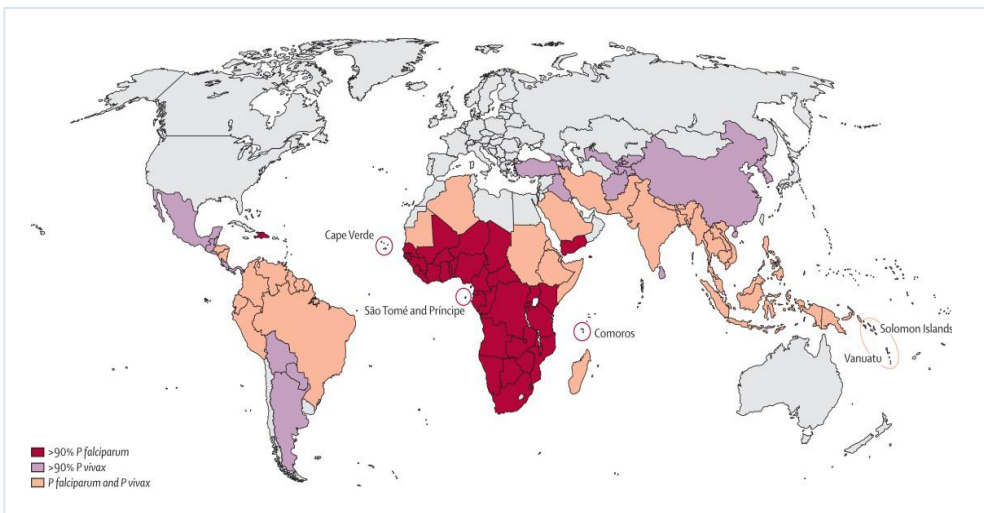


Figure 1-4 : Répartition des infections à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. falciparum* + *P. vivax* (Feachem et al., 2010)

- ***Plasmodium ovale*** : Espèce assez rare, observée essentiellement sur certaines îles du Pacifique et sur le continent africain. Proche de *P. vivax*, elle est aussi responsable de la fièvre tierce bénigne et des rechutes peuvent également être observées plusieurs mois/années après la primo-infection en raison de la présence d'hypnozoïtes restés en dormance dans le foie.

- ***Plasmodium malariae*** : Cette espèce a une distribution mondiale mais très inégale. Son cycle est de 72 heures, se traduisant par une fièvre quarte. L'infection à *P. malariae* peut devenir chronique si elle n'est pas (ou est mal) traitée et peut entraîner, à long terme, de nombreuses complications dont une anémie grave et une insuffisance rénale.

- ***Plasmodium knowlesi*** : On pensait que cette espèce était uniquement présente chez certains macaques du Sud Est asiatique mais elle a récemment été détectée chez l'homme, en Malaisie. Ce parasite possède un cycle érythrocytaire court (24h), lui conférant un potentiel important de multiplication. Des cas mortels ont été rapportés.

1.1.2.2 Cycle de développement du *Plasmodium*

Le cycle de développement du *Plasmodium* est complexe et comporte **2 étapes** essentielles : une phase de **reproduction asexuée chez l'homme** et une phase de **reproduction sexuée chez le moustique**.

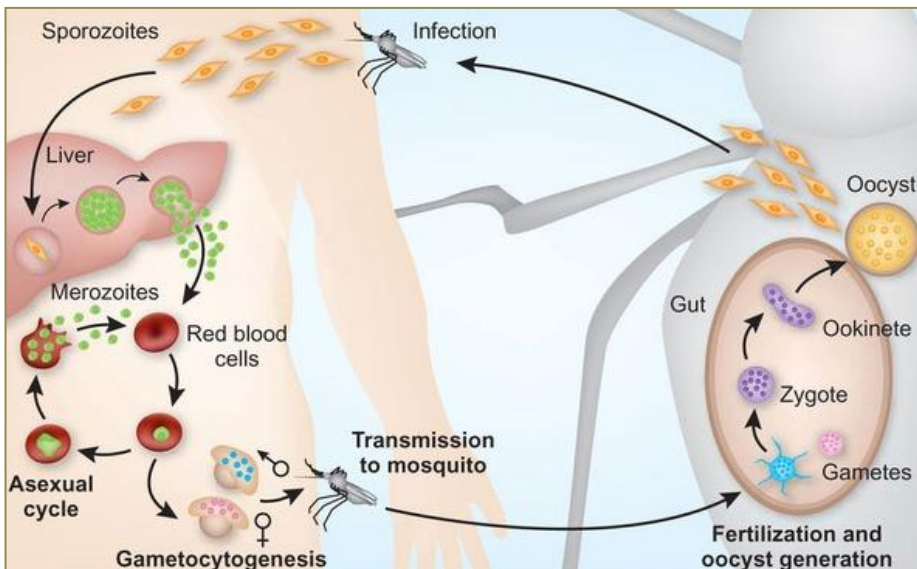


Figure 1-5 : Cycles de développement du *Plasmodium* chez l'homme et l'anophèle (Pasvol, 2010)

Chez l'homme, le parasite passe également par 2 phases de développement : l'une au niveau hépatique (cycle exoérythrocytaire) et l'autre à l'intérieur des globules rouges (cycle érythrocytaire).

Lors de la piqûre par un moustique anophèle femelle infecté, celui-ci injecte à l'homme le parasite sous forme de **sporozoïtes**. Ces derniers passent dans la circulation sanguine et migrent rapidement vers le foie. Ils pénètrent alors dans les cellules hépatiques et s'y divisent activement pour se transformer en **schizontes**. Finalement, la cellule hépatique éclate et libère des centaines de **mérozoïtes** dans le sang où ils pénètrent à l'intérieur des hématies pour s'y multiplier. Cependant, certains mérozoïtes peuvent rester au niveau du foie et se différencier en formes dormantes ou hypnozoïtes. Ce phénomène est observé pour *P. vivax* et *P. ovale* et est à l'origine de rechutes tardives.

Une fois dans le globule rouge, le **mérozoïte** prend une forme « en anneau » appelé **trophozoïte**. Celui-ci subira une maturation jusqu'au stade **schizonte**, contenant lui-même de nombreux mérozoïtes. Les globules rouges infectés éclatent alors et les mérozoïtes sont libérés dans la circulation, infectant des nouveaux globules rouges ; et un nouveau cycle érythrocytaire recommence.

La durée du cycle érythrocytaire varie selon les espèces. Elle est de 48h pour *P. falciparum*. Au bout de quelques cycles, des parasites se différencient en **gamétocytes** sexués mâles et femelles à l'intérieur des globules rouges. Lorsqu'un moustique pique un individu infecté, il ingère ces gamétocytes, qui se transforment en gamètes. Leur fécondation engendre l'apparition d'un zygote qui se différencie en oocyste dans le tube digestif du moustique. Les oocystes produisent alors des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires du moustique et seront injectés dans le sang d'un nouvel hôte lors de la prochaine piqûre.

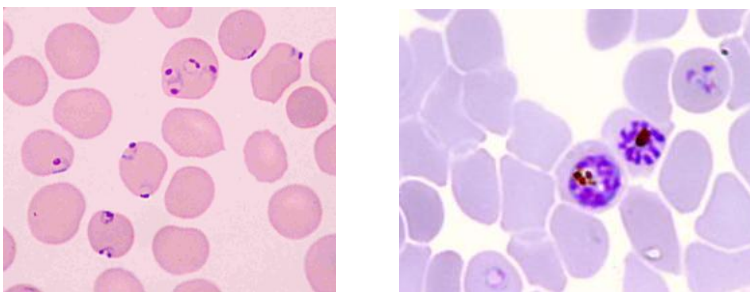


Figure 1-6: Frottis sanguins coloré au Giemsa de globules rouges infectés par *P. falciparum* : trophozoïtes (gauche) et schizontes (droite)

1.1.3 ASPECTS CLINIQUES

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses et dépendent notamment de l'espèce de *Plasmodium* en cause. Une période d'incubation, de +/- 8 à 15 jours, précède les premiers symptômes. La fièvre est le symptôme prédominant. Celle-ci s'accompagne souvent de céphalées intenses, de douleurs musculaires, de vomissements, d'un affaiblissement, de diarrhées ou encore de toux. Le patient peut ensuite devenir asymptomatique jusqu'au prochain épisode. Des cycles typiques alternant fièvre, tremblements avec sueurs froides et transpiration intense, peuvent alors survenir : c'est l'accès palustre. La périodicité de ces cycles dépend de l'espèce de *Plasmodium* en cause et coïncide avec la multiplication des parasites et l'éclatement des hématies, qui conduit également à de l'anémie.

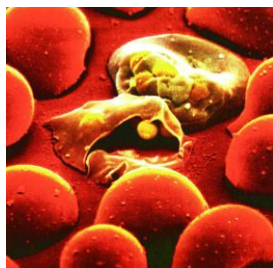


Figure 1-7 : Globules rouges parasités libérant des mérozoïtes

En cas de paludisme chronique, d'autres symptômes tels ictère, hépatomégalie et splénomégalie peuvent être observés. Anémie chronique, détresse respiratoire, hémoglobinurie et défaillance rénale sont les complications graves les plus fréquentes.

L'infection aiguë à *P. falciparum* peut être fatale si elle n'est pas traitée. L'accès pernicieux représente la complication la plus sévère : les hématies parasitées forment des adhérences dans les microcapillaires des tissus profonds, notamment au niveau du cerveau, entraînant une hypoxie cérébrale fatale.

Dans les pays hautement endémiques, les habitants développent une immunité suite à des infections répétées par piqûres de moustiques. Cette prémunition les protège partiellement contre la survenue d'accès graves. Ces personnes peuvent être porteuses asymptomatiques du parasite qu'elles tolèrent, mais elles souffrent fréquemment d'anémie.

1.1.4 EPIDÉMIOLOGIE – IMPACT SOCIO-ÉCONOMIQUE

Selon l’OMS, près de la moitié de la population mondiale (soit 3,3 milliards de personnes) vit dans des zones à risque de paludisme (Fig. 1-8). Une centaine de pays sont touchés, en particulier dans les zones tropicales et défavorisées d’Afrique, d’Asie et d’Amérique latine.

Les conditions climatiques (pluies, humidité relative, changements saisonniers de température) constituent des facteurs importants qui influencent le degré de transmission et la distribution géographique de la maladie.

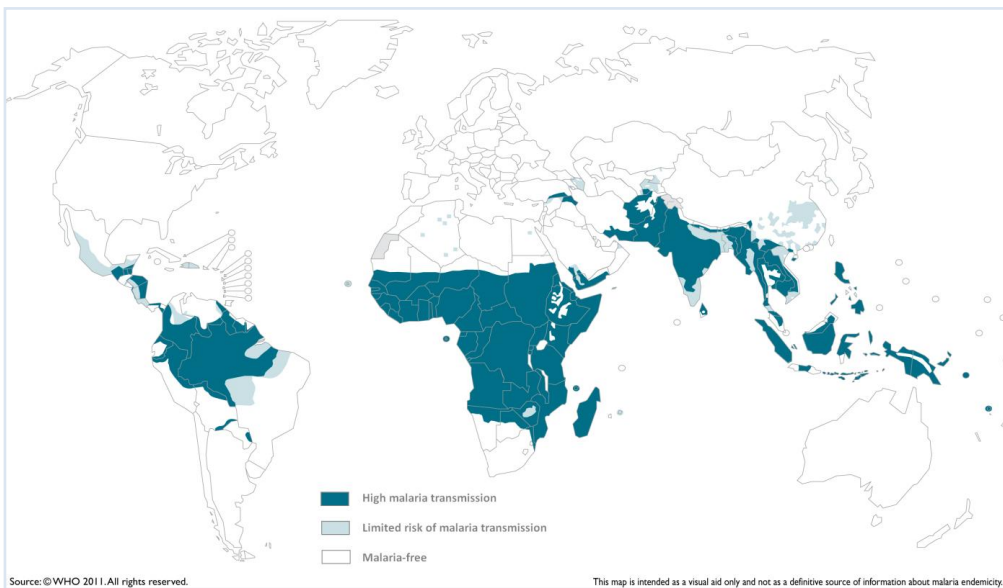


Figure 1-8 : Carte mondiale des pays à risque de malaria en 2010 (WHO, 2011)

Pour l’année 2010, les dernières estimations mondiales de l’OMS font état de 219 millions de cas de paludisme et de 660 000 décès. L’Afrique est de loin la région la plus affectée par la maladie avec plus de 80% des cas et plus de 90% des décès enregistrés sur ce continent [WHO, 2012a].

Les femmes enceintes, les nourrissons et les personnes infectées par le VIH constituent des groupes à haut risque de complications fatales associées au paludisme.

La grande majorité (> 85%) des décès liés au paludisme concernent des enfants de moins de 5 ans vivant en Afrique, où la malaria représenterait environ 20% de la mortalité infantile. On estime qu'un enfant africain meurt de paludisme toutes les 45 secondes.

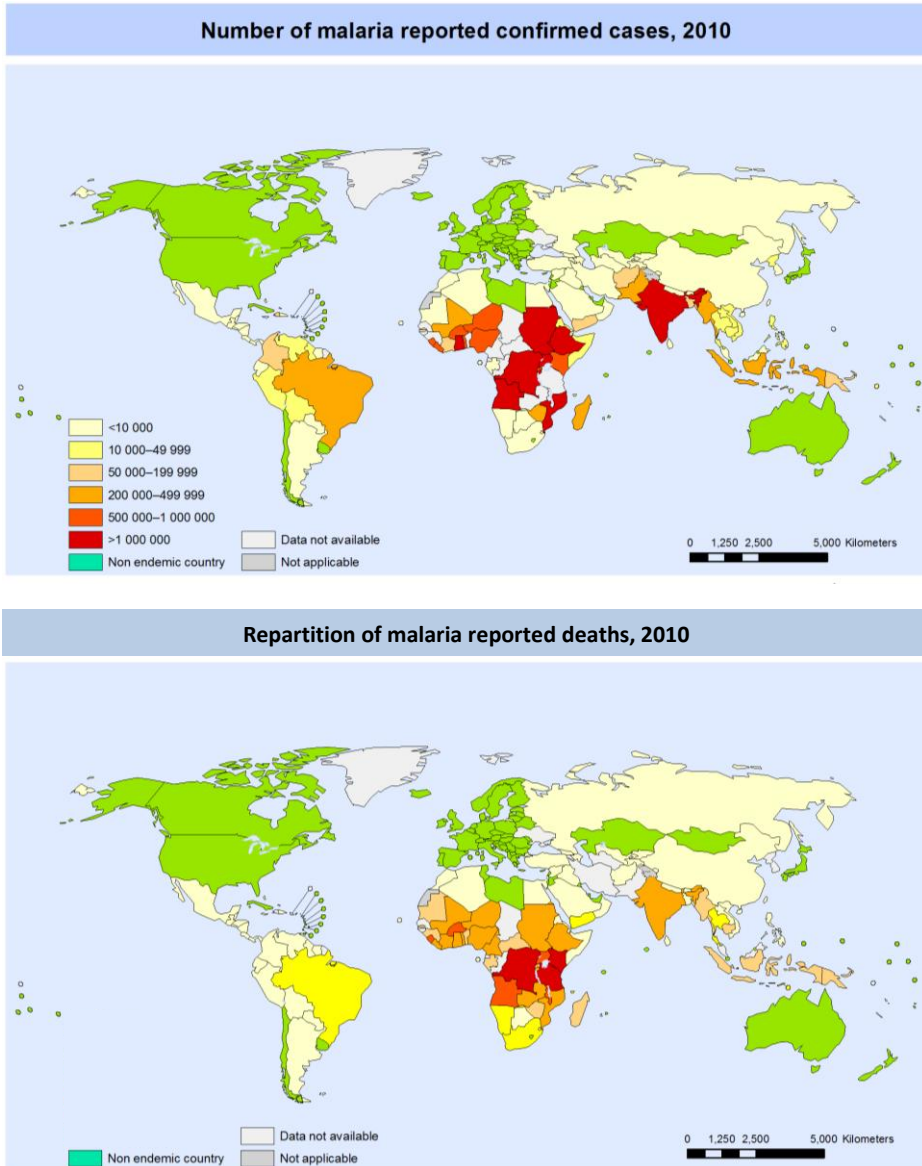


Figure 1-9 : Répartition mondiale des cas (total : 219 000 000) et des décès (total : 655000) attribués au paludisme en 2010 [WHO, 2012]

La sévérité de la maladie en Afrique peut en partie s'expliquer par la présence majoritaire de l'espèce *P. falciparum*, responsable des formes graves de la maladie (voir 1.1.2). La large distribution africaine de l'*Anopheles gambiae* (voir 1.1.1), vecteur particulièrement efficace favorisant une transmission intense du parasite, est un second facteur aggravant l'impact de la maladie sur le continent africain.

Le World Malaria Report de 2011 [WHO, 2011a] met en évidence un recul global du paludisme entre 2000 et 2010 avec une diminution de 17% du nombre de cas et une réduction d'environ 25% de la mortalité au cours de cette période. L'OMS attribue ces résultats positifs aux efforts accrus mis en œuvre au cours de cette dernière décennie pour contrôler la maladie. Les actions axées sur la prévention (principalement par la distribution de moustiquaires imprégnées d'insecticides dans les zones à haut risque), combinées à un diagnostic plus efficace (tests de détection rapide) ainsi qu'à une meilleure disponibilité des traitements recommandés - tels les thérapies combinées à base d'artémisinine (ACT) - auprès des populations touchées, sont identifiées comme les principaux facteurs de ce progrès.

Selon d'autres sources [Murray et al., 2012], la mortalité associée au paludisme serait toutefois sous-estimée dans les chiffres de l'OMS. Cette étude estime la mortalité globale associée à la malaria à 1 238 000 personnes dont 1 133 000 en Afrique pour la même année 2010.

En plus des pertes humaines, le paludisme a également un impact socio-économique majeur pour les pays touchés, en particulier en Afrique, où il constitue un véritable frein au développement économique et social.

Le lien entre paludisme et pauvreté est clairement établi (**Figure 1-10**). La maladie n'est pas seulement une conséquence de la pauvreté mais constitue également une de ses causes, entraînant les populations concernées dans un cercle vicieux de la pauvreté [Sachs, 2002 ; Malaney, 2005 ; Teklehaimanot, 2008].

D'une part, les zones les plus pauvres de la planète coïncident avec les zones d'endémicité et de haute transmission de la maladie, constituant un terrain favorable à son développement. De plus, le niveau élevé de pauvreté des zones tropicales les plus touchées limite l'accès aux services de santé par les populations locales qui n'ont généralement pas les moyens financiers pour acquérir les traitements et moyens de prévention qui permettraient de réduire l'impact de la maladie.

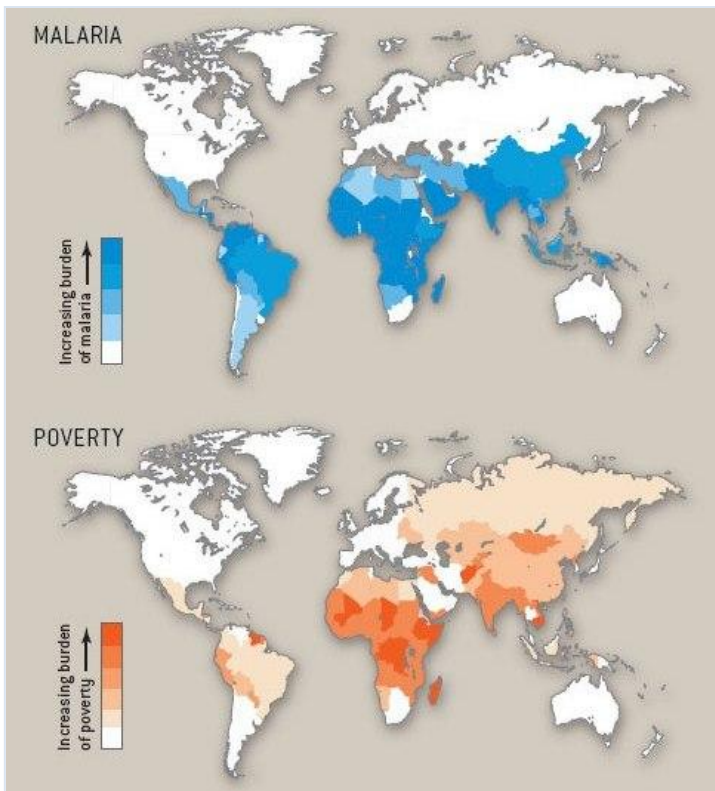


Figure 1-10 : Lien entre niveau de pauvreté et malaria (Dunavan, 2005)

D'autre part, le paludisme, par ses conséquences sur la santé des populations fortement exposées, ralentit le développement économique des pays. Aux coûts directs associés à la maladie incluant la prise en charge de la prévention, des traitements et de l'accès aux services de santé s'ajoutent les coûts indirects tels une productivité globale réduite ainsi qu'un impact négatif sur l'apprentissage scolaire (absentéisme et séquelles neurologiques). Toutes ces composantes ne font qu'entretenir l'état de pauvreté des pays touchés.

Le PIB des pays situés en région d'endémicité est en effet en moyenne inférieur à celui des pays non endémiques. Il a été estimé que la maladie coûterait chaque année 12 milliards de dollars à l'Afrique. Dans les pays les plus touchés, la maladie représente souvent la 1^{ère} cause de consultations médicales et d'hospitalisations tandis que les frais associés à la prévention et la prise en charge médicale du paludisme grèvent véritablement les budgets nationaux en matière de santé [WHO, 2012 et 2013].

1.1.5 LUTTE CONTRE LE PALUDISME

En 1998, le partenariat « Roll Back Malaria », impliquant diverses institutions internationales (OMS, UNICEF, PNUD, Banque mondiale), ONG, gouvernements des pays endémiques, ainsi que secteurs privés et académiques, fut mis sur pied afin d'établir des mesures globales pour combattre la maladie, en particulier en Afrique où elle est la plus meurtrière. Le programme associe de nombreux axes d'action (prévention, diagnostic, traitement, surveillance des phénomènes de résistances, etc) afin d'assurer le contrôle de la maladie et de tendre vers son éradication [Roll Back Malaria, 2013].

La lutte contre la malaria fait également partie des « Objectifs du Millénaire pour le Développement » (OMD), dont l'objectif n°6 est de stopper la progression de la malaria et commencer sa régression pour 2015. La maîtrise du paludisme a également un impact sur d'autres OMD, relatifs à la réduction de la pauvreté et à la santé maternelle et infantile.

Le budget nécessaire estimé pour mettre en œuvre les mesures prévues en Afrique (moustiquaires, tests de diagnostic et médicaments) s'élèverait à 6,8 milliards d'US\$ pour la période 2013-2015 [WHO, 2012a].

1.1.5.1 – Moyens de prévention

Protection contre le vecteur

L'utilisation de **moustiquaires imprégnées** de perméthrine ou deltaméthrine constitue certainement le meilleur moyen de prévention contre le paludisme. Leur utilisation semble avoir un impact favorable sur la mortalité infantile. Les pays où les campagnes de distributions de moustiquaires imprégnées ont été le mieux suivies semblent également ceux où l'incidence de la malaria ont le plus diminué. Le nombre de ménages possédant au moins 1 moustiquaire imprégnée a augmenté drastiquement entre 2006 et 2008 (de 17% à 31% des ménages, respectivement) [WHO, 2009]. La couverture des populations par moustiquaires imprégnées est cependant en recul depuis 2010 [WHO, 2012a].

La **pulvérisation d'insecticides rémanents**, notamment le DDT, constitue un autre moyen de contrôle du vecteur et fut d'ailleurs largement utilisée il y a quelques dizaines d'années. En raison de son impact négatif sur la santé humaine et sur l'environnement, la production et l'utilisation du DDT sont aujourd'hui strictement réglementées. La Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants autorise une dérogation pour la lutte contre les vecteurs de maladies. Seuls 5% de la population globale à risque serait actuellement couverte par ce type d'intervention [WHO, 2012a].

L'assainissement des zones humides stagnantes et la destruction des larves de moustiques, afin de réduire la population de vecteur et limiter ainsi la transmission, peuvent également être efficaces dans certaines zones spécifiques.

D'autres moyens de lutte contre le vecteur, comme la protection physique des parties du corps exposées et l'utilisation de répulsifs, sont également utiles.

Chimioprophylaxie

Elle doit être réservée aux groupes à risques de développer des complications graves.

Parmi ceux-ci, les **voyageurs** provenant de zone épargnée par la maladie vers des zones endémiques de malaria semblent particulièrement susceptibles de développer des accès graves. Le médicament de choix est déterminé en fonction de la zone à visiter, classée A, B, C par l'OMS, en fonction du niveau de résistance aux antipaludiques. Les plus fréquemment utilisés sont l'association atovaquone + proguanil (Malarone[®]), la doxycycline et la méfloquine (Lariam[®]) ; la chloroquine n'est plus utilisée que dans les rares zones indemnes de résistances.

Un **traitement préventif intermittent** (TPI) est également indiqué chez la **femme enceinte** dans les pays d'Afrique sub-saharienne présentant une endémicité stable à *P. falciparum*. Le TPI est constitué de 2 doses de l'association sulfadoxine - pyriméthamine lors des 2 premières visites prénatales [WHO, 2011b]. Très récemment, l'OMS a mis en place un programme de prévention saisonnière de la malaria chez les **enfants de 3 à 59 mois** qui consiste en l'administration d'une association sulfadoxine-pyriméthamine + amodiaquine [WHO, 2012b].

Vaccin

L'élaboration de vaccins contre le paludisme a été tentée par différentes équipes et plusieurs candidats sont à l'étude mais jusqu'à aujourd'hui, aucun d'entre eux n'a montré d'efficacité satisfaisante à long terme. En effet, l'immunité acquise n'est que partielle et de plus, diminue rapidement avec le temps. Une des difficultés majeures dans la mise au point d'un vaccin efficace contre le *Plasmodium* est son cycle complexe de développement, passant successivement par plusieurs stades, avec des phases d'intense multiplication asexuée chez l'homme et une phase de reproduction sexuée chez l'insecte. A l'issue de chaque stade, un parasite d'une forme différente - donc porteur d'antigènes différents et induisant des réponses immunitaires différentes - est libéré, compliquant d'autant plus la recherche d'un vaccin [Good, 2011].

Un candidat vaccin contre *P. falciparum*, connu sous le nom de RTS,S/AS01, est actuellement en étude clinique de phase III dans 7 pays africains. Il s'agirait du premier vaccin dirigé contre un parasite. Les premiers résultats font cependant état d'une protection partielle et de courte durée. Les résultats définitifs sont attendus pour 2014.

1.1.6.2 Traitements

Parmi les moyens pour contrôler la maladie, la prise en charge des cas de paludisme par l'administration d'un traitement adéquat est primordiale afin de réduire la mortalité. Un traitement efficace et une bonne compliance du patient à celui-ci réduisent également les risques que le parasite développe des résistances aux médicaments disponibles (voir 1.1.6.3).

Plusieurs substances antipaludiques, d'origine naturelle et synthétique, sont utilisées en thérapeutique dans la prise en charge du paludisme. Elles sont classées ci-dessous selon leur mode ou site d'action sur le *Plasmodium*.

Composés interférant dans la détoxification de l'hème

Le tout premier antipaludéen connu fut l'écorce de quinquina (*Cinchona sp.*) de laquelle la **quinine** fut isolée par Pelletier en 1820. Toujours utilisée en

thérapeutique, celle-ci est un alcaloïde quinoléique possédant des propriétés schizonticides. Elle inhibe la formation de l'hémozoïne (produit de détoxification de l'hème) dans la vacuole digestive du parasite. L'hème, lui-même issu de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium*, s'accumule et devient alors toxique pour le parasite. La quinine agirait également par d'autres modes d'action complémentaires, notamment en bloquant la synthèse protéique.

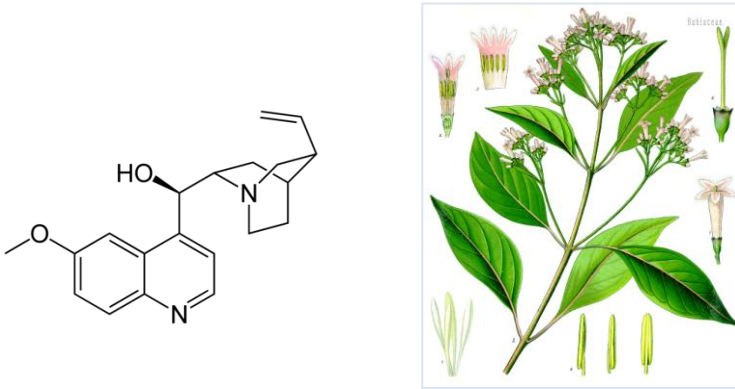


Figure 1-11 : Quinine et quinquina (*Cinchona sp.*)

Plusieurs dérivés synthétiques à noyau 4-amino-quinoléine (**chloroquine** et **amodiaquine**) et à noyau 8-amino-quinoléine (**primaquine**) ainsi que d'autres dérivés plus lointains (**méfloquine**, **luméfántrine**) font également partie de l'arsenal thérapeutique. La primaquine est une des rares molécules active sur les hypnozoïtes hépatiques. La chloroquine fut très largement utilisée dans le monde ce qui mena inévitablement à l'apparition de résistance.

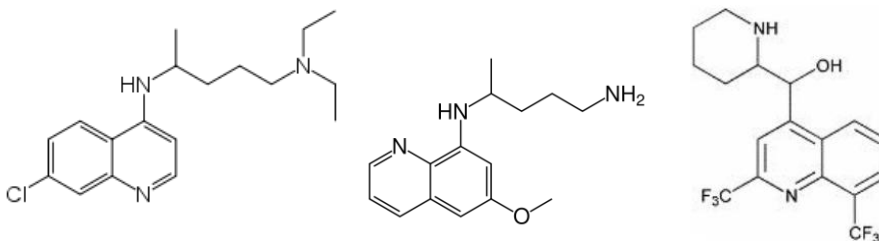


Figure 1-12 : Chloroquine, primaquine, méfloquine

Composés interférant dans la synthèse d'acides nucléiques

Le **proguanil** est une *prodrogue*. La forme triazinique active, résultant de sa cyclisation par déhydrogénation, est un « antimétabolite » de type antifolinique plus actif chez le parasite que chez l'homme. Il bloque la synthèse des acides nucléiques chez le *Plasmodium* par inhibition de la dihydrofolate réductase.

La **pyriméthamine** est un analogue de la forme active du proguanil. Elle agit également comme inhibiteur de la dihydrofolate réductase.

La **sulfadoxine** est une sulfonamide qui agit comme analogue compétitif de l'acide para-amino-benzoïque indispensable à la synthèse de l'acide folique. Elle est utilisée en association avec la pyriméthamine (Fansidar®) en traitement préventif chez la femme enceinte.

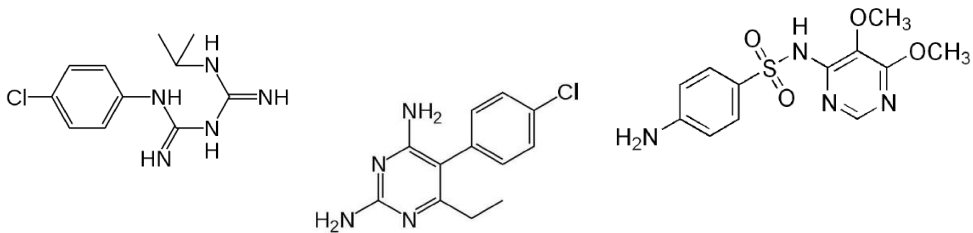


Figure 1-13 : Proguanil, pyriméthamine et sulfadoxine

L'**atovaquone**, associée au proguanil dans la spécialité Malarone®, est une naphtoquinone, inspirée d'un dérivé du lapachol, une substance naturelle isolée de *Tabebuia chrysostricha*.

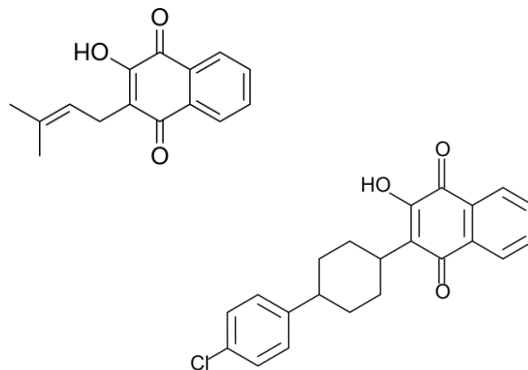


Figure 1-14 : *Tabebuia chrysostricha*, lapachol et atovaquone

Composés interférant dans la synthèse protéique

Des antibiotiques tels que des tétracyclines (**doxycycline**) et les macrolides (**azithromycine**), sont utilisés en association, notamment avec la quinine, dans les régions où il règne une résistance à la chloroquine.

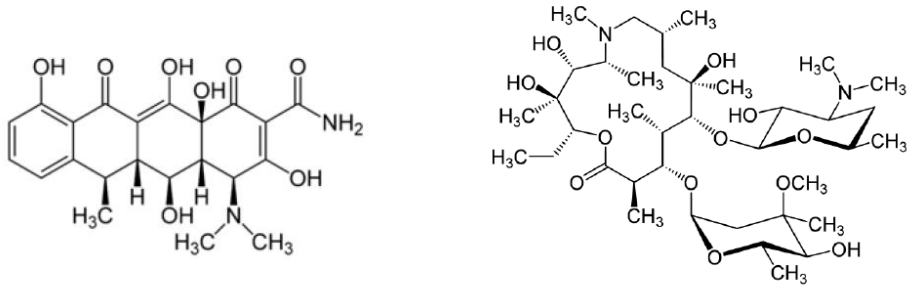


Figure 1-15 : Doxycycline et azithromycine

Composés induisant un stress oxydatif

En 1972, une lactone sesquiterpénique appelée **artémisinine**, fut isolée à partir d'*Artemisia annua* (Qinghao), une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise depuis plus de 2000 ans, notamment pour soigner les fièvres et le paludisme. L'artémisinine s'est montrée hautement active sur toutes les phases du cycle intraérythrocytaire de *P. falciparum*. Son mode d'action implique une rupture du pont endoperoxyde (catalysée par le Fe^{2+}) provoquant un stress oxydatif par libération de radicaux libres qui interagissent avec les cibles biologiques du parasite. D'autres modes d'action, notamment une interaction avec la Ca^{++} -ATPase membranaire du réticulum endoplasmique du parasite, sont également décrits.

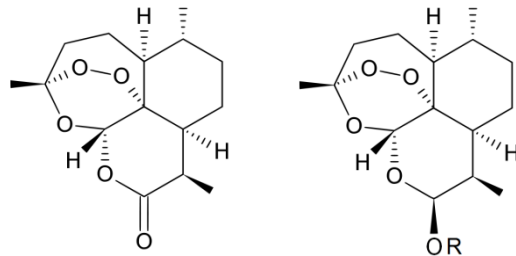


Figure 1-16 : *Artemisia annua*, artémisinine et dérivés (Dihydroartémisinine: R=H ; Artéméther: R= CH_3 , Artéether: R: CH_2CH_3 ; Artésunate: $COCH_2CH_2COOH$)

En raison de sa faible solubilité dans l'eau, l'artémisinine est peu résorbée et présente une faible biodisponibilité orale. Elle n'est que rarement utilisée telle quelle en thérapeutique mais des dérivés hémisynthétiques ont été développés (dihydroartémisinine, artémether, artéether et artésunate sodique). Ce dernier, sous forme de sel, a permis la mise au point de formes injectables.

Etant donné leur demi-vie courte et pour éviter l'apparition de résistances, on recommande d'utiliser les dérivés d'artémisinine en association avec un antipaludique de plus longue durée d'action : généralement la méfloquine ou la luméfantine.

Ces combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ou artemisinin-based combination therapy, ACT) sont recommandées par l'OMS en première intention pour le traitement du paludisme simple provoqué par *P. falciparum*. L'artésunate en voie injectable (ou rectale) est quant à lui recommandé depuis peu comme traitement de première ligne pour la prise en charge des accès graves chez les enfants [WHO, 2010c].

1.1.6.3 Principales difficultés de la lutte contre le paludisme

Résistances :

Les pressions médicamenteuses ont entraîné le développement de souches de *Plasmodium* résistantes aux principaux antipaludiques utilisés pour la prévention et le traitement de la maladie (**Figure 1-17**). Des résistances à la chloroquine, sulfadoxine/pyriméthamine et à la méfloquine sont décrites depuis de nombreuses années.

La présence croissante de médicaments contrefaits et/ou de faible qualité, le manque de compliance et le manque d'informations des populations sont parmi les facteurs qui tendent à amplifier le phénomène de résistance.

Ces résistances ont poussé l'OMS à se tourner vers les ACT comme traitement de première intention depuis 2005 [WHO, 2010b,c] .

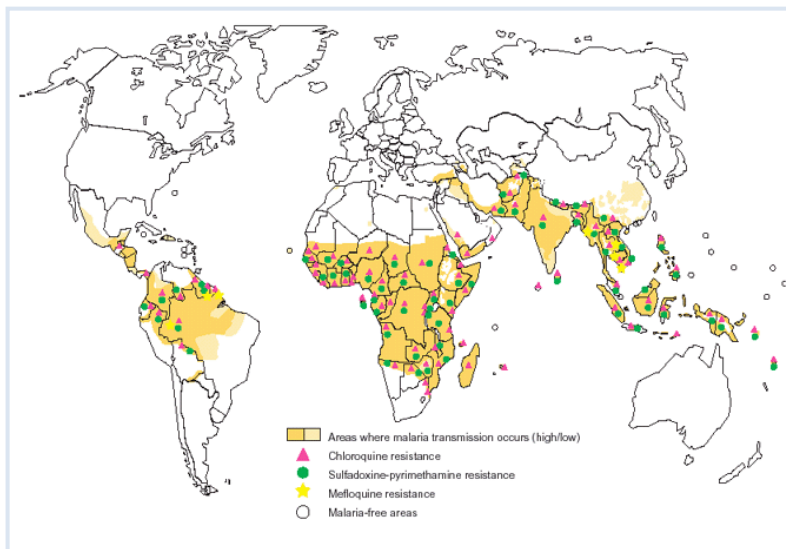


Figure 1-17 : Distribution des résistances aux principaux traitements antipaludiques (WHO, 2009)

Des cas de résistance à l’artémisinine et ses dérivés ont été récemment décrits en Asie [Burki, 2009 ; Egan, 2009 ; Phyo, 2012]. Ces résistances aux traitements actuels les plus efficaces constituent une menace sérieuse pour le contrôle de la maladie.

Par ailleurs, l’apparition de souches de **moustiques** résistants aux insecticides est un autre facteur préoccupant qui pourrait compromettre le contrôle de la maladie (Figure 1-18).

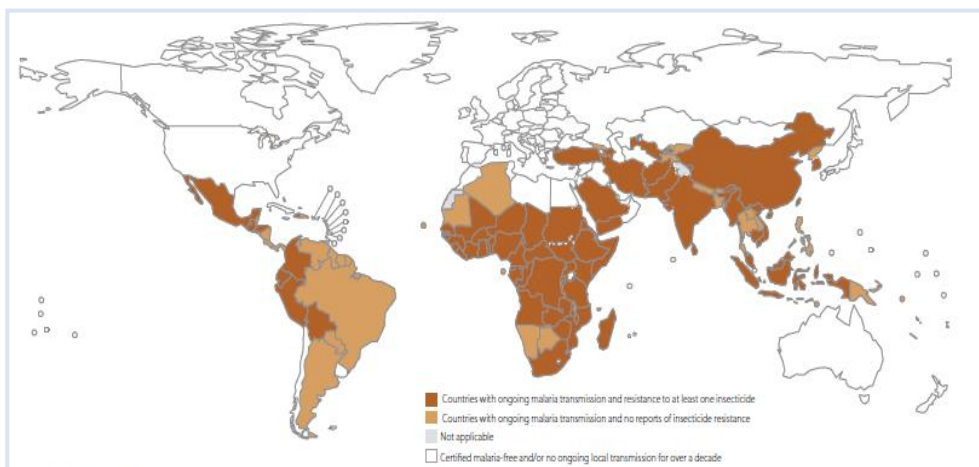


Figure 1-18 : Pays touchés par la malaria pour lesquels une résistance aux insecticides à été identifiée chez au moins un de leurs principaux vecteurs (WHO, 2012)

Accès aux soins :

Bien que les ACT soient les traitements les plus efficaces actuellement pour soigner le paludisme, ils restent trop difficilement accessibles, notamment financièrement, aux populations locales. En 2009, moins de 15% enfants de moins de 5 ans avec fièvre avaient reçu un ACT ; on est donc loin de l'objectif des 80% que s'était fixé l'OMS [WHO, 2010a].

Le recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales, notamment pour le traitement du paludisme reste très fréquent. L'OMS a d'ailleurs reconnu la place des préparations traditionnelles comme l'une des voies de contrôle de différentes maladies prioritaires dont le paludisme dans les pays du sud [WHO, 2002]. Cette reconnaissance doit s'appuyer sur des résultats scientifiques pour certifier l'efficacité des préparations utilisées et leur non toxicité. L'OMS recommande notamment l'élaboration de politiques et de programmes nationaux d'évaluation et de réglementation des pratiques relatives à la médecine traditionnelle afin de favoriser son intégration dans les systèmes de santé nationaux. La protection des ressources naturelles et la promotion d'un usage correct de la médecine traditionnelle par les prestataires et les populations doivent également être envisagées.

En conclusion :

Le contrôle du paludisme au niveau mondial reste fragilisé par la capacité du parasite à s'adapter et à devenir résistant aux traitements disponibles. La recherche de nouveaux traitements antipaludiques reste plus que jamais nécessaire dans la lutte contre cette maladie.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour la recherche de nouveaux lead compounds antipaludiques. Ceux-ci peuvent notamment être obtenus par l'approche du drug design et par voie de synthèse chimique, ou par l'isolement de nouveaux produits d'origine naturelle.

Les savoirs traditionnels à propos des plantes médicinales utilisées pour soigner le paludisme méritent par ailleurs une attention particulière en vue de leur valorisation à travers la mise au point de médicaments traditionnels améliorés accessibles aux populations locales (voir 1.2.5).

1.2 De l'usage traditionnel au médicament

1.2.1 SUBSTANCES NATURELLES EN THÉRAPEUTIQUE

La Nature, en particulier le règne végétal, a été de tout temps source de remèdes pour les hommes et les animaux. Les plantes médicinales sont d'ailleurs longtemps restées la seule ressource thérapeutique pour l'Homme. Les métabolites secondaires produits par les plantes possèdent en effet des propriétés pharmacologiques variées. De plus, de nombreuses substances naturelles présentent une structure originale qu'il ne serait pas toujours possible d'obtenir par synthèse chimique, ouvrant la voie à la découverte de nouveaux pharmacophores. Ceux-ci peuvent ensuite être soumis à des procédés de pharmacomodulation et/ou hémisynthèse afin d'améliorer leur activité et/ou diminuer leur toxicité mais également d'optimiser leurs propriétés pharmacocinétiques (dissolution, résorption, ...).

De nombreuses substances et leurs dérivés, utilisés comme médicament en thérapeutique moderne, possèdent une origine naturelle (plante, animal ou microorganisme). Ceci est particulièrement vrai dans les domaines des thérapies anticancéreuses et antiinfectieuses (**Figure 1-19**).

Ainsi, parmi les nouvelles molécules mises sur le marché entre 1981 et 2006, la moitié sont naturelles ou d'origine naturelle. Pour les antiparasitaires, la proportion de substances naturelles passe à près de 70% [Newmann et Cragg, 2007].

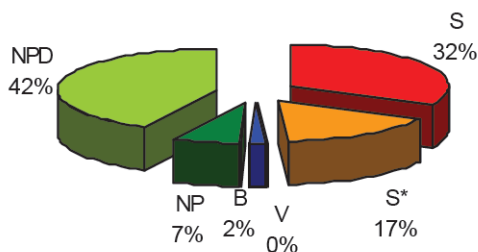


Figure 1-19 : Illustration de l'importance des substances naturelles et de leurs dérivés pour les antiinfectieux

De plus, moins de 10% des 270 000 espèces végétales connues ont été investiguées sur le plan phytochimique et/ou pharmacologique. Les flores non

explorées constituent des ressources privilégiées pour la recherche de nouveaux médicaments potentiels.

Par ailleurs, de nombreux végétaux sont aujourd'hui en voie de disparition : une espèce végétale sur cinq risque de disparaître d'ici 30 ans. La prospection de plantes pharmacologiquement actives peut encourager la préservation des espèces dans leur milieu naturel.

Le monde végétal représente une source intéressante pour la découverte de nouveaux agents antiplasmodiaux. Outre les exemples bien connus de la quinine et de l'artémisinine (voir 1.1.5.2), de nombreuses substances naturelles dotées de propriétés antiplasmodiales prometteuses ont été découvertes ces dernières années comme en témoignent plusieurs *review* publiées sur le sujet [Bero, 2009 et 2012 ; Kaur, 2009, Nogueira, 2011].

Le choix des espèces végétales qui feront l'objet d'étude pour rechercher de nouveaux composés pharmacologiquement actifs peut s'opérer selon 3 stratégies principales.

Les échantillons peuvent être collectés de manière **aléatoire**, c'est-à-dire qu'on récolte tous les végétaux présents sur une aire géographique déterminée. Cette méthode est assez fastidieuse au vu du nombre élevé d'échantillons récoltés mais présente pour avantage de mener à des résultats potentiellement novateurs, en s'intéressant à des espèces qui n'auraient peut-être pas été sélectionnées par les 2 autres méthodes.

La mise à profit des **liens de chimiotaxonomie**, par une sélection des espèces botaniquement proches de celles déjà connues pour leur intérêt pharmacologique, constitue une autre stratégie de choix. Elle est basée sur le principe que des espèces proches sur le plan botanique le sont souvent également du point de vue de leur composition chimique (et donc de leur activité pharmacologique).

La troisième approche, **l'ethnopharmacologie**, s'intéresse à l'utilisation traditionnelle des végétaux. Celle-ci constitue en effet un guide précieux vers les espèces d'intérêt pharmacologique. On estime qu'environ 80% de la population mondiale utilise les plantes pour se soigner, par choix ou par nécessité. Dans les pays du Sud, le recours à la médecine traditionnelle trouve généralement une origine financière et/ou géographique mais également culturelle.

Cette approche ethnopharmacologique a donné de bons résultats dans la prospection de nouveaux composés antiplasmodiaux et la validation de l'activité de remèdes traditionnels contre le paludisme comme cela a été commenté par de nombreux auteurs [Benoit-Vical, 2005 ; Bourdy, 2008 ; Willcox et Bodecker, 2009 ; Wright, 2005 ; Wells, 2011]. Elle sera détaillée au point 1.2.3.

1.2.2 MÉDECINES ET PHARMACOPÉES TRADITIONNELLES

1.2.2.1 Définitions

La médecine traditionnelle (MT) est définie comme : « la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales » [OMS, 2000]. Les savoirs sont transmis de génération en génération, de manière écrite ou orale.

Il n'y a pas UNE médecine traditionnelle mais autant de pratiques de celle-ci que de cultures à travers le monde. La mise en œuvre de matières végétales dans la confection des remèdes en est une caractéristique commune. De nombreuses plantes médicinales restent d'ailleurs, même dans nos régions industrialisées, d'un usage courant en médecine populaire occidentale. D'autres systèmes de médecine traditionnelle organisés existent, dont la pharmacopée chinoise, la médecine ayurvédique (Inde) et les pharmacopées orientales (Arabe).

Nous nous attacherons à décrire ici quelques aspects de la médecine traditionnelle africaine, bien qu'elle soit caractérisée par une grande diversité de pratiques. Ces traditions sont généralement orales et restent peu organisées, ce qui complique leur recensement.

1.2.2.2 Itinéraire thérapeutique et recours à la médecine traditionnelle

Pour comprendre l'importance de l'utilisation des plantes médicinales par les sociétés africaines, il faut s'intéresser à l'**itinéraire thérapeutique** suivi lorsqu'une « maladie » ou un « dysfonctionnement » est décelé. Le premier niveau, que l'on peut qualifier de **médecine populaire**, est la prise en charge des pathologies les

plus courantes au niveau du cercle familial, principalement par les mères de famille. Celles-ci connaissent en effet de nombreuses plantes utiles pour le soin des maladies fréquemment rencontrées (analogie à nos « remèdes de grand-mère »).

En cas d'échec de la thérapie ou de pathologie plus grave ou attribuée à une cause mystique ou « surnaturelle », les **tradipraticiens de santé** ou guérisseurs traditionnels (également appelés marabouts, sorciers, tradithérapeutes, ...) sont consultés. Leurs savoirs leur sont transmis de génération en génération. Ils mettent en œuvre différentes pratiques à des fins thérapeutiques (confection d'objets symboliques, pratiques magico-religieuses, incantations, ...) dont la préparation de remèdes à base de plantes médicinales fait presque toujours partie.

Le recours aux végétaux des pharmacopées traditionnelles est donc présent aux 2 premiers niveaux de cet itinéraire thérapeutique, suivi par la majorité des populations africaines.

Les patients ne consultent en effet les **structures de santé « modernes »** (dispensaire, hôpital) qu'en dernier recours. En cause, des problèmes évidents d'accessibilité financière et géographique mais également un manque d'attrait pour les centres de santé modernes. Les conditions d'accueil et les relations soignant-soigné sont effectivement loin d'être idéales. Dans « Une médecine inhospitalière », Jaffré et Olivier de Sardan dressent un portrait accablant des structures publiques de santé dans plusieurs capitales d'Afrique de l'Ouest. Les différents dysfonctionnements décrits (manque d'équipements et de fournitures, attitude méprisante du personnel soignant, manque d'information du patient, corruption...) sont autant de raisons qui poussent les populations à délaisser les structures officielles de soins [Jaffré, 2003 ; Jaffré et Olivier de Sardan, 2003].

L'usage répandu de la médecine traditionnelle et de la pharmacopée qui lui est associée trouve surtout une origine culturelle profondément ancrée ; en témoignent les nombreux recours mixtes (l'utilisation de remèdes à base de plantes même chez les patients ayant accès aux traitements modernes). De plus, les patients issus de milieux ruraux préféreront se tourner en priorité vers le tradipraticien en raison de l'approche personnalisée de la relation soignant-soigné et de la correspondance de leurs systèmes de pensée dans lequel le tradipraticien va replacer la maladie (et le malade !) et assurer sa prise en charge.

Les sociétés africaines ont en effet gardé une profonde croyance traditionnelle, notamment concernant les représentations des maladies et de leurs causes

auxquelles ils attribuent souvent des représentations symboliques. Les causes fréquemment citées sont liées au climat (froid, humide), à la consommation de certains aliments (gras, sucré, ...), à la présence de certains animaux ou encore à un châtement pour une faute commise, à un génie, un esprit ou un mauvais sort. La connaissance de la maladie se fait par les symptômes observés. Ceux-ci constituent un signifiant dont dérive une chaîne de représentations symboliques. Ils permettront d'attribuer une cause à la maladie et celle-ci va à son tour influencer la conduite thérapeutique. Des représentations traditionnelles sont également associées aux plantes mises en œuvre dans les remèdes.

Le traitement peut prendre différentes formes (rituel gestuel, incantations - prières, objet - collier de protection) mais on assiste presque toujours à la mise en œuvre de plantes médicinales. Celles-ci sont préparées par décoction, infusion ou macération (aqueuse, hydroalcoolique, parfois huileuse pour l'usage externe) ou encore consommées telles quelles. Une plante peut être utilisée seule mais le recours à des mélanges de différentes drogues végétales (susceptibles d'agir en synergie sur un ou plusieurs symptômes) est fréquent. Le remède peut être administré par voie orale ou encore en bain, en inhalation, en lavement (enfants) ou en application locale.

Le choix des drogues végétales ne s'opère pas au hasard et peut résulter de la symbolique associée à la maladie (révélée par ses symptômes). L'exemple de la « théorie des signatures », élaborée par Paracelse et attribuant aux plantes capables de soigner une affection déterminée un signe reconnaissable en rapport avec la pathologie à traiter, est certainement le plus parlant. Dans le cas de la malaria, l'utilisation de plantes à fleur jaune est courante et peut être mise en relation avec les manifestations associées à la couleur jaune (ictère, bile) observée chez le patient. Certaines d'entre elles ont par ailleurs confirmé une activité antipaludiale significative (*Cochlospermum* sp., *Cassia* sp., ...).

Signalons enfin qu'il est souvent difficile de transposer exactement les concepts traditionnels des maladies en concepts modernes, et vice versa. Des ensembles de symptômes considérés comme des entités nosologiques indépendantes dans le système de représentation traditionnelle des maladies par les populations locales peuvent en réalité être plusieurs aspects d'une seule et même pathologie « moderne ». A l'inverse, on pourrait confondre plusieurs maladies ayant des symptomatologies semblables au sein d'une seule entité nosologique traditionnelle (voir exemple du paludisme au Burkina Faso, 1.3.4).

Les principaux avantages de la **médecine traditionnelle** sont sa disponibilité et la rencontre du système de pensée des populations. Ses principaux inconvénients sont : un diagnostic et une posologie souvent imprécis, la variabilité de la composition chimique des matières premières en fonction du temps, de l'époque de la récolte et de la partie employée, un manque de données sur l'efficacité et la toxicité et un risque d'interaction avec les traitements modernes.

Un meilleur encadrement des pratiques de la MT et la valorisation de remèdes à base de plantes médicinales qui en sont issus et qui seraient validés scientifiquement pour leur efficacité et leur innocuité, permettraient de contribuer à l'amélioration de la santé des populations puisque la majorité d'entre elles y ont recours.

1.2.2.3 Position de l'OMS sur la médecine traditionnelle

Au cours de la conférence d'Alma Ata (1978), l'OMS a établi des recommandations pour développer et mettre en œuvre les soins de santé primaires dans le monde entier, en particulier dans les zones les plus pauvres. Le rôle primordial de la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaires fut souligné. La déclaration d'Alma Ata plaide notamment en faveur de l'étude des médecines et pharmacopées traditionnelles. Elle recommande aux Etats membres d'intégrer dans leurs politiques pharmaceutiques nationales les médicaments traditionnels qui ont fait la preuve de leur efficacité et d'élaborer un cadre réglementaire spécifique pour la mise en place de programmes pour l'étude des médecines traditionnelles ainsi que pour le recensement, la culture et la conservation des plantes médicinales. Il est aussi recommandé d'associer les tradipraticiens aux soins de santé primaires.

Les 3 objectifs principaux de cette déclaration sont le recensement et l'évaluation des remèdes et des pratiques traditionnelles ; la validation et l'intégration de la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé des pays en développement ; le développement éventuel de pharmacopées traditionnelles nationales à partir de l'inventaire des plantes médicinales et autres produits d'origine naturelle. Ces objectifs rencontrent ceux de la démarche ethnopharmacologique.

Plusieurs recommandations de l'OMS sont venues renforcer la déclaration d'Alma Ata, avec l'édition de Guidelines pour l'évaluation des remèdes issus de la MT et pour l'enregistrement des médicaments traditionnels en Afrique [WHO, 2004, 2005, 2010].

1.2.3 LA DÉMARCHE ETHNOPHARMACOLOGIQUE APPLIQUÉE :

1.2.3.1 Ethnopharmacologie : Définitions et enjeux

L'ethnopharmacologie est définie comme de **l'exploration interdisciplinaire** de l'ensemble des **matières végétales, animales, minérales** et des **savoirs et pratiques** s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre à des **fins thérapeutiques, curatives, préventives ou de diagnostic** [Fleurentin et Dos Santos, 1991].

Elle fait appel à des disciplines variées telles l'anthropologie, l'ethnologie, la linguistique, la sociologie, la botanique, la chimie, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine. Elle s'intéresse aux traditions écrites mais aussi orales en matière de médecines et pharmacopées traditionnelles.

Son objectif est double : il s'agit d'une part de valider par des méthodes scientifiques l'utilisation des remèdes traditionnels et, d'autre part, de découvrir de nouveaux principes actifs utilisables en thérapeutique.

Elle contribue à la protection des savoirs, dont la transmission de générations en générations, est actuellement menacée par la déstructuration des sociétés et l'exode rural des plus jeunes. La démarche ethnopharmacologique participe également à la protection des ressources naturelles dont de nombreuses espèces sont aujourd'hui en voie d'extinction. La valeur médicinale des végétaux constitue en effet un argument pour la protection de la biodiversité.

De plus, cette démarche, menée dans un climat de respect mutuel et de confiance, permet de renforcer l'identité des peuples en valorisant leurs connaissances et leurs savoir-faire dans le domaine de l'usage des plantes.

1.2.3.2 Méthodologie générale

La démarche ethnopharmacologique appliquée peut être résumée en 3 étapes essentielles :

Un travail de terrain consistant à comprendre le fonctionnement du système de santé traditionnel en le replaçant dans son contexte socioculturel et à recenser les pratiques et les matières premières utilisées pour soigner.

Un travail de laboratoire mettant en œuvre la recherche d'une activité pharmacologique qui validerait l'efficacité thérapeutique des remèdes traditionnels et l'étude phytochimique des plantes afin d'en identifier les composés responsables de l'activité. La toxicité devra également être évaluée.

Un retour de l'information sur le terrain – donnant à la démarche sa dimension « appliquée » - par la diffusion des résultats des travaux accomplis et leur valorisation à travers le développement de médicaments traditionnels améliorés (voir 1.2.5).

La démarche peut être menée en s'intéressant aux différentes drogues végétales utilisées pour le soin de pathologies déterminées (approche par maladie) ou en recensant les différentes indications et emplois traditionnels de certaines espèces végétales en particulier (approche par plante).

I. Le travail de terrain

ENQUÊTES ETHNOBOTANIQUES : La première étape de la démarche consiste à mener des enquêtes sur le terrain afin de répertorier les usages thérapeutiques traditionnels des végétaux. Ces investigations doivent être menées dans un climat de confiance et de respect envers les populations interrogées. Les données doivent inclure la perception de la maladie et des symptômes tels que décrits par les populations interrogées. Les interlocuteurs peuvent être des tradipraticiens de santé mais également des mères de famille, des herboristes présents sur les marchés etc.



Figure 1-20 : Herboriste sur le marché de Koudougou (Photo : JDM©)

Le travail d'enquêtes demande de la rigueur et de la précision dans la collecte des informations. Il est important de d'abord collecter des données brutes, et de les compiler, sans les interpréter, dans des bases de données.

Lors de ces enquêtes, l'identification botanique des espèces est primordiale. En plus des noms vernaculaires employés par les populations locales, un **échantillon d'herbier** doit être collecté afin de permettre l'identification botanique ultérieure des végétaux. Des photos des différentes parties de la plante peuvent judicieusement compléter les données.

La **partie** de la plante utilisée ainsi que le **lieu**, la **période** et le **moment** de récolte, doivent être répertoriés. Une description détaillée du **mode de préparation** du remède sera également notée : utilisation de plantes fraîches ou sèches, quantités de plantes, solvants utilisés et méthodes « d'extraction » (macération, décoction ou infusion), l'association éventuelle à d'autres plantes ou l'ajout d'ingrédients (jus citron, cendres, ...). Enfin, on recueillera le maximum de détails sur le **mode d'administration** (voie orale, lavement, bain, inhalation, etc...) et les posologies unitaires et journalières, ainsi que la durée du traitement.

La dimension spirituelle de la maladie (et de la thérapie qui lui sera associée) revêt parfois une importance considérable dans la perception et la compréhension de celle-ci par les populations locales. Les pratiques magico-religieuses éventuellement associées à la thérapie doivent également être répertoriées.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES : Les données ethnobotaniques collectées seront ensuite triées et recoupées avec les données de la littérature grâce à une recherche bibliographique approfondie qui devra être menée sur chaque plante recensée. Cette collecte d'informations doit inclure la recherche de synonymies botaniques et de données par rapport à l'utilisation de la plante dans d'autres pays ou régions. Des données relatives à la composition chimique de l'espèce (ou du genre, par lien de chimiotaxonomie) permettra de vérifier si la plante est déjà connue pour renfermer des substances toxiques ou connues pour leur activité et de voir si les propriétés pharmacologiques validant l'utilisation traditionnelle ont déjà été démontrées. On attachera également de l'importance à relever les données éventuelles relatives à la toxicité et à l'évaluation clinique des remèdes préparés à partir des plantes concernées.

SÉLECTION : Différents critères peuvent ensuite être définis pour la sélection des plantes à investiguer. Parmi ceux-ci, le nombre de citations lors des enquêtes de

terrain, les plantes utilisées seules, le fait que certaines espèces soient peu étudiées, la valorisation des liens de chimiotaxonomie (en choisissant les végétaux appartenant à un genre (ou une famille) déjà répertorié pour ses propriétés pharmacologiques ou au contraire en évitant ceux botaniquement proches de plantes toxiques bien connues) sont les plus courants. Les possibilités de valorisation locale, la disponibilité et l'endémicité des espèces, ... sont autant de critères supplémentaires qui peuvent être impliqués dans la sélection des végétaux à investiguer. Certaines équipes ont développé des méthodologies particulières de sélection, en attribuant un score à chacun des critères de choix préétablis [Willcox, 2011] ou encore en développant des stratégies originales telle la méthode ATRM « Achat en Triplet de Recettes Médicinales » élaborée au Togo [Koudouvo, 2009].

RECOLTE : Les échantillons de plantes qui seront évalués en laboratoire sont ensuite collectés, accompagnés de nouveaux échantillons d'herbier, dans les conditions les plus proches possibles de celles qui ont été détaillées lors des enquêtes. En effet, la composition chimique des végétaux peut varier en fonction de la partie utilisée, du lieu (sol, exposition...), de la période de l'année (cycle végétatif) et même du moment de la journée. Le stade de développement de la plante peut également influencer sa composition chimique et donc son activité pharmacologique.

SECHAGE : Le séchage permet de conserver les échantillons. Les conditions dans lesquelles il s'opère ont de l'importance car il peut provoquer une modification de la composition chimique de la drogue et de ses propriétés pharmacologiques potentielles. En fonction des parties de végétaux collectés, ceux-ci peuvent être mis à sécher en bouquet, au sol ou en séchoir, toujours dans un local ventilé et à l'abri de la lumière et de la poussière. L'aspect visuel après le séchage doit être vérifié (absence de moisissure, de changement de couleur de feuilles). Dans les cas des plantes utilisées fraîches, une cryoconservation dans l'azote liquide (suivi d'une lyophilisation) peut être utilisée pour conserver les végétaux.

II. Le travail en laboratoire

EXTRACTION : Le solvant utilisé pour l'extraction a une influence sur les substances extraites et donc sur l'activité pharmacologique de l'extrait résultant. En laboratoire, plusieurs extraits de différentes polarités seront préparés afin d'extraire sélectivement certaines classes phytochimiques. Les préparations

traditionnelles sont généralement des solutions aqueuses ou hydro-alcooliques qu'il sera difficile de reproduire à l'identique en laboratoire (pH, dureté de l'eau, ajout de différents ingrédients qui peuvent modifier les propriétés extractives du solvant,...). On s'attachera cependant, en fonction des informations recueillies lors des enquêtes, à préparer un extrait s'approchant au maximum de la méthode traditionnelle de préparation. Un paramètre important est la température de préparation, la chaleur peut en effet entraîner des modifications chimiques de certains constituants et révéler, ou au contraire annuler, une activité.

CRIBLAGE BIOLOGIQUE : Des tests biologiques doivent ensuite être mis en œuvre afin de détecter une activité pharmacologique éventuelle pour les extraits préparés. Les résultats de ces tests permettront de valider scientifiquement l'usage traditionnel des plantes et il est important de bien choisir le modèle de tests à mettre en œuvre. Pour des raisons éthiques (et bien qu'ils ne permettent pas de prendre en compte les phénomènes de biodisponibilité et de métabolisation des composés actifs), les tests *in vitro* sont souvent utilisés en première intention. Parmi ceux-ci, les modèles de tests sur cellules ou agents pathogènes « entiers » (culture), permettant la détection d'activités pharmacologiques liées à une gamme de mode d'action plus large, seront préférés aux tests sur cibles biologiques précises (enzymes, récepteurs) qui seront plutôt réservés aux produits purifiés.

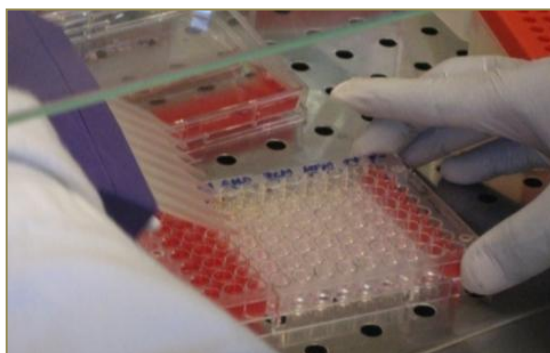


Figure 1-21 : Criblage antiplasmodial *in vitro* d'extraits végétaux sur *P. falciparum*

A l'issue de ce criblage biologique, les espèces identifiées comme les plus actives seront sélectionnées pour de plus amples investigations. Des tests *in vivo* sur animaux (souris, rats,...), notamment avec un extrait préparé selon la forme traditionnelle, seront également envisagés pour confirmer l'activité détectée *in vitro*.

Après l'évaluation pharmacologique, les espèces actives devront être soumises à une étude phytochimique approfondie afin d'en isoler les principes actifs (PA) et de les identifier.

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ : Un screening phytochimique préliminaire sera tout d'abord mené afin de détecter les principales classes phytochimiques des composés présents dans la plante et les extraits actifs. Le fractionnement bioguidé est une stratégie d'isolement utilisée pour la recherche de nouveaux principes actifs (PA) à partir de sources naturelles. L'extrait le plus actif lors du criblage est fractionné par différentes techniques extractives et chromatographiques à l'échelle préparative (CCM, HPLC,...). La détection de l'activité biologique est recherchée sur chaque fraction à chaque étape du fractionnement, en sélectionnant à chaque fois les fractions les plus actives. L'isolement des produits est guidé par leur activité. Une fois purifié(s), le(s) composé(s) actif(s) sont soumis à des techniques spectroscopiques (UV, IR, MS, NMR) en vue d'en déterminer leur structure. Dans certains cas, l'activité d'un extrait est liée à la présence d'un PA majoritaire. Il arrive souvent que l'activité se dilue dans les fractions au cours du fractionnement indiquant une synergie/additivité d'action pour différents composés présents dans l'extrait.

Ces études phytochimiques permettront également de déterminer une empreinte chromatographique (CCM, HPLC,...) des drogues végétales et d'identifier les composés majoritaires (actifs et/ou traceurs) dont certains pourront servir de marqueur de qualité pour la standardisation d'extraits actifs.

La mise au point d'une méthode de dosage des PA, afin de contrôler la variation saisonnière, locale ou liée à tout autre paramètre est également à envisager. L'optimisation du procédé d'extraction doit également être considérée.

Les principes actifs isolés ainsi que certains extraits standardisés devront être soumis à des études pharmacologiques plus approfondies. Leur mode d'action, ainsi que leur activité *in vivo*, devrait également être étudiés.

ETUDE DE LA TOXICITÉ : L'étude de la toxicité des extraits et des PA isolés est primordiale. Si l'utilisation traditionnelle (en usage interne) d'une plante limite en général le risque d'observer une toxicité aiguë violente, il convient cependant de rester vigilant car usage traditionnel ne rime pas toujours avec sécurité d'utilisation. Ainsi, la notion de toxicité chronique reste mal maîtrisée par les populations et les tradipraticiens.

Des tests de cytotoxicité sur cellules humaines saines (fibroblastes, monocytes) et des tests de génotoxicité (Ames, micronoyaux, comètes) permettront de détecter des propriétés mutagènes et cancérigènes. Des tests sur animaux doivent également être envisagés afin de détecter une éventuelle toxicité systémique et/ou sur certains organes. Ceux-ci seront cependant limités au maximum, dans un souci d'éthique et de considérations liées au bien-être animal.

La toxicité doit être évaluée pour les extraits et les PA purifiés. Lors du fractionnement bioguidé, on constate parfois que l'activité et la toxicité des extraits ne sont pas toujours attribuables aux mêmes constituants. L'optimisation d'un procédé d'extraction sélectif est parfois possible mais si certains constituants toxiques sont présents dans l'extrait, il est nécessaire d'en mesurer l'impact et de fixer une limite.

Se référer à l'usage traditionnel reste important lors de l'évaluation toxicologique des remèdes. Il arrive en effet que seules certaines parties d'une plante soient toxiques, ou que le mode de préparation, ou encore l'association d'autres ingrédients lors de la préparation traditionnelle du remède permettent de diminuer le risque de toxicité associé à sa consommation.

III. Le retour de l'information sur le terrain

La valorisation des résultats des recherches entreprises selon une démarche ethnopharmacologique peut aboutir à la découverte de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique. Le développement de nouveaux médicaments modernes implique un processus cher (estimé à 1 milliards d'€) et long (10-15 ans), incluant des études approfondies concernant le mode d'action, les mécanismes de biodisponibilité et de métabolisation du PA, ainsi que sa toxicité. Les plus prometteurs d'entre eux pourront alors être soumis à une évaluation clinique avant d'envisager leur mise sur le marché. On estime que seul un composé sur un million passe l'ensemble du processus d'évaluation pharmacologique et clinique aboutissant à la commercialisation d'un nouveau médicament.

Dans le cadre d'une démarche éthique, il est également primordial de procurer aux populations locales un retour des informations provenant des études scientifiques de laboratoire menées sur les remèdes qu'elles ont accepté de nous divulguer.

En plus de la publication scientifique de l'information, améliorer la qualité des remèdes traditionnels est une priorité puisque la majorité des populations y ont recours. Le développement de pharmacopées locales et la mise au point de MTA standardisés (voir 1.2.5) permettraient aux populations l'accès à des remèdes de qualité préparés à partir de leurs plantes médicinales et dont l'efficacité et l'innocuité seraient validées scientifiquement. L'usage traditionnel des végétaux, autorisant le recours à des protocoles simplifiés d'études cliniques, permet un développement plus rapide que pour un médicament conventionnel. Le MTA devra cependant présenter une posologie quantifiée, une efficacité cliniquement prouvée et des limites de toxicité fixées.

Ce retour sur le terrain peut aussi prendre d'autres formes : contribution à la protection des espèces médicinales, formation à l'attention des populations, édition de manuel sur les plantes médicinales,... Ces approches – parmi d'autres - sont développées avec succès par l'association Jardins du Monde.

1.2.3.3 Présentation de l'association Jardins du monde (JDM)

Lors d'une démarche ethnopharmacologique appliquée, travailler avec un partenaire local est indispensable afin de collecter les informations auprès des populations et des tradipraticiens et ensuite la restituer de manière appropriée (informations sur l'activité et la toxicité de certaines plantes, la variabilité des matières actives selon la partie de la plante utilisée ou la période de récolte).

Notre partenaire au Burkina Faso est l'association Jardins du Monde. Dotée d'une solide charte éthique (Annexe 2), cette association applique une démarche ethnopharmacologique avant tout basée sur le respect des populations et de leurs traditions. Elle est présente en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique.

Elle a pour objectif principal l'amélioration de l'état sanitaire des populations du Sud à travers l'utilisation de plantes médicinales pour les soins de santé primaires.

Elle développe une démarche globale (hygiène, alimentation, agriculture durable, santé animale, environnement) impliquant une collaboration étroite avec les populations locales. A leur demande, JDM mène des enquêtes ethnobotaniques pour recenser les plantes et leurs usages médicinaux traditionnels.

Une fois les plantes d'intérêt identifiées, des études bibliographiques et scientifiques sont effectuées afin de valider les allégations traditionnelles et de vérifier l'absence de toxicité de ces plantes, en collaboration avec différentes universités.

Ces informations sont alors restituées aux populations sous la forme de formations à la santé (agents de santé et population). Une valorisation des ressources végétales médicinales locales est réalisée par la mise au point et la production de remèdes efficaces et financièrement accessibles aux populations pour la prise en charge des pathologies les plus courantes. La création de jardins médicinaux communautaires de plantes médicinales et la mise en culture de certaines d'entre elles, permet l'approvisionnement en matières premières et participe à la préservation de la biodiversité. Des supports pédagogiques, dont l'édition de manuels didactiques sur l'usage des plantes médicinales, sont également réalisés.



Figure 1-22 : Quelques exemples de réalisations de Jardins du monde :

- Mise en culture - Pépinière avec les plantes d'intérêt
- Formation à la santé des agents de santé et des populations
- Mise en place d'aires protégées - protection de la nature
- Jardins pédagogiques et de production de plantes médicinales
- Formulation de MTA (plantes en vrac, sirops, pommades,...)

1.2.4 COMPOSES PURS *versus* EXTRAITS VÉGÉTAUX: LE CAS DU PALUDISME

La découverte de nouveaux principes actifs antiplasmodiaux reste nécessaire car elle permet notamment l'étude du mode et du site d'action du composé, et pourrait devenir un outil pharmacologique en plus d'un médicament. Son efficacité thérapeutique peut aussi être améliorée par hémisynthèse et/ou pharmacomodulation et sa toxicité est généralement mieux maîtrisée.

Cependant, les médicaments modernes qui seront issus de ces recherches ne seront pas toujours accessibles aux populations défavorisées. Faut de solvabilité des populations touchées, le paludisme est d'ailleurs loin d'être une priorité de recherche pour les firmes pharmaceutiques.

De plus, les résistances développées avec les médicaments utilisés en monothérapie, contrairement à ce qui est observé avec les extraits de plantes (*Artemisia* et *Cinchona*), toujours efficaces après des centaines d'années, renforcent l'intérêt de considérer la valorisation des plantes issues des pharmacopées traditionnelles.

C'est pourquoi de nombreux auteurs militent actuellement en faveur de l'utilisation d'extrait totaux de plantes plutôt que de produits isolés pour la prise en charge du paludisme simple [Rasoanaivo, 2011 ; Ginsburg, 2011 ; Deharo, 2011]. Les extraits végétaux présenteraient en outre de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de substances pures, en particulier pour une pathologie comme le paludisme.

Les extraits peuvent en effet être considérés comme des polythérapies en soi puisqu'ils sont constitués de nombreux composés et il a été montré que l'association de plusieurs constituants présents dans certains extraits dont ils ont été isolés (ou provenant de l'association de plusieurs plantes), améliore l'effet thérapeutique global par différents mécanismes d'interactions positives [Rasoanaivo, 2011] :

- **synergie pharmacodynamique**: l'activité des constituants associés est supérieure à celle de l'activité de chaque constituant pris séparément, en agissant sur des cibles différentes du parasite mais pour produire un effet pharmacologique commun;
- **synergie pharmacocinétique** : certains composés de l'extrait augmentent l'effet des PA en facilitant leur résorption, en diminuant leur métabolisation ou leur excrétion par l'organisme (augmentation de la demi-vie plasmatique) ;

- **action complémentaire sur la pathologie** par l'intermédiaire de propriétés immunostimulantes, améliorant la réponse thérapeutique ou encore par des activités ayant un effet positif sur certains symptômes (action antiinflammatoire, antalgique, antipyrétique,...) ;
- **réversion de la résistance** par inhibition des P-glycoprotéines, pompes transmembranaires qui excrètent le PA du parasite et qui sont impliquées dans les phénomènes de multi-résistances aux médicaments (MDR) ;
- **modulation des effets indésirables** : par diminution de la dose de PA nécessaire (ex de Quinimax®) ou par la présence de composés dans l'extrait (ou dans une autre plante associée au remède) réduisant les effets secondaires du PA.

Quelques exemples d'interactions positives : [Rasoanaivo, 2011]

- Plusieurs études récentes ont montré que l'utilisation d'un extrait aqueux d'*Artemisia annua* permettait un dosage moins élevé en artémisinine dans l'extrait par rapport à l'utilisation de la molécule seule [Rasoanaivo, 2011 ; Wright, 2010]. Plus d'une cinquantaine de composés phénoliques ont été isolés d'*A. annua*, dont de nombreux flavonoïdes [Ferreira, 2010]. Certains d'entre eux ont montré une activité antiplasmodiale significative (gamme du μM) mais bien inférieure à celle de l'artémisinine pure (gamme du nM). Il ne semble pas y avoir de potentialisation *in vitro* de l'activité antiplasmodiale pour les préparations traditionnelles [Mouton, 2013] même si une synergie entre l'artémisinine pure et certains flavonoïdes purifiés d'*A. annua* a été montrée. Les flavonoïdes peuvent également agir en synergie avec l'artémisinine à différents niveaux (amélioration de l'absorption de l'artémisinine dans l'organisme, augmentation de sa demi-vie plasmatique par inhibition de sa métabolisation par le cytochrome P450, amélioration de l'extraction de l'artémisinine dans les préparations traditionnelles, ...).
- Les alcaloïdes de l'écorce de quinquina ont également montré des effets synergiques pour leur action antiplasmodiale. Quinimax®, associant quinine (71,4%), quinidine (18,6%) et cinchonine (5%), est une spécialité prescrite en cas de résistance à la quinine. Le *totum* d'alcaloïdes montre une efficacité supérieure à la quinine utilisée seule et autorise une diminution des doses pour obtenir un même effet thérapeutique, ce qui permet de limiter les effets secondaires (cinchonisme,...). De plus, la cinchonine, potentialise les effets de la quinine, en

particulier sur les souches résistantes. Il a été montré qu'elle est capable de bloquer la P-glycoprotéine impliquée dans les phénomènes de MDR.

- Outre la cinchonine, de nombreuses substances naturelles ont montré des effets inhibiteurs de P-glycoprotéines et/ou des potentialités pour renverser les phénomènes de résistances aux antipaludiques. Ainsi, la strychnobrasiline et la malagashanine isolées de *Strychnos myrtoides* ont permis de lever la résistance à la chloroquine *in vitro* sur des souches résistantes de *Plasmodium*. L'épigallocatechin-3-gallate (EGCG), tanin majoritaire du thé vert, a été rapporté pour ses propriétés inhibitrices de MDR. Des effets bloqueurs de la P-glycoprotéine ont également été détectés avec la curcumine. Celle-ci potentialise aussi l'action de plusieurs anticancéreux et antipaludiques par différents mécanismes, notamment par inhibition de leur métabolisation par le cytochrome P450 (CYP2B6 et CYP3A4).

En résumé, les avantages de **l'utilisation d'extraits végétaux totaux** dans la prise en charge du paludisme sont principalement : une diminution du dosage du PA par rapport à son utilisation pure, une amélioration de l'effet thérapeutique, une diminution ou retardement d'apparition de résistances, une réduction des effets toxiques et un moindre coût de production et de distribution. Le principal inconvénient réside dans la variabilité de la composition chimique des drogues végétales en fonction de divers paramètres (lieu, période de récolte,...), impliquant la nécessité d'une standardisation des extraits en principes actifs et/ou toxiques.

1.2.5 MÉDICAMENTS TRADITIONNELS AMÉLIORÉS (MTA)

1.2.5.1 Définitions

Plusieurs définitions du MTA ont été proposées :

« Ces médicaments à base de plantes issues des pharmacopées traditionnelles sont dits améliorés car leur composition chimique a été testée ; ils ont fait l'objet de tests de toxicité sur animaux et des études scientifiques ont évalué leur efficacité thérapeutique et leur production est contrôlée » [Pousset, 2006].

« Un MTA est un médicament issu de la pharmacopée traditionnelle locale, à limite de toxicité déterminée, à activité pharmacologique confirmée par la recherche scientifique, à dosage quantifié et à qualité contrôlée » [Sanogo, 2006].

La mise au point d'un MTA implique de pouvoir en **garantir son efficacité et sa sécurité d'usage** : il est donc nécessaire de disposer de données sur l'activité pharmacologique et la toxicité des drogues végétales qui entrent dans sa composition. En plus des données bibliographiques et des tests en laboratoires, une évaluation clinique des remèdes est nécessaire.

Il est primordial de pouvoir **assurer la qualité** du MTA. Cela passe notamment par l'étude phytochimique des végétaux et la standardisation des méthodes de production et du produit fini. La mise au point de méthodes d'identification et de dosage des PA, l'étude de la variabilité de la composition et de l'activité en fonction de différents paramètres, l'optimisation du rendement d'extraction des PA, l'étude de stabilité, sont également des paramètres à étudier. L'élaboration de normes de qualité reprises dans des monographies pourrait également être envisagée pour garantir la qualité des matières premières entrant dans leur composition, à l'instar des monographies de la pharmacopée européenne (identification macro- et microscopique, identification et dosage de PA, ...)

Une **formulation** galénique appropriée devra être étudiée afin d'assurer une bonne acceptabilité et compliance, ainsi qu'un rapport qualité-prix acceptable.

1.2.5.2 Avantages et Inconvénients des MTA

Les avantages principaux de ces préparations à base de plantes sont une meilleure accessibilité financière et géographique aux populations. Dans le cas du paludisme, ils offriraient également un terrain moins favorable au développement de résistances que les composés purs en raison de l'action synergique de nombreux composés dans les extraits de plantes. Enfin, ils pourraient contribuer à lever la pression médicamenteuse sur les dérivés d'artémisinine et ainsi à réduire le risque de résistances.

Des remèdes à base de plantes peuvent cependant représenter une menace sérieuse pour la santé des patients (mauvaise qualité, falsification). Peu de données sont généralement disponibles quant à la sécurité et l'efficacité réelle de ces remèdes. Il est donc nécessaire de démontrer l'efficacité pharmacologique et clinique des remèdes et de mener des investigations afin de détecter une éventuelle toxicité. Une formulation galénique appropriée ainsi que la standardisation du MTA en constituants actifs et/ou traceurs devrait idéalement

être réalisée. Cela passe par l'investigation à la fois pharmacologique et phytochimique des végétaux issus des pharmacopées traditionnelles.

1.2.5.3 Quelques exemples de MTA antipaludiques en Afrique de l'Ouest

Des MTA antipaludiques (pas toujours standardisés) tendent à se développer en Afrique et représentent une voie alternative de traitement non négligeable, en particulier quand les ACT ne sont pas disponibles. Au moins cinq d'entre eux ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans différents pays d'Afrique de l'Ouest.

- **N'dribala**, préparé par le laboratoire Phytofla® au Burkina Faso, à partir des racines de *Cochlospermum planchonii*. Des extraits aqueux de cette plante se sont montrés actifs *in vitro* sur *P. falciparum* avec une $IC_{50} = 4.4\mu\text{g/ml}$ [Vontron-Sénécheau, 2003]. Une étude clinique menée sur des patients adultes a confirmé l'efficacité clinique de la tisane avec 90% des patients traités (3x200ml/jour pendant 5 jours) asymptomatiques et 52% présentant une parasitémie indétectable [Benoit-Vical, 2003]. Récemment, des propriétés préventives de l'extrait aqueux de *C. planchonii* sur la transmission du *Plasmodium* ont été démontrées *in vivo* chez la souris [Yerbanga, 2012].

- La tisane **Saye**, produite par le même laboratoire, associée aux racines de *C. planchonii*, les feuilles de *Cassia alata* et de *Phyllanthus amarus*. Ce MTA est indiqué comme antipaludique et dans les affections hépatiques. De nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment hépatoprotectrices, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiplasmodiales et antivirales, ont été documentées pour *P. amarus* [Patel, 2011]. Une étude *in vivo* a démontré l'efficacité antiplasmodiale *in vivo* d'un extrait aqueux préparé à partir du mélange des 3 plantes sur *P. berghei* ($ED_{50} = 112 \text{ mg/kg}$) [Traoré, 2008]. L'effet préventif observé avec la tisane est légèrement amélioré par rapport au N'dribala seul [Yerbanga, 2012].

- **Sumafoura** est un MTA à base des parties aériennes d'*Argemone mexicana*. Il a été mis au point par le Département de Médecine Traditionnelle (DMT) du Mali et a fait l'objet d'études cliniques approfondies pour ses propriétés antipaludiques [Willcox, 2007 et Graz, 2010]. La préparation a démontré une efficacité clinique et une tolérance comparables à la combinaison artésunate-amodiaquine dans la prise en charge du paludisme non compliqué. La posologie recommandée est de 3 fois

par jour pendant 7 jours et la poudre d'*A. mexicana* est conditionnée à cet effet en 21 doses unitaires de 30g de plante à partir de laquelle la tisane sera préparée.



Figure 1-23 :

N'dribala préparé à partir des racines de *C. planchonii* (en bas, ci-contre) et Sumafoura préparé à partir des parties aériennes d'*A. mexicana* (en haut, Photo du Dr Jacques Falquet, dans [Graz, 2010])

- **Malarial-5**, également développé par la DMT du Mali est une association de 3 plantes : *Lippia chevalieri* (32%), *Cassia occidentalis* (62%) et *Spilanthes oleracea* (6%). C'est le spilanthol contenu dans cette plante qui lui confère une activité schizonticide mais sa toxicité ne permet pas d'augmentation de dosage. Le Malarial-5 ne présente pas une activité schizonticide suffisante pour être prescrit aux jeunes enfants et aux femmes enceintes et il ne peut être prescrit qu'aux adultes en complément d'un antipaludique de la médecine conventionnelle [Pousset, 2006]. Une étude clinique (vs chloroquine) a confirmé ses potentialités antipaludiques [Koita, 1990 in Willcox, 2004].

- **Phytolaria** est commercialisé au Ghana et est composé des racines de *Cryptolepis sanguinolenta*, dont les propriétés antiplasmodiales ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* ainsi que lors d'une étude clinique [Boye, 1989 in Willcox, 2004]. La cryptolepine, un alcaloïde identifié comme le principe actif antiplasmodial majeur de la plante a montré une haute activité *in vitro* sur *P. falciparum* mais possède néanmoins des propriétés cytotoxiques [Wright 1996].

1.3 Le Burkina Faso

1.3.1. GÉOGRAPHIE ET BIODIVERSITÉ

Anciennement appelé Haute Volta, le Burkina Faso – éthymologiquement « pays des hommes intègres » - est un pays d’Afrique de l’Ouest situé en bordure de zone sahélienne. Sa capitale est Ouagadougou. Pays enclavé de 274000 km², il est entouré du Mali à l’Ouest et au Nord, du Niger à l’Est, du Bénin, du Togo, du Ghana et de la Côte d’Ivoire au Sud. Le territoire est divisé en 45 provinces et 13 régions administratives (Figure 1-24).



Figure 1-24 : Carte du Burkina Faso (45 provinces) source : www.worldmapfinder.com

Parmi les villes principales, on peut citer Bobo-Dioulasso (capitale économique), Koudougou, Banfora, Ouahigouya, Gaoua, Fada N’Gourma, Kaya, Dori.

D’un point de vue climatique, on observe 2 saisons inégales : une courte saison des pluies – aussi appelée hivernage - de juin à septembre et une longue saison sèche qui dure environ 8 mois, d’octobre à mai.

Le pays peut être divisé en 3 zones climatiques (selon le volume annuel de précipitation et les températures), auxquelles correspondent trois grands domaines phytogéographiques. La répartition des espèces de végétation est en effet fortement liée à celle des climats et du régime de précipitations. On peut ainsi distinguer :

- une zone sahélienne, au Nord, avec une faible pluviométrie (inférieures à 600 mm) et de larges amplitudes thermiques (15-45°C). Sa formation végétale caractéristique est une steppe arborée ou arbustive aux espèces dispersées de petite taille, souvent épineuses. Les graminées, essentiellement annuelles, prédominent également.

- une zone soudano-sahélienne, intermédiaire en termes de précipitations et de températures, qui représente environ 50% du pays. C’est une zone de flore sèche occupant des étendues considérables où des steppes arbustives alternent avec des savanes arborées. On y trouve également des galeries forestières accompagnant les cours d’eau et quelques îlots forestiers.



Figure 1-25 : Savane arborée, province du Sanguié, saison sèche et saison humide

- une zone soudano-guinéenne au Sud, la plus humide et présentant une moyenne de température relativement plus faible. On y trouve une végétation plus dense, très hétérogène, constituée de savanes boisées, arborées ou arbustives, parsemées de reliques de forêts claires et de galeries forestières [Lebrun, 1991].

La faiblesse et l'irrégularité des précipitations, provoquant tour à tour, sécheresse et inondations - limitent la production agricole du pays et mettent en péril la sécurité alimentaire des populations.

1.3.2 DONNÉES SOCIO-ÉCONOMIQUES

Le pays compte 16 469 000 habitants et subit une forte croissance démographique avec un taux annuel d'accroissement démographique de 2,8%. La majorité de la population (>70%) est établie en zone rurale et vit de l'agriculture [UNICEF, 2010].

Classé 183^{ème} (sur 187) par le Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD) selon l'indice de développement humain, le revenu national annuel par habitant s'élève à 1200 US \$. Le PNUD estime encore que 57% de la population vit sous le seuil international de pauvreté (1,25US\$/jour) [PNUD, 2012].

Les principales ressources sont issues du secteur primaire (agriculture, élevage, pêche, chasse). À côté de l'agriculture vivrière (mil, sorgho, maïs, riz, ...) dont la production, tributaire du climat, ne suffit pas à nourrir la population, de nombreuses cultures de rente se sont également développées. Le coton - dont il est le 2^{ème} producteur africain - constitue le principal produit d'exportation du pays (loin devant l'arachide, la canne à sucre et le beurre de karité) et constitue une part importante du PIB national.

Le Burkina Faso est un pays laïc, indépendant depuis le 5 août 1960. Quatre langues officielles (Français, Mooré, Dioula, Fulfuldé) sont reconnues mais le pays est peuplé d'une soixantaine d'ethnies auxquelles correspondent presque autant de langues et de traditions. Parmi les plus représentées figurent les Mossi (environ 50 % de la population), le groupe Bobo (Bobo-Fing, Bwaba ou Bwa), les Peul, les Gourmanché, les Gourounsi, le groupe Mandé (Samo, Marka, Bissa), les Senoufo, le groupe Lobi-Dagari (**Figure 1-26**).

Le pays se caractérise également par une pluralité du contexte religieux. L'Islam et de la religion chrétienne sont les plus pratiquées : on compte environ 60 % de

musulmans et 30% de chrétiens, majoritairement catholiques. En parallèle, l'animisme, fondé sur les croyances et coutumes traditionnelles associées au culte des ancêtres et des « *génies* » qui peuplent la nature, reste bien ancré dans les cultures locales et est souvent pratiqué en parallèle des grandes religions monothéistes.



Figure 1-26 : Répartition géographique des principales ethnies au Burkina Faso

1.3.3 SITUATION SANITAIRE – MÉDECINE TRADITIONNELLE

La situation sanitaire reste critique malgré les nombreux progrès réalisés au cours des dernières années. En 2010, l'espérance de vie à la naissance est estimée à 55 ans (contre 41 en 1970) et le taux de mortalité infantile à 176 pour mille (contre 205 en 1990) [UNICEF, 2010].

L'accès à l'eau potable et la sécurité alimentaire restent fragilisés par la croissance démographique importante et les périodes de sécheresse observées ces dernières années. Les problèmes de malnutrition qui en résultent, ainsi que la prévalence de nombreuses maladies infectieuses (paludisme, VIH/SIDA, tuberculose, infections respiratoires...) constituent les principaux problèmes de santé publique du pays.

Le pays est divisé en 70 districts sanitaires. On compte 1 médecin pour plus de 20000 habitants et un centre de santé pour 9500 habitants. La distance moyenne à parcourir pour atteindre une formation sanitaire publique de base est de 7,2km [DGISS, 2012].

Malgré les efforts du gouvernement burkinabé pour rendre les soins de santé accessibles pour tous, une large majorité de la population ne fréquente pas les centres de santé, pour diverses raisons (voir 1.2.3). L'automédication et le marché illicite de médicaments perturbent également la mise en place d'une politique de santé efficace. Malgré la mise à disposition de produits génériques à coût réduit, les médicaments conventionnels restent chers pour la majorité de la population, surtout en milieu rural. Le recours à la médecine traditionnelle et l'utilisation de remèdes à base de plantes restent très fréquents.

Comme entrepris par de nombreux pays africains suite aux recommandations de l'OMS en ce sens (voir 1.2.2), le gouvernement burkinabé tente depuis plusieurs années de développer la médecine traditionnelle en complément des services de santé présents dans les formations sanitaires du pays. Une politique nationale est menée en ce sens par la Direction de la Promotion de la Médecine et de la Pharmacopée Traditionnelles (DMPT), créée au sein de la Direction générale du Médicament et des Laboratoires (DGPML) du Ministère de la santé en 2002. Elle comprend : un service d'appui à la valorisation des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle, un service de réglementation et contrôle de l'exercice de la médecine traditionnelle et un service d'enquêtes et statistiques. Un cadre réglementaire quant à la pratique de la MT et à la valorisation des plantes médicinales a été élaboré au Burkina Faso. Sa mise en pratique prévoit notamment de créer un répertoire des tradipraticiens, d'améliorer leurs conditions d'exercice et d'assurer leur formation (aux pathologies courantes, aux bonnes pratiques d'exercice de leur activité). Le soutien à la recherche sur les plantes médicinales et à la production des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle, la mise en culture des plantes médicinales ainsi que la mise en place de procédures pour l'enregistrement des MTA sont également prévus.

Les médicaments à base de plantes issues des pharmacopées traditionnelles sont classés en 4 catégories selon leur degré de transformation et d'innovation (formulation, purification des composés actifs). Ainsi la liste 1 concerne les préparations extemporanées des tradipraticiens tandis que la liste 4 comprend les MTA (sirops, gélules,...) formulés à base d'extraits (semi-)purifiés de plantes ayant montré scientifiquement leur efficacité. Une autorisation de mise sur le marché est nécessaire à partir de la catégorie 2 et peut être délivrée sur base de l'approbation d'un dossier par le Ministère de la Santé. Seize MTA ont actuellement reçu une AMM au Burkina Faso pour diverses indications (notamment antipaludique, antibactérien, antitussif, antidiarrhéique).

1.3.4. LE PALUDISME AU BURKINA FASO

L'ensemble de la population burkinabè vit en zone endémique de paludisme. L'espèce *P. falciparum* est largement prédominante mais *P. ovale* et *P. malariae* ont également été détectés [Gneme et al., 2013]. On estime à environ 5 millions le nombre annuel de cas cliniques de paludisme, dont près de 350000 cas de paludisme grave. Environ 7000 décès liés au paludisme ont été enregistrés dans le pays en 2011 [DGISS, 2012].

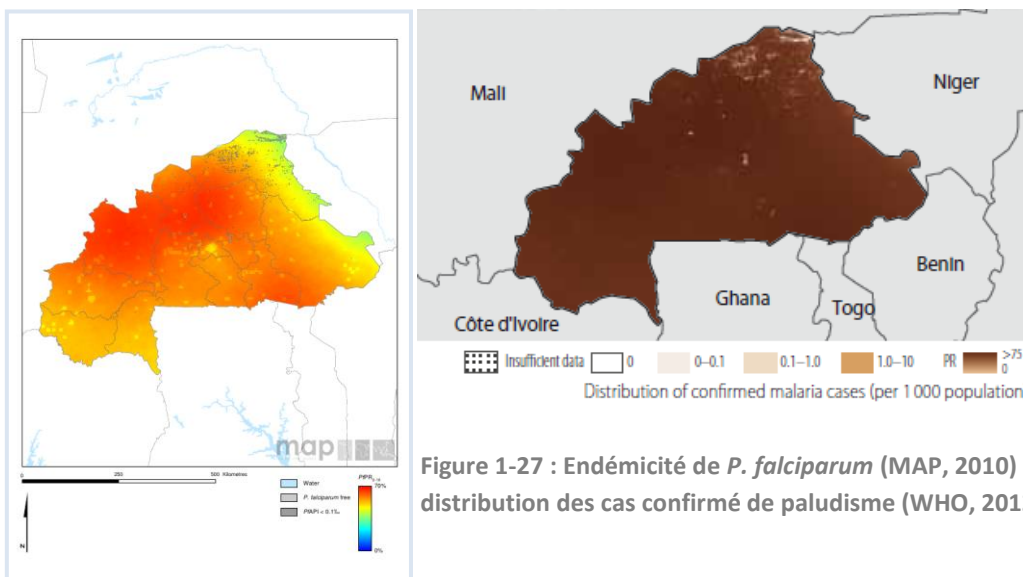


Figure 1-27 : Endémicité de *P. falciparum* (MAP, 2010) et distribution des cas confirmés de paludisme (WHO, 2012)

Malgré les campagnes entreprises par les institutions internationales (OMS, UNICEF,...), les ONG et les autorités, la couverture préventive restait jusqu'il y a peu globalement insuffisante au Burkina Faso avec 23% des ménages possédant une moustiquaire imprégnée et seulement 10% des enfants de moins de 5 ans dormant sous moustiquaire [UNICEF, 2010]. De larges campagnes de distribution menées en 2010 ont amélioré sensiblement cette couverture, aujourd'hui estimée à plus de 90% [DGISS, 2011].

Le paludisme reste cependant le premier motif de consultation et d'hospitalisation dans les structures de santé du pays. En 2011, il représentait respectivement 45%, 52% et 34% des motifs de consultations, d'hospitalisation et de décès pour la population générale au Burkina Faso [DGISS, 2011].

Il constitue surtout la première cause de mortalité infantile – plus de 80% des décès observés chez les enfants âgés de moins de 5 ans lui sont attribués - et explique en partie le taux de mortalité infantile élevé au Burkina Faso.

L'incidence cumulée des cas notifiés de paludisme est globalement évaluée à 309‰ habitants et passe à 808‰ pour les enfants de moins de 5 ans chez qui la létalité associée au paludisme dépasse en moyenne les 3%.

Comme dans de nombreux pays d'Afrique sub-saharienne, la résistance répandue à la chloroquine a poussé les autorités burkinabè à recommander officiellement depuis 2005 l'utilisation d'ACT, notamment l'association artémether + luméfantrine (p.ex. : Coartem®), comme 1^{er} choix pour la prise en charge du paludisme. Ces médicaments restent cependant trop peu disponibles et leur coût est souvent inaccessible aux populations (de 3000 à > 5000 Fcfa) [Kouyaté, 2007].

La présence répandue de médicaments antipaludiques contrefaits ou de mauvaise qualité a par ailleurs été mise en évidence au Burkina Faso [Tipke, 2008].

L'utilisation de plantes médicinales, ainsi que l'automédication avec des médicaments modernes comme la chloroquine ou le paracétamol restent des pratiques largement répandues pour la prise en charge du paludisme [Beiersmann, 2007 ; PNL, 2006].

La perception traditionnelle de la maladie et des causes qui lui seront attribuées influence souvent la conduite thérapeutique et le fait d'avoir ou non recours à une structure de santé. La classification des maladies dans le système de santé traditionnel est loin d'être équivalente à celle de la médecine moderne. Une approche anthropologique est indispensable pour comprendre la représentation populaire du paludisme.

Cette classification peut se baser sur les symptômes visibles (fièvres, courbatures, ictère, anémie, convulsions,..) et on notera l'utilisation fréquente de plantes à fleurs jaunes (associée à l'ictère, bile), de plantes amères (en référence à l'amertume de la bile) tandis que les plantes aromatiques sont souvent utilisées chez les enfants pour chasser les génies et les mauvais esprits (souvent associés aux manifestations convulsives) (Figure 1-28).

Dans le cas du paludisme au Burkina Faso, le climat froid et humide, la nourriture sucrée, un oiseau ou des génies sont des causes fréquemment attribuées à la maladie. La présence de zones humides est également citée comme étiologie, ainsi que le moustique [Bonnet, 1986 ; Drabo, 2005 ; Beiersmann, 2007].



Figure 1-28 : Protection d'un enfant contre les mauvais esprits (feuilles de neem – *Azadirachta indica*) Photo : © IRD

Des entités nosologiques distinctes, qui pourraient correspondre à différents tableaux cliniques du paludisme tel que défini en médecine moderne, ont été répertoriées par ces mêmes auteurs. A chacun d'entre eux, correspond des causes identifiées et des modalités de prise en charge bien établies. Ainsi Beiersmann relève que le terme « Sumaya » (= froid, humide) est utilisé par l'ethnie dioula pour désigner des manifestations avec fièvres, faiblesse, myalgies et troubles gastro-intestinaux, fréquemment observées pendant « le froid » = la saison des pluies. Il correspond aux manifestations cliniques associées au paludisme simple. Il est connu pour évoluer en « sumaya bâ » (= grand) s'il n'est pas pris en charge. Le Djoliban (= « le sang est fini ») correspondrait à une forme chronique de paludisme, avec anémie grave (yeux et paumes clairs, épuisement, perte d'appétit) ; le terme Kono (= « oiseau ») est utilisé pour décrire une pathologie des jeunes enfants atteints de convulsions pouvant entraîner la mort. Une analogie avec le neuropaludisme peut être établie. Des entités nosologiques assez comparables ont été décrites en zone mossi par Bonnet en 1986.

Dans les concepts locaux, ces ensembles de symptômes sont considérés comme des entités indépendantes l'une de l'autre et il n'y a pas de lien évident qui les relierait entre elles à une seule et même pathologie. D'autre part, chacun de ces tableaux pourrait également inclure des pathologies qui présenteraient une symptomatologie proche du paludisme mais qui lui seraient étrangères (syndrome grippal, hépatite, épilepsie,...).

1.3.5 TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LA PHARMACOPÉE TRADITIONNELLE LOCALE

De nombreux travaux sur le recensement ethnobotanique et l'étude scientifique des plantes médicinales ont été entrepris au Burkina Faso et plus largement à l'échelle sous régionale [Adjanooun et al., 1981, 1986, 1989].

La recherche sur les plantes médicinales issues des pharmacopées a pris un réel essor depuis quelques années, en particulier pour la prise en charge du paludisme et d'autres parasitoses tropicales (trypanosomiasés, ...).

Concernant les plantes à potentialités antiplasmodiales, les travaux antérieurs à 2007 ont fait l'objet d'une review qui compile 48 études et un total de 109 espèces végétales ouest-africaines étudiées pour leurs propriétés antiplasmodiales [Soh et Benoit-Vical, 2007].

Au Burkina Faso, on peut épingler les travaux ethnobotaniques récents de Nadembenga en 2011, de Bessot en 2008 et de Traoré en 2009, ainsi que les études de laboratoires de Sanon en 2003, Gansané en 2011, Zongo en 2011. Au niveau sous-régional, on peut citer ces dernières années les études ethnobotaniques et pharmacologiques de Koudouvo, 2011a,b au Togo ainsi que celles de Bero et Ganfon, en 2009b et 2012 et de Yetein en 2013, au Bénin.

De nombreux centres de recherche publiques et privés, réseaux de chercheurs (WANNPRES, RITAM), associations et ONG sont impliqués dans ces initiatives de recherche en vue du développement de la MT.

De nombreuses espèces végétales sont communes à plusieurs pays de la sous-région et une rationalisation des efforts serait nécessaire pour plus d'efficacité dans la valorisation des résultats issus des nombreuses recherches sur le sujet.

1.4 Contexte et Objectifs du travail

Bien que l'on puisse le prévenir et le traiter, le paludisme reste un problème majeur de santé publique pour les pays du Sud les plus touchés. Cette maladie est en effet associée à une mortalité élevée et à un ralentissement important du développement économique et social des territoires concernés, particulièrement en Afrique.

Les phénomènes de résistances du parasite aux traitements disponibles sont en croissance depuis de nombreuses années et constituent une des menaces principales qui pourrait compromettre le contrôle de la maladie. La détection récente de résistances aux ACT - piliers actuels de la prise en charge du paludisme - est particulièrement inquiétante et nécessite d'accentuer l'effort pour la découverte et le développement de nouveaux composés actifs contre le *Plasmodium*.

Parmi les stratégies proposées, la recherche de nouvelles substances actives **d'origine naturelle** a permis l'identification de nombreux composés présentant une activité antiplasmodiale prometteuse. De nombreux produits naturels et/ou leurs dérivés constituent d'ailleurs les traitements modernes actuels les plus efficaces contre le paludisme.

Seule une faible proportion (~ 10%) des espèces végétales connues a été investiguée sur le plan phytochimique et/ou pharmacologique. Les flores non explorées constituent donc des sources privilégiées pour la découverte de nouveaux médicaments potentiels, en particulier d'agents antiplasmodiaux. L'utilisation traditionnelle des plantes représente un guide précieux vers les espèces susceptibles de renfermer des composés pharmacologiquement actifs.

Par ailleurs, le recours répandu à la médecine traditionnelle traduit l'importance d'acquérir une meilleure connaissance des plantes issues des pharmacopées locales et de la valorisation des résultats des recherches menées sur ces plantes.

Ainsi, l'étude phytochimique et pharmacologique de plantes utilisées traditionnellement contre le paludisme pourrait non seulement conduire à la découverte de nouveaux composés antipaludiques mais également à la valorisation d'espèces végétales locales dont l'absence de toxicité et l'activité serait validée scientifiquement.

La mise au point de médicaments traditionnels améliorés (MTA) standardisés et validés pour leur efficacité et leur innocuité à partir de ces plantes pourrait constituer une voie alternative de développement de nouveaux traitements antipaludiques. Ceci permettrait aux populations locales l'accès à un traitement sûr, efficace et accessible financièrement et/ou géographiquement.

Ce travail s'inscrit dans ce double contexte de participation à la lutte contre le paludisme et de valorisation des pharmacopées traditionnelles africaines.

Son objectif principal est d'étudier les propriétés antiplasmodiales de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour la prise en charge du paludisme en vue d'isoler de nouveaux composés à potentialités antipaludiques et d'approfondir l'étude phytochimique et pharmacologique des plantes actives afin d'envisager leur valorisation locale.

Nous avons suivi une **démarche ethnopharmacologique**, incluant une première étape de recensement des espèces végétales utilisées dans le traitement traditionnel du paludisme au Burkina Faso afin de sélectionner les espèces d'intérêt qui seront étudiées pour leurs propriétés antiplasmodiales.

Les potentialités antiplasmodiales de plusieurs types d'extraits préparés à partir d'échantillons des végétaux sélectionnés ont ensuite été évaluées par un modèle de test *in vitro* sur *P. falciparum*. Ce screening antiplasmodial a permis d'identifier les espèces présentant une réelle activité sur le parasite et de confirmer - au moins partiellement - l'usage traditionnel de ces plantes dans le soin du paludisme.

Deux d'entre elles - *Dicoma tomentosa* Cass. et *Gardenia sokotensis* Hutch. - ont été sélectionnées pour être soumises à des études phytochimiques et pharmacologiques approfondies. Un fractionnement bioguidé a notamment été mené afin d'isoler les composés responsables de l'activité antiplasmodiale de ces 2 plantes. L'étude de certains paramètres de toxicité a également été réalisée.

Les résultats obtenus quant aux produits isolés et aux possibilités de valorisation locale des espèces seront finalement discutés.

1.5 Bibliographie (1)

Adjanooun et al. Médecines traditionnelles et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali, 3^{ème} édition, 1981, ACCT, Paris.

Adjanooun et al. Médecines traditionnelles et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo, 1986, ACCT, Paris.

Adjanooun et al. Médecines traditionnelles et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Bénin, 1989, ACCT, Paris.

Azas N, Laurencin N, Delmas F, Di Giorgio C, Gasquet M, Laget M, Timon- David P: Synergistic in vitro antimalarial activity of plant extracts used as traditional herbal remedies in Mali. Parasitol Res 2002, 88:165-171

Beiersmann, C., Sanou, A., Wladarsch, E., De Allegri, M., Kouyaté, B., Müller, O. Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behavior. Malaria Journal 2007, 6: 106.

Benoit-Vical, F., Ethnomedicine in malaria treatment. IDrugs 2005, 8 (1), p.45-52

Benoit-Vical F, Valentin A, Da B, Dakuyo Z, Descamps L, Mallie M. N'Dribala (*Cochlospermum planchonii*) versus chloroquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. J Ethnopharmacol 2003, 89:111-4.

Bero J, Frédéric M, Quetin-Leclercq J: Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. J Pharm Pharmacol 2009a, 61:1401–1433.

Bero, J., Ganfon, H., Jonville, M.C., Frédéric, M., Gbaguidi, F., DeMol, P., Moudachirou, M., Quetin-Leclercq, J.,. In vitro antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. Journal of Ethnopharmacology 2009b, 122: 439–444.

Bero J, Quetin-Leclercq J: Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria. Planta Med 2011, 77:631–640.

Bessot L., Etude de plantes médicinales traditionnellement utilisées dans le soin du paludisme au Burkina Faso. Thèse d'état de docteur en pharmacie. Université Louis Pasteur-Strasbourg, 2008.

Bonnet D. Représentations culturelles du paludisme chez les Moose du Burkina, 1986. ORSTOM. Paris

Bourdy G, Willcox ML, Ginsburg H, Rasoanaivo P, Graz B, Deharo E : Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal for Parasitology* 2008, 38:33–41

Boye GL. Studies on the antimalarial action of *Cryptolepis sanguinolenta* extract. *Prdgs of an international symposium on East-West medicine, Seoul, Korea, 1989:242-51.*

CDC, center for disease control and prevention, consulté en janvier 2013, <http://www.cdc.gov/malaria/about/index.html>

Chima, R.I., Goodman, C.A., Mills, A., The economic impact of malaria in Africa: a critical review of the evidence. *Health policy* 2003, 63 (1), :17-36.

Deharo E, Ginsburg H: Analysis of additivity and synergism in the antiplasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malar J* 2011, 10(Suppl 1):S5.

DGISS, Ministère de la Santé du Burkina Faso, tableau de bord - santé 2011, Ouagadougou, juillet 2012.

Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, von Seidlein L: Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* 2010, 8:272–280.

Dos Santos & Fleurentin, 1991, *L'ethnopharmacologie : une approche pluridisciplinaire.*

Drabo KM, Tarnagda Z., Zeba I., Seri I., Ouedraogo JB, Kabore I, Rouamba J, Guiguemde TR : Représentations et pratiques en matière de paludisme chez les personnes en charge des enfants de moins 5 ans en milieu rural de la province du Houet. *Sciences et techniques, sciences de la santé.* 2004. 27(1)

Dunavan, C P Tackling malaria. *2005 Scientific American* 2005, 293 (6):76-83

Egan TJ: Artemisinin-resistant *P. falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiol* 2009, 4:637–639.

Farnsworth, N.R., Kaas, C.J.,. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *J. Ethnopharmacol.* 1981, 3, 85–99.

Feachem RG, et al., : Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet.* 2010 376(9752):1566-78

Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A: Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artémisinine against malaria and cancer. *Molecules* 2010, 15:3135–3170.

Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S: Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:509–520

Fleurentin Jacques, *Les plantes qui nous soignent. Traditions et thérapeutique*, 2007, Ouest France.

Gansané A, Sanon S, Ouattara, LP, Traoré, A, Hutter, S, Ollivier, E, Azas, N, Traore, A, Guissou IP, Sirima SB, Nebié, I : Antiplasmodial activity and toxicity of crude extracts from alternatives parts of plants widely used for the treatment of malaria in Burkina Faso: contribution for their preservation, *Parasitol Res* 2010, 106:335–340

Ginsburg H, Deharo E: A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malar J* 2011, 10(Suppl. 1):S1.

Graz, B., Falquet, J., Elisabethsky, E., *Ethnopharmacology, sustainable development and cooperation: The importance of gathering clinical data during field surveys. Journal of Ethnopharmacology* 2010, 130 (3), p.635-638

Graz, B., Willcox, M.L., Diakite, C., Falquet, J., Dackuo, F., Sidibe, O., Giani, S., Diallo, D. : *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications., *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, 104 (1), p33-41.

Greenwood, B. M., Bojang, K., Whitty, C.J.M., Targett, G.A. T., *Malaria. Lancet* 2005, 365 (9469), p.1487-1498.

Good MF : Our impasse in developing a malaria vaccine. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, 68:1105–11313

Jaffré Y.: *Les apports de l’anthropologie sociale à la lutte contre le paludisme. Med Trop* 2003; 63 : 276-281

Jaffré Y., et Olivier de Sardan JP, *Une médecine inhospitalière. Les difficiles relations entre soignants et soignés dans 5 capitales de l’Afrique de l’Ouest. Paris, éd. APAD-Karthala, 2003.*

Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R: Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem* 2009, 17:3229–3256.

Kiszewski, A., Mellinger, A, Spielman, A, Malaney, P, Sachs, S Eh, Sachs, J, A global index representing the stability of malaria transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2004, 70 (5): 486-498.

Koita N. A comparative study of the traditional remedy “Suma-Kala” and chloroquine as treatment for malaria in the rural areas. In: Willcox M, Bodecker G: *Traditional herbal medicine for malaria. Br Med J* 2004, 329:1156–9.

Koudouvo, K., Karou, SD. , Ilboudo, DP., Kokou, K, Essien, K, Aklikokou, K, de Souza, C, Gbéassor, M, In vitro antiplasmodial activity of crude extracts from Togolese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011, 4 (2), 129-132.

Koudouvo, K. , Karou, D.S., Kokou, K., Essien, K., Aklikokou, K., Glitho, I.A., Simpore, J., Gbeassor, M. : An ethnobotanical study of antimalarial plants in Togo Maritime Region, *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 134 (1), p.183-190.

Kouyaté B, Sie A, Yé M, De Allegri M, Müller O, The Great Failure of Malaria Control in Africa: A District Perspective from Burkina Faso *Plos Medicine* June 2007 4(6): e127

Lebrun J.P., Toutain B., Gaston A., Boudet G., *Catalogue des plantes vasculaires du Burkina faso*. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays tropicaux, Etudes et synthèses de l'I.E.M.V.T, 1991

Malaney, P, Spielman, A, Sachs, J. The Malaria Gap post-autistic economics review. 2005, 31 : 16

MAP (Malaria Atlas Project), consulté à <http://www.map.ox.ac.uk> en mars 2013.

Mueller MS, Runyambo N, Wagner I, Borrmann S, Dietz K, Heide L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hygiene* 2004, 98(5):318-21.

Murray, CJL, Rosenfeld, LC, Lim, SS, Andrews, KG, Foreman, KJ, Haring, D, Fullman, N, Lopez, AD : Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis *The Lancet* 2012, 379 (9814) : 413-431,

Nadembega P, Boussim JI, Nikiema JB, Poli F, Antognoni F Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study. *J Ethnopharmacol.* 2011 133(2):378-95.

Newman, D.J., Cragg, G.M.,. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 461–477.

Nogueira CR, Lopes LMX: Antiplasmodial Natural Products. *Molecules* 2011, 16:2146–2190.

OMS, Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. 2000. Genève.

Pasvol G Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission, *Nature Genetics* 42,284–285(2010)

Patel JR, Tripathi P, Sharma V, Chauhan NS, VK Dixit : *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology* (2011) 138 286– 31.

Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Moo CI, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ, Anderson TJC, Nosten F: Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 2012, 379 (9830) :1960-1966

Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M: Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4:727–740.

Prugnolle F, et al., African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107(4):1458-63

PNUD 2011 <http://hdr.undp.org/fr/statistiques/>, consulté en mars 2013

Pousset JL, *Plantes médicinales d'Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser*, Aix-en-Provence, Edisud, 2004.

Pousset JL, *Place des médicaments traditionnels en Afrique*. *Med Trop* 2006 66 : 606-9

Rasoanaivo P, Wright C, Willcox M, Gilbert B: Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J* 2011, 10 Suppl 1:S4.

Roll Back Malaria, GMAP, <http://www.rbm.who.int/keyfacts.html>, consulté en mars 2013

Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002, 415: 680–685.

Sanogo R, 2006, consulté en mars 2013 et disponible à http://www.sifee.org/Actes/actes_bamako_2006/ecole/jour_4/2_Sanogo.pdf

Sanon, S., Ollivier, E., Azas, N., Mahiou, V., Gasquet, M., Ouattara, C.T., Nebie, I., Traore, A.S., Esposito, F., Balansard, G., Timon-David, P., Fumoux, F., Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 86: 143–147

P.N. Soh, F. Benoit-Vical : Are West African plants a source of future antimalarial drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 114:130–140

Teklehaimanot, A and Mejia, P, Malaria and poverty. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, 1136:32-37.

Tipke M, Diallo S, Coulibaly B, Störzinger D, Hoppe-Tichy T, Sie A, Müller O :Substandard anti-malarial drugs in Burkina Faso. *Malaria Journal* 2008, 7:95

Traoré M., Guiguemdé A., Yago I., Nikiéma J.-B., Tinto H., Dakuyo Z.-P., Ouédraogo J.-B., Guissou I.-P., Guiguemdé T.-R. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2006, 3: 34-41.

Traore, M., Diallo, A., Nikiema, J.B., Tinto, H., Dakuyo, Z.P., Ouedraogo, J.B., Guissou, I.P., Guiguemde, T.R.. *In Vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of 'Saye', an herbal remedy used in Burkina Faso traditional medicine. *Phytotherapy Research* 2008, 22, 550–551.

Traore A, Derme A I, Sanon S, Gansane A, Ouattara Y, Nebie, I, Sirima S. : Connaissances ethnobotaniques et pratiques phytothérapeutiques des tradipraticiens de santé de la Comoé pour le traitement du paludisme : *processus d'une recherche scientifique de nouveaux antipaludiques au Burkina Faso*. *Ethnopharmacologia* 2009, 43, 35-46

UNICEF 2010 http://www.unicef.org/french/infobycountry/burkinafaso_statistics.html, consulté en mars 2013

Vonthron-Senecheau C, Weniger B, Ouattara M, Bi FT, Kamenan A et al *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *J Ethnopharmacol* 2003, 87(2–3): 221–225

Wells TNC : Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malaria Journal* 2011, 10(Suppl 1):S3

Wéry, M., Protozoologie médicale, DeBoeck Université. Bruxelles, 1995.

WHO: Guidelines for registration of traditional medicines in African region. 2004. Brazzaville

WHO world malaria report 2010a

http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html,

WHO world malaria report 2011a

http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html

WHO world malaria report 2012a

http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html

WHO Global report on antimalarial drug efficacy, 2010b.

WHO: Guidelines for the treatment of malaria, second edition, 2010c

<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html> et

http://www.who.int/malaria/publications/atoz/mal_treatchild_revised.pdf

WHO: Guidelines on registration of traditional medicines in the WHO African region. Brazzaville: WHO Regional Office for Africa; 2010d.

WHO : Elaboration de proposition du Fonds mondial sur le paludisme : récapitulatif de la politique de l'OMS , 2011b

WHO, The world medicines situation 3ed - Traditional medicines: global situation, issues and challenges, Geneva, 2011c

WHO: Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulfadoxine-pyrimethamine plus Amodiaquine in Children: a Field Guide, 2012b

WHO Malaria, Fact sheet N°94, January 2013
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>

Willcox M, Burford G, Bodeker G: An overview of ethnobotanical studies on plants used for the treatment of malaria. In Traditional Medicinal Plants and Malaria. Boca Raton: CRC Press; 2004:187–197.

Willcox M, Bodeker G: Traditional herbal medicine for malaria. Br Med J 2004, 329:1156–9.

Willcox, M. L., Graz, B., Falquet, J., Sidibé, O., Forster, M., Diallo, D. : *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria., Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, 101 (12), p.1190-1198.

Willcox et al., : Do ethnobotanical and laboratory data predict clinical safety and efficacy of anti-malarial plants? Malaria Journal 2011, 10(Suppl 1):S7

Wright, CW, Phillipson, JD, Awe, SO, Kirby, GC, Warhurst, DC., Quetin-Leclercq, J, Angenot, L. Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydronium bases. Phytotherapy Research 1996, 10 (4): 361-363.

Wright, CW, Linley, PA, Brun, R, Wittlin, S., Hsu, E. Ancient Chinese method are remarkably effective for the preparation of artémisinine-rich extracts of Qing Hao with potent antimalarial activity. Molecules 2010, 15 (2):804-812.

Wright, C. W., Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. Journal of Ethnopharmacology 2005, 100 (1-2): 67-71.

Yerbanga RS, Lucantoni L, Lupidi G, Dori GU, Tepongning NR, Nikiéma JB, Esposito F, Habluetzel A: Antimalarial plant remedies from Burkina Faso: Their potential for prophylactic use. J Ethnopharmacol 2012, 140:255–260.

Yetein, M.H., Houessou, L.G., Lougbégnon, T.O., Teka, O., Tente, B. : Ethnobotanical study of medicinal plants used for the treatment of malaria in plateau of Allada, Benin (West Africa).Journal of Ethnopharmacology 2013, 146 (1): 154-163

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GÉNÉRALE

Zongo C, Ouattara LP, Savadogo A, Sanon S, Barro N, Koudou J, Nebie I, Traore AS. *In vitro* Antiplasmodial Activity of Some Medicinal Plants Used in Folk Medicine in Burkina Faso Against Malaria Current Research Journal of Biological Sciences 2011, 3(3): 216-222.

2 ENQUÊTES ETHNOBOTANIQUES, SÉLECTION DES PLANTES D'INTÉRÊT ET COLLECTES DES ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX

2.1 Avant-propos

Une première étape d'enquêtes de terrain a été mise en œuvre afin de recenser les espèces végétales utilisées dans la prise en charge traditionnelle du paludisme et des fièvres au Burkina Faso et de ce fait susceptibles de renfermer des substances à potentialités antiplasmodiales. Cette partie du travail a été menée en collaboration avec l'association Jardins du monde, présente au Burkina Faso dans les provinces du Sanguié et du Boulkiemdé (région du Centre-Ouest).

Une fois la liste de plantes établie, un travail bibliographique a été réalisé afin d'en savoir plus sur chacune de ces espèces végétales et de nous éclairer dans notre choix des plantes à récolter pour les étudier en laboratoire. Différents critères de sélection ont été appliqués et notamment, dans l'objectif de la thèse, nous avons décidé de ne pas nécessairement retenir les plantes les plus fréquemment utilisées, souvent déjà largement étudiées dans la littérature, pour se tourner vers des plantes d'usage un peu moins courant, mais dont l'étude des propriétés antiplasmodiales pourrait nous amener à des résultats plus novateurs. Ont ainsi été retenues en priorité les plantes dont les propriétés antiplasmodiales n'avaient encore été que peu ou pas étudiées et pour lesquelles aucun principe actif n'avait été isolé avant 2007. Des échantillons des plantes sélectionnées seront finalement collectés dans différentes régions du Burkina Faso pour étude ultérieure.

Ce chapitre, constitué par l'article : « **Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso : sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues.** » publiée dans **Ethnopharmacologia (2008) 41, 74-81**, détaille les méthodologies et résultats obtenus lors des étapes d'enquête ethnobotanique, de sélection et de récolte des espèces végétales dont l'activité antiplasmodiale sera étudiée en laboratoire. Les données bibliographiques sur les plantes médicinales qui sont détaillées dans ce chapitre correspondent à l'état de la question au moment de l'initiation de cette thèse, en 2007.

2.2 « Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso : sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues »

Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso : sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues

O. Jansen^{1*}, M. Frédérich¹, M. Tits¹, L. Angenot¹, S. Cousineau², L. Bessot²,
C. Crunet², J.-P. Nicolas²

R
é
s
u
m
é

Dans la recherche de nouvelles substances actives contre les *Plasmodium*, les flores non explorées des pays du Sud constituent une source potentielle privilégiée de nouveaux médicaments.

Dans ce travail, nous avons suivi une démarche ethnopharmacologique afin de répertorier et de sélectionner des végétaux intéressants à étudier en laboratoire pour leurs propriétés antiplasmodiales.

Notre travail de recensement des espèces utilisées contre la malaria au Burkina Faso nous a permis de répertorier 72 espèces végétales utilisées seules ou en association dans le traitement traditionnel du paludisme dans ce pays d'Afrique de l'Ouest. Finalement, treize espèces ont été sélectionnées et dix-sept échantillons végétaux ont été récoltés au Burkina Faso pour évaluation en laboratoire. Les principaux critères de sélection ont été : leur utilisation traditionnelle contre la malaria et le fait que ces plantes n'aient pas (ou peu) été étudiées sur le plan antiplasmodial. Les liens de chimiotaxonomie éventuels avec des plantes déjà connues pour leurs propriétés antiplasmodiales ainsi que les possibilités de valorisation des espèces au niveau local (MTA) ont également été considérés.

2.2.1 INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria reste un des principaux problèmes de santé publique dans le monde et principalement dans les pays du Sud. Dans son «*World malaria report*» de 2005, l'OMS rapporte que 107 pays et territoires comptent des zones où il y a un risque de transmission du paludisme et que quelques 3,2 milliards de personnes vivent dans des régions à risque. Entre 350 et 500 millions d'épisodes palustres cliniques sont recensés annuellement dans le monde. Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est responsable de plus d'un million de décès chaque année, surtout chez les enfants en bas âge. Le plus lourd tribut est payé par l'Afrique : environ 60 % des cas dans le monde, quelques 75 % des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* et plus de 80 % des décès se produisent en Afrique subsaharienne. Ainsi, le paludisme reste actuellement la maladie infectieuse qui provoque le plus de décès d'enfants en Afrique –trois fois plus que l'infection due au VIH ; le paludisme tueait un enfant africain toutes les 30 secondes (OMS/UNICEF/RBM, *World malaria report 2005*).

2.2.2 OBJECTIFS

Les résistances croissantes aux médicaments disponibles ainsi que l'absence de vaccin efficace nécessitent, parallèlement à un effort sur le plan de la prévention et

de la maîtrise du vecteur, la recherche permanente de nouvelles molécules actives contre les *Plasmodium*. De nombreuses substances naturelles (ou leurs dérivés) sont actuellement utilisées comme médicament contre le paludisme en médecine moderne ; notamment la quinine, l'atovaquone, ainsi que l'artémisinine et ses dérivés. Les flores non explorées des pays du Sud restent donc une source potentielle privilégiée pour la découverte de nouveaux médicaments antipaludéens. Cette recherche de nouvelles molécules actives ne doit pas occulter l'urgente nécessité pour les pays du Sud d'avoir à leur disposition des remèdes efficaces et accessibles permettant de soigner les accès palustres de leur population. Dans leur grande majorité, les habitants des régions rurales n'ont pas accès aux médicaments modernes et ont principalement recours aux plantes médicinales locales pour se soigner. Des données précises sur l'efficacité et l'innocuité des plantes des pharmacopées traditionnelles sont donc également nécessaires dans un contexte de prise en charge locale du paludisme. De nombreuses plantes utilisées en Afrique de l'Ouest pour soigner le paludisme ont démontré des propriétés antiplasmodiales dans des tests *in vitro* ou *in vivo*, notamment *Cochlospermum tinctorium*, *Azadirachta indica*, *Vernonia colorata*, *Combretum micranthum*,... [Soh et Benoit-Vical, 2007]. Les propriétés antiplasmodiales d'espèces utilisées traditionnellement dans le traitement du paludisme et non encore étudiées mériteraient donc d'être recherchées en vue d'isoler de nouveaux principes actifs utiles pour combattre *P. falciparum* et/ou de valider leur utilisation traditionnelle. Ainsi, certaines espèces, dont l'activité antiplasmodiale et l'absence de toxicité seraient validées scientifiquement, mériteraient d'être valorisées localement via, par exemple, la mise au point de «Médicaments traditionnels améliorés» (MTA). Le travail présenté ici consiste à sélectionner des végétaux intéressants pour l'étude de leur activité antiplasmodiale en laboratoire.

2.2.3 MATERIEL ET METHODE

Notre étude s'est tournée vers la flore du Burkina Faso, en collaboration étroite avec l'association «Jardins du Monde», active dans ce pays d'Afrique de l'Ouest.

2.2.3.1 Recensement des usages d'espèces utilisées dans le traitement traditionnel de la malaria au Burkina Faso.

Dans un premier temps, nous avons recensé les quelques données provenant de thèses et de documents locaux traitant de médecine et pharmacopées traditionnelles au Burkina Faso [Flahaut, 1999 ; Mazuel, 1995 ; Nacoulma, 1996 ; Guinko, 1988 ; Millogo, 2006]. De plus, nous avons consulté quelques ouvrages en relation avec notre sujet [Pousset, 1989, 2004 ; Arbonnier, 2002 ; Traore, 1983]. Ensuite, nous avons pris en compte le résultat des enquêtes ethnobotaniques menées par Jardins du monde dans ce pays (Provinces du Boulkiemdé et du

Sanguié) [JDM, 2006]. A la demande des populations locales, Jardins du monde réalise des enquêtes ethnobotaniques et recense l'usage des plantes médicinales. Dans sa démarche, elle s'intéresse d'abord aux usages populaires pour ensuite s'adresser aux tradipraticiens. Une fois cette collecte réalisée et les études scientifiques effectuées, ces informations sont rendues aux populations en particulier sous forme de formations à la santé.

Au cours de ces investigations, 72 espèces ont ainsi été répertoriées pour leur utilisation (seule ou en association) dans le traitement traditionnel de la malaria (**Tableau 2-1**). Ensuite nous avons sélectionné une dizaine d'espèces qui nous semblaient les plus intéressantes à étudier sur le plan antiplasmodial dans notre laboratoire.

Tableau 2-1 : Liste des espèces recensées pour leur usage traditionnel dans le soin du paludisme au Burkina Faso

<i>Espèces végétales</i>	FAMILLES
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC	ASTERACEAE
<i>Afzelia africana</i> Smith ex Pers.	CAESALPINACEAE
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	ASTERACEAE
<i>Annona senegalensis</i> Pers.	ANNONACEAE
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC) Guill. et Perr.	COMBRETACEAE
<i>Argemone mexicana</i> L.	PAPAVERACEAE
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	MELIACEAE
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del.	ZYGOPHYLLACEAE
<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	FABACEAE
<i>Bergia suffruticosa</i> Fenzl	ELATINACEAE
<i>Bidens pilosa</i> L.	ASTERACEAE
<i>Bombax costatum</i> Pellegr. & Vuil.	BOMBACACEAE
<i>Boswellia dalzielii</i> Hutch	BURSERACEAE
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw.	FABACEAE
<i>Capparis sepiaria</i> L.	CAPPARIDACEAE
<i>Cassia mimosoides</i> L.	FABACEAE
<i>Cassia occidentalis</i> L.	FABACEAE
<i>Cassia siamea</i> Lam.	FABACEAE
<i>Cassia sieberiana</i> DC	FABACEAE
<i>Casuarina equisetifolia</i> (L.) Forst	CASUARINACEAE
<i>Cenchrus biflorus</i> Roxb.	POACEAE

<i>Cissus adenocaulis</i> Steud.	VITACEAE
<i>Cissus gracilis</i> Guill. et Perr.	VITACEAE
<i>Chrysanthellum indicum</i> subsp. <i>afro-americanum</i> DC.	ASTERACEAE
<i>Cochlospermum angolense</i> Welw.	COCHLOSPERMACEAE
<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.f.	COCHLOSPERMACEAE
<i>Cochlospermum tinctorium</i> A.Rich.	COCHLOSPERMACEAE
<i>Combretum micranthum</i> G.Don	COMBRETACEAE
<i>Crossopteryx febrifuga</i> (Afz ex G.Don) Benth	RUBIACEAE
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (Lindl.) Schlechter.	ASCLEPIADACEAE
<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.	FABACEAE
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass.	ASTERACEAE
<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze	ACANTHACEAE
<i>Entada africana</i> Guill. et Perr.	FABACEAE
<i>Ethulia conyzoides</i> L.	ASTERACEAE
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Renhard	MYRTACEAE
<i>Fadogia agrestis</i> Schweinf. ex Hiern	RUBIACEAE
<i>Ficus thonningii</i> Blume	MORACEAE
<i>Flueggea virosa</i> (Roxb. ex. Wild) Voigt.	EUPHORBIACEAE
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch	RUBIACEAE
<i>Guiera senegalensis</i> Lam.	COMBRETACEAE
<i>Hyptis spicigera</i> Lam.	LAMIACEAE
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	EUPHORBIACEAE
<i>Khaya senegalensis</i> Desr (A.Juss)	MELIACEAE
<i>Lippia multiflora</i> Moldenke	VERBENACEAE
<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) Wilczek	CELASTRACEAE
<i>Mangifera indica</i> L.	ANACARDIACEAE
<i>Maytenus senegalensis</i> (Lam.) Exell.	CELASTRACEAE
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) O.Ktze.	RUBIACEAE
<i>Morinda lucida</i> Benth.	RUBIACEAE
<i>Nauclea latifolia</i> Smith = <i>Sarcocephalus latifolius</i> Bruce	RUBIACEAE
<i>Newbouldia laevis</i> (P.Beauv.) Seeman ex Bureau	BIGNONIACEAE
<i>Ocimum americanum</i> L.	LAMIACEAE
<i>Oxytenanthera abyssinica</i> (A.Rich.) Munro	POACEAE
<i>Ozoroa insignis</i> Del.	ANACARDIACEAE

<i>Psidium guajava</i> L.	MYRTACEAE
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach	CLUSIACEAE
<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir.	FABACEAE
<i>Sclerocarya birrea</i> Hoscht	ANACARDIACEAE
<i>Scoparia dulcis</i> L.	SCROPHULARIACEAE
<i>Securidaca longepedunculata</i> Fres.	POLYGALACEAE
<i>Senna alata</i> Roxb.	FABACEAE
<i>Tapinanthus bangwensis</i> Danser parasite de <i>Zizyphus mauritiana</i> Lam.	LORANTHACEAE
<i>Terminalia avicennoïdes</i> Guill. & Perr.	COMBRETACEAE
<i>Terminalia catappa</i> L.	COMBRETACEAE
<i>Terminalia macroptera</i> Guill. et Perr.	COMBRETACEAE
<i>Tinospora bakis</i> (A. Rich) Miers	MENISPERMACEAE
<i>Tridax procumbens</i> L.	ASTERACEAE
<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake	ASTERACEAE
<i>Vernonia amygdalina</i> Del.	ASTERACEAE
<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn. (= <i>Butyrospermum paradoxum</i> subsp. <i>parkii</i> Hepper = <i>B. parkii</i> Kotschy)	SAPOTACEAE
<i>Waltheria indica</i> L.	STERCULIACEAE

2.2.3.2. Critères de sélection

Il n'y a pas de critères dominants dans le choix des 13 espèces sélectionnées (**Tableau 2-2**). En revanche, nous avons suivi approximativement la progression suivante pour laisser des ouvertures. Les données bibliographiques recueillies sur les espèces recensées nous ont permis de faire une première sélection. Ainsi, les espèces déjà connues pour leurs propriétés antiplasmodiales et/ou déjà très bien étudiées sur le plan phytochimique ont été écartées, en ménageant cependant celles qui ont montré une activité *in vitro* et/ou *in vivo* et pour lesquelles aucun principe actif n'a été isolé. Parmi les plantes fréquemment citées pour leur utilisation contre le paludisme mais non retenues, on peut citer, par exemple, *Cochlospermum tinctorium*, *Azadirachta indica*, *Vernonia colorata* et *Combretum micranthum*, ayant toutes déjà été largement étudiées (**Figure 2-1**). D'autres comme *Fadogia agrestis* et *Acanthospermum hispidum* sont en cours d'études par d'autres collègues.

Ensuite, les liens de chimiotaxonomie éventuels ont été valorisés : genre ou famille déjà connu pour ses propriétés antipaludiques (ex : *Asteraceae* et lactones sesquiterpéniques). Nous avons également tenu compte d'autres critères

pragmatiques, telles que les possibilités de valorisation de l'espèce au niveau local comme antipaludique (possibilité de culture,...). Certaines espèces ou parties de plantes (e.a : racines) ont enfin été écartées faute de disponibilité suffisante. Par ailleurs, les résultats de ces études sont pris en compte par Jardins du monde dans le cadre de la valorisation de la pharmacopée locale auprès des populations.



Figure 2-1 : Photos de 4 plantes recensées mais non sélectionnées : 1. *Cochlospermum tinctorium*, 2. *Vernonia colorata*, 3. *Combretum micranthum*, 4. *Azadirachta indica* (source JDM)

2.2.4 RESULTATS

Soixante-douze espèces ont été répertoriées pour leur usage dans le traitement traditionnel du paludisme (**Tableau 2-1**). Nous en avons sélectionné treize dont les propriétés antiplasmodiales nous semblaient particulièrement intéressantes à étudier. Les principales informations concernant le mode d'utilisation de chaque plante dans le traitement traditionnel du paludisme ainsi que les données disponibles sur ces plantes en rapport avec le paludisme (rapport d'activité antiplasmodiale, phytochimie en rapport avec l'activité,..) sont détaillées dans le **Tableau 2-2**. Parmi les 13 espèces sélectionnées, 17 échantillons ont été récoltés au Burkina Faso dans les provinces du Boulkiemdé, du Sanguié et de la Comoé (**Figure 2-2 et Tableau 2-3**).

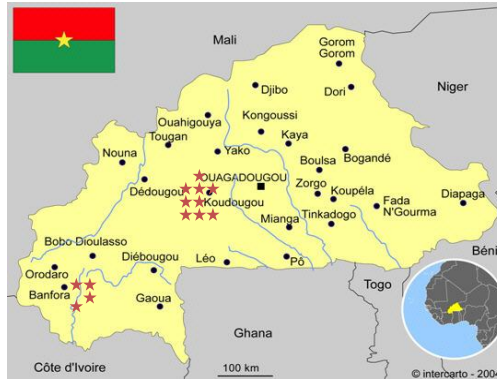


Figure 2-2 : Zones de collecte des échantillons au Burkina Faso

Tableau 2-3 : Echantillons de plantes récoltés au Burkina Faso (50-100g/échantillon)

	<i>Espèce</i>	<i>Echantillon</i>	<i>Lieu de récolte</i> (* = Herboriste)	<i>Date de récolte</i>
1	<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	Feuilles Tiges	Koudougou Koudougou	07/2007
2	<i>Bergia suffruticosa</i> Fenzl.	Plante entière	Koudougou*	ND
3	<i>Boswellia dalzielii</i> Hutch	Feuilles	Kassou	07/2007
4	<i>Crossopteryx febrifuga</i> (Afz ex G.Don) Benth	Feuilles	Banfora	07/2007
5	<i>Dicoma tomentosa</i> Cass.	Plante entière	Banfora*	ND
6	<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze	Parties aériennes	Koudougou*	ND
7	<i>Ficus thonningii</i> Blume	Feuilles	Godin	07/2007
8	<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch	Feuilles	Godin	07/2007
9	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Feuilles	Bonyolo	06/2007
10	<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) N. Hallé	Feuilles	Banfora	07/2007
11	<i>Psorospermum senegalense</i> Spach	Feuilles	Banfora	07/2007
12	<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn.	Ecorces	Godin	07/2007
		Ecorces 2	Réo	06/2007
		Feuilles	Réo	06/2007
13	<i>Waltheria indica</i> L.	Racines	Réo	09/2007
		Tiges feuillées	Réo	09/2007

2.2.5 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Parmi les 72 espèces végétales recensées pour leur utilisation traditionnelle contre le paludisme au Burkina Faso, les familles botaniques les plus représentées sont les *Fabaceae* (n = 11 sp.) et les *Asteraceae* (n = 9 sp.), ainsi que les *Rubiaceae* et les *Combretaceae*, avec chacune 6 espèces. Par ailleurs, il apparaît qu'environ deux tiers de ces 72 plantes listées ont déjà été étudiées pour leur activité antiplasmodiale dans la littérature scientifique.

Parmi les 13 plantes sélectionnées, 8 d'entre elles n'ont jamais été citées pour leurs propriétés antiplasmodiales et pour les 5 dont l'activité a déjà été mentionnée, aucune substance n'a été identifiée comme responsable de leur activité.

A partir des 17 échantillons récoltés, il s'agira maintenant de réaliser des extraits de polarités différentes et de tester des dilutions de ces extraits sur *P. falciparum* afin d'évaluer leur potentiel antiplasmodial *in vitro* (détermination des CI 50) [Philippe, 2005]. Ce *screening* antiplasmodial se focalisera sur une des facettes du paludisme, la phase érythrocytaire du parasite. Les différents aspects comme les propriétés fébrifuges, gamétocitocides et/ou schizonticides hépatiques éventuelles des plantes, jouant pourtant un rôle important dans une prise en charge globale de la pathologie, ne sont pas pris en compte. Nous espérons, à l'issue de ce *screening* antiplasmodial *in vitro*, pouvoir sélectionner quelques espèces prometteuses en termes de potentialités antipaludiques. La cytotoxicité des extraits montrant une activité devra également être évaluée sur fibroblastes humains afin de vérifier l'absence de toxicité pour des cellules saines et de déterminer un index de sélectivité vis-à-vis du *Plasmodium*. Un fractionnement bioguidé des extraits actifs pourrait alors être envisagé en vue de l'isolement de nouveaux principes actifs dont le mécanisme d'action devra également être déterminé. Différentes possibilités de valorisation de l'espèce au niveau local, dans une recette de MTA antipaludéen, pourraient également être envisagées en fonction des résultats de nos futures investigations.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, en particuliers les Professeurs J-B. Nikiéma (UFR-SDS, Université de Ouagadougou ; DMPT (DGPML) - Ministère de la Santé du Burkina Faso), O. G. Nacoulma (Université de Ouagadougou), J.Millogo-Rasolodimby et S. Guinko (UFR-SVT, Université de Ouagadougou) ainsi que les Docteurs Z.P.Dakuyo (Phytofla) et M. Olivier (Projet PHAVA) pour leur aide et leurs conseils précieux.

Figure 2-3 : Quelques photos des plantes récoltées

Bauhinia rufescens



Boswellia dalzielli



Dicoma tomentosa



Loeseneriella africana



Waltheria indica



Crossopteryx febrifuga



Gardenia sokotensis



Ficus thonningii



Vitellaria paradoxa



Jatropha gossypifolia



Tableau 2-2 : Espèces végétales sélectionnées pour l'étude de leurs potentialités antiplasmodiales

Espèce	Synonyme	FAMILLE	Nom vernaculaire (Mooré)	Morphologie – répartition	Données ethnobotaniques (en rapport avec le traitement du paludisme)	Données bibliographiques disponibles
Bauhinia rufescens Lam.	= <i>Bauhinia adansoniana</i> Guill. et Perr. = <i>Piliostigma rufescens</i> (Lam.) Benth. = <i>Adenobulus rufescens</i> (Lam.) Schmitz [Arbonnier, 2002]	FABACEAE	Tipoèga [Guinko, 1988] Ti-pohèga, pweg-tiiga [Nacoulma, 1996]	Arbuste-buisson Zone soudano sahélienne	Une poignée de tiges feuillées bouillie dans un litre d'eau ; la décoction est bue 2 fois par jour jusqu'à amélioration des symptômes [JDM, Koudougou, 2006]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>B. rufescens</i> ; peu d'étude sur cette espèce → <i>Bauhinia sp.</i> - Extrait EtOH de <i>B. guianensis</i> montre une bonne activité <i>in vivo</i> sur <i>Plasmodium vinckeï</i> mais est faiblement actif <i>in vitro</i> [Muñoz, 2000] - Racemosol et dérivés isolés des racines de <i>B. malabrica</i> ont une activité antimalarique modérée sur <i>P. falciparum</i> [Kittakoop, 2000]
Bergia suffruticosa Fenzl	-	ELATINACEAE	Kwirb kwirbe [Guinko, 1988] Sagab-tiim [Nacoulma, 1996]	Sous arbrisseau vivace ; Zone sahélienne : bord argileux des mares	Toute la plante en décoction (boisson et lavement) contre le palu des enfants [Guinko, 1988] Tiges feuillées en us. interne contre le paludisme infantile [Nacoulma, 1996] Se trouve chez les herboristes des marchés à Koudougou, utilisées contre le palu et comme fortifiant [JDM, 2006]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>B. suffruticosa</i> (ni <i>Bergia sp.</i>) Propriétés antioxydante et anti radicaux libres des parties aériennes [Anandjiwala, 2007] Peu d'études sur cette espèce et cette famille
Boswellia dalzielii Hutch	Arbre à encens (Fr.) [Arbonnier, 2002]	BURSERACEAE	Kômbreyôogo Gômbreyôogo [Guinko, 1988] Gondregneogo Kondregneogo [Nacoulma, 1996]	Arbre Zone sahélienne	Rameaux feuillés utilisés contre le palu [Traore, 1983] En us. interne : tiges feuillées utilisées comme fébrifuge, antiinflammatoire ; Ecorces : contre paludisme avec douleurs intestinales [Nacoulma, 1996] Ecorce : contre les fièvres [Arbonnier, 2002]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>B. dalzielii</i> (ni <i>Boswellia sp.</i>) La résine a des propriétés anti-inflammatoires [Duwiewja, 1993] Activité antibactérienne et antioxydante <i>in vitro</i> de l'écorce de tronc [Alemika, 2006]

<p><i>Crossopteryx febrifuga</i> (Afz ex G. Don) Benth</p>	<p><i>Rondeletia febrifuga</i> Afzel. ex G. Don <i>Rondeletia africana</i> Winterb <i>Crossopteryx kotshyana</i> Fenzl. [Arbonnier, 2002] <i>Crossopteryx africana</i> Baill. [Tropicos]</p>	<p>RUBIACEAE</p>	<p>Kumbrewânga [Guinko, 1988] Kumbrwaga, kansdem-tooré [Nacoulma, 1996]</p>	<p>Arbuste Savanes soudano-guinéennes</p>	<p>Tiges feuillées en décoction à boire et pour se laver en cas de paludisme (propriétés anti-inflammatoires et analgésiques) [Flahaut, 1999] Rameaux utilisé en cas de paludisme, fièvre [Arbonnier, 2002] Tiges feuillées et fruits : en us. interne : contre le paludisme avec douleurs gastro-intestinales, ictère, fièvres,... [Nacoulma, 1996] Tiges feuillées en infusion : contre le palu, en association avec <i>Mitragyna inermis</i> [Traore, 1983] Tiges feuillées en décoction pour boire et se laver, en association avec <i>Fadogia agrestis</i> et <i>Gardenia sokotensis</i> [Guinko, 1988]</p>	<p>Extrait alcaloïdique (feuilles) a une CI50 < 10µg/ml <i>in vitro</i> sur <i>P. falciparum</i> [Sanon, 2003] Bonne activité <i>in vivo</i> de l'extrait EtOH d'écorce de tige contre <i>P. berghei</i> [Elufioye, 2004] Note : Pas de principe actif antiplasmodial isolé</p>
<p><i>Dicoma tomentosa</i> Cass</p>	<p>-</p>	<p>ASTERACEAE</p>	<p>Gômtdiga [Guinko, 1988] Gômtdiga ; sakwipèelga [Nacoulma, 1996]</p>	<p>Herbacée annuelle ramifiée, Afrique intertropicale, Asie tropicale</p>	<p>Toute la plante en décoction (lavements) contre le paludisme des enfants avec inflammation de la rate [Guinko, 1988] Tiges feuillées : Idem ; aussi contre le paludisme des adultes en usage interne [Nacoulma, 1996]</p>	<p>Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>D. tomentosa</i> (<i>ni Dicoma sp.</i>) Germacrolide isolés de <i>D. tomentosa</i> [Bohlmann, 1982] Lactones sesquiterpéniques se retrouvent dans plusieurs espèces du genre <i>Dicoma</i> [Zdero, 1990]</p>
<p><i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze</p>	<p>= <i>Calophanes perrottetii</i> Nees [Tropicos]</p>	<p>ACANTHACEAE</p>	<p>Pârpâré [Nacoulma, 1996 ; Guinko, 1988] Nyi kansar [JDM, 2006]</p>	<p>Plante herbacée à racine semi-vivace ; zone soudannienne</p>	<p>Toute la plante en décoction (lavements et boisson) contre paludisme des enfants Aussi en association avec <i>Gardenia sokotensis</i> [Guinko, 1988] Tiges feuillées : indiquées contre le paludisme et la fièvre en us. interne [Nacoulma, 1996] et se trouvent chez les herboristes de Koudougou ; utilisées contre le paludisme [JDM, 2006]</p>	<p>Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>D. perrottetii</i> (<i>ni de Dyschoriste sp.</i>) ; peu d'étude sur cette espèce. Cité pour son utilisation traditionnelle contre les fièvres, le paludisme et les diarrhées ; riche en composés phénoliques et flavonoïdes ; activité antioxydante [Sawadogo, 2006]</p>

						D'autre <i>Acanthaceae</i> antiplasmodiales : <i>Andrographis paniculata</i> : xanthonés antiplasmodiales [Dua, 2004], <i>Hygrophila guianensis</i> [Weniger, 2001]
<i>Ficus thonningii</i> Blume	= <i>F. microcarpa</i> Vahl = <i>F. schimperi</i> A. Rich. [Arbonnier, 2002] = <i>Ficus burkei</i> Miq. = <i>Ficus petersii</i> Warb [Tropicos]	MORACEAE	Kusga [Nacoulma, 1996]	Arbre moyen des savanes d'Afrique tropicale ; présente des racines aériennes pendantes qui s'enracinent	Feuilles en boisson, dans les accès pernicieux du paludisme [D. Traore, 1983] Feuilles indiquées en cas d'ictère, hépatite, fièvres, anémie [Arbonnier, 2002]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>F. thonningii</i> ; peu d'étude sur cette espèce. → <i>Ficus sp</i> : Feuilles, écorces et racines de <i>F. fistulosa</i> ont des propriétés antiplasmodiales <i>in vitro</i> ; isolement de verrucarine L acetate (trichotécène macrocyclique) qui a une IC 50 < 1 ng/ml [Zhang, 2002] Extrait MeOH d'écorce de racines de <i>F. sur</i> a une activité antiplasmodiale <i>in vivo</i> ; action synergique avec chloroquine [Muregi, 2007] Extrait alcaloïdique de feuilles de <i>F. sycomorus</i> a une IC 50 < 10µg/ml <i>in vitro</i> [Sanon, 2003]
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch	= <i>G. mossica</i> A. Chev. = <i>Randia lucida</i> A. Chev. [Arbonnier, 2002]	RUBIACEAE	Tang rakoènga ; Tang-rambrezûda [Guinko, 1988] Tang-ra-kweenga [Nacoulma, 1996]	Arbuste buissonnant Zone soudano sahélienne	Tiges feuillées : utilisées contre la fièvre Contre le paludisme : en association : - Tiges feuillées en décoction (bains, un peu en boisson) avec <i>Guiera senegalensis</i> , <i>Fadogia agrestis</i> et <i>Psorospermum senegalense</i> - Tiges feuillées avec <i>Dyschoriste perrottetii</i> - Dans les accès palustres avec douleurs gastro-intestinales : en association avec <i>Crossopteryx febrifuga</i> et <i>Fadogia agrestis</i> : tiges feuillées des 3 plantes en décoction, pour se laver et un peu en boisson [Guinko, 1988] Tiges feuillées : contre le palu avec douleurs gastro-intestinales [Nacoulma, 1996]	Extrait CH ₂ Cl ₂ /EtOH (7:3) présente une activité <i>in vivo</i> intéressante sur <i>P. berghei</i> ; l'extrait aqueux est faiblement actif ; Présence de triterpènes, caroténoïdes et flavonoïdes [Traoré, 2006] Peu d'études sur cette espèce. → <i>Gardenia sp</i> : Triterpènes antiplasmodiaux isolés des rameaux de <i>G. saxatilis</i> [Suksamrarn, 2003]

					Rameaux feuillés : paludisme, ictère, coliques [Arbonnier, 2002]	
					Se trouve chez les herboristes sur les marchés à Koudougou, utilisé contre le palu [JDM, 2006]	
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Médecinier rouge [Fr., Arbonnier, 2002]	EUPHORBIACEAE	Wan-bin-bang-ma ; Wan-bien-banguem-daaga [Nacoulma, 1996]	Petit arbuste buissonnant, espèce importée, plantée dans les villages	En usage interne : Tiges feuillées : contre le paludisme; Racines : comme fébrifuge [Nacoulma, 1996] Feuilles indiquées contre les fièvres et les anémies [Arbonnier, 2002]	Extrait aqueux (à chaud) actif <i>in vitro</i> sur <i>P. falciparum</i> [Gbeassor, 1989] Isolement de nombreux diterpènes : jatrophenone [Ravindranath, 2003] ; [Das, 1999] et lignanes : jatrodien [Das, 1996], gossypifan [Das, 1995]
<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) Wilczek	<i>Hippocratea africana</i> Loes ex Engl. <i>H. richardiana</i> Cambess. <i>Salacia africana</i> DC <i>Tonsella africana</i> Willd. [Arbonnier, 2002]	CELASTRACEAE (HIPPOCRATEACEAE)	Zibidga [Guinko, 1988] Zibri [Nacoulma, 1996]	Arbuste ou Liane robuste ramifiée ; Zone soudano sahéenne	Tiges feuillées en décoction à boire et pour se laver en cas de paludisme des enfants avec inflammation de la rate [Flahaut, 1999] Tiges feuillées et Racine : en usage interne : contre le paludisme et les fièvres [Nacoulma, 1996]	Extrait EtOH de racines d' <i>Hippocratea africana</i> actif <i>in vivo</i> sur <i>P. berghei</i> [Okokon, 2006] Peu d'études sur cette espèce Nombreuses Celastraceae antiplasmodiales : <i>Maytenus senegalensis</i> [El Tahir, 2001] ; <i>S. madascariensis</i> [Gessler, 1994] ; <i>Salacia kraussii</i> [Figueiredo, 1998]
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach	= <i>P. guineense</i> Hochr. = <i>P. corymbiferum</i> Hochr. = <i>P. lanatum</i> Hochr. [Arbonnier, 2002]	CLUSIACEAE (GUTTIFERAE)	Wilpenduugu [Nacoulma, 1996; Guinko, 1988]	Arbrisseau tortueux Savane soudano-guinéenne	Tiges feuillées en décoction (bains, un peu en boisson) en association avec <i>Guiera senegalensis</i> , <i>Fadogia agrestis</i> et <i>Gardenia sokotensis</i> [Guinko, 1988] Racines et Ecorces : paludisme, mais toxique pour le rein en usage interne et Feuilles : paludisme en usage interne [Arbonnier, 2002] Feuilles en usage externe dans les accès palustres [Nacoulma, 1996]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>P. senegalense</i> ni d'études phytochimiques sur cette espèce. Nombreuses Clusiaceae / Guttiferae / Hypericaceae antiplasmodiales : <i>Chrysochlamys tenuis</i> [Molinar, 2006] ; <i>Allanblackia monticola</i> [Azebaze, 2007]; <i>Harungana madagascariensis</i> [Lenta, 2007]

Vitellaria paradoxa Gaertn	= <i>Butyrospermum paradoxum</i> Hepper = <i>B. parkii</i> Kotschy	SAPOTACEAE	Taanga [Nacoulma, 1996]	Arbre des régions soudano guinéennes	Feuilles , en infusion en association à <i>Cymbopogon</i> sp. ; se laver quotidiennement avec la préparation pendant 2-3 jours [Mazuel, 1995]	Pas de rapport de l'activité antiplasmodiale de <i>Vitellaria</i> sp. (<i>ni Butyrospermum</i> sp.)
	Karité (Fr.) [Arbonnier, 2002]				Feuilles : paludisme, fièvres en us. interne [Nacoulma, 1996]	Propriétés antibactérienne et antifongique d'extraits MeOH de différentes parties ; présence d'alcaloïdes et de tanins dans les feuilles [Ogunwande, 2001]
Waltheria indica L.	= <i>W. americana</i> L. [Arbonnier, 2002]	STERCULIACEAE	Yar Yaamdé [Nacoulma, 1996]	Plante ligneuse à souche vivace Afrique intertropicale	Décoction tiges feuillées : utilisée pour soigner le paludisme. Une poignée de tiges feuillées est bouillie dans 1 litre d'eau. On boit un verre de la préparation 3 fois par jour jusqu'à amélioration des symptômes [JDM, Réo, 2006]	Extraits MeOH/DCM (1 :1) et aqueux montrés inactifs sur <i>P. falciparum</i> dans un <i>screening</i> en Afrique du Sud [Clarckson, 2004]

2.3 Bibliographie (2)

ALEMIKA, Taiwo E.; Onawunmi, Grace O.; Olugbade, Tiwalade A. Antibacterial phenolics from *Boswellia dalzielii*. Journal of Natural Products and Medicine (2006), 10 108-110.

ANANDJIWALA S, Srinivasa H, Kalola J, Rajani M. (2007) Journal of Natural Medicines, 61 (1), Free-radical scavenging activity of *Bergia suffruticosa*

ARBONNIER Michel, (2002) Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, 2è édition CIRAD, MNHN, ISBN CIRAD : 2-87614-509-X

AZEBAZE, A. G. B.; Dongmo, A. B.; Meyer, M.; Ouahouo, B. M. W.; Valentin, A.; Nguemfo, E. Laure; Nkengfack, A. E.; Vierling, W., (2007) Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 101(1), 23-30 Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of *Allanblackia monticola* (Guttiferae).

BESSOT Lise, These de Docteur d'Etat en Pharmacie, 2009, Université de Strasbourg.

BOHLMANN F., Singh P., Jakupovic J. (1982) Phytochemistry , 21 : 8 , 2122-2124 Germacranolides from *Dicoma tomentosa*

CLARKSON C., Maharaj V. J., N.R. Crouch, O. M. Grace, P.Pillay, M. G. Matsabisa, N. Bhagwandin, P.J. Smith, P. I. Fol. (2004) Journal of Ethnopharmacology 92: 177–191, In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa

DAS, B. , Venkataiah, B. (1999) Biochemical Systematics and Ecology, 27 (7) : 759-760, A rare diterpene from *Jatropha gossypifolia*

DAS, B. ; Rao, S.P. : Srinivas, K.V.N.S. ; Das, R. (1996) Phytochemistry, 41 (3) : 985-987, Jatrodien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*

DAS, B. / Das, R. , (1995) Phytochemistry, 40 (3) : 931-932, Gossypifan, a lignan from *Jatropha gossypifolia*

DUA V.K., V.P. Ojha, R. Roy, B.C. Joshi, N. Valecha, C. U. Devi, M.C. Bhatnagar, V.P. Sharma and S.K. Subbarao (2004) Journal of Ethnopharmacology , 95 (2-3) : 247-251 Anti-malarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*

DUWIEJUA, M , Zeitlin, I J, Waterman, P G , Chapman, J , Mhango, G J , Provan, G J (1993) Planta medica, 59 (1), p.12-16, Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family *Burseraceae*,

EL TAHIR, A. , Satti, G.M.H. , Khalid, S.A. (1999) *Journal of Ethnopharmacology*, 64 (3), 227-233, Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell.

ELUFIOYE T. O. and Agbedahunsi J. M. (2004) *Journal of Ethnopharmacology*, 93, (2-3) , 167-171, Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice in vivo

FIGUEIREDO JN, Ráz B, Séquin U. (1998) *J Nat Prod.* 61(6):718-23. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity.

FLAHAUT Elodie, (1999) Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie : « Pharmacopée et médecine traditionnelle dans l'Ouest du Burkina Faso : Plantes médicinales et soins du couple mère-enfant », Univ. Lille II

GBEASSOR M, Kossou Y, Amegbo K, de Souza C, Koumaglo K, Denke A., (1989) *J Ethnopharmacol.* 25(1):115-8. Antimalarial effects of eight African medicinal plants

GESLER MC, Nkunya MH, Mwasumbi LB, Heinrich M, Tanner M. (1994) *Acta Tropica* 56(1), 65-77. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity.

GUINKO Sita (1988), *Connaissance des arbres et arbustes du Burkina Faso par les langues vernaculaires*, Université de Ouagadougou 1988.

JDM (2006) Association Jardins du monde : données récoltées par Lise Bessot et Céline Crunet (Stagiaires) au cours d'enquêtes ethnobotaniques menées dans le cadre des activités de l'association au Burkina Faso (Boulkiemdé et Sanguié) en 2006.

KITTAKOOP, P, Kirtikara, K, Tanticharoen, M , Thebtaranonth, Y , (2000) *Phytochemistry*, 55 (4), 349-352, Antimalarial pre-racemosols A and B, possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb.

LENTA, Bruno Ndjakou; Ngouela, S; Boyom, F F; Tantangmo, F; Tchouya, G R F; Tsamo, E; Gut, J, Rosenthal, P J; Connolly, J, (2007), *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55(3), 464-467. Anti-plasmodial activity of some constituents of the root bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae).

MAZUEL A-S (1995) Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie, « Le système de santé traditionnel au Burkina Faso : A propos de quelques plantes locales », Univ. Lille II

MILLOGO J. (2006), Module de formation 'Plantes médicinales couramment utilisées pour le traitement traditionnel du paludisme au Burkina Faso' dispensé au cours d'un atelier de formation des DRS et des Pharmaciens de région sur l'évidence ethnomédicale des

médicaments issus de la Pharmacopée traditionnelle¹, organisé par la DMPT, Ouagadougou, 12-13 décembre 2006

MOLINAR-TORIBIO, E.; Gonzalez, J.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; McPhail, K.; Cubilla-Rios, L. (2006) *Pharmaceutical Biology* 44(7) : 550-553 Antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* of xanthenes isolated from *Chrysochlamys tenuis*.

MUÑOZ, V; Sauvain, M ; Bourdy, G ; Callapa J ; Bergeron, S ; Rojas, I ; Bravo, J A; Deharo, E, (2000) *Journal of ethnopharmacology*, 69 (2), 127-137, 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.

MUREGI F. W., A. Ishih, T. Miyase, T. Suzuki, H. Kino, T. Amano, G. M. Mkoji and M. Terada (2007) *Journal of Ethnopharmacology* 111:1 , 190-195: Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice

NACOULMA Odile (1996) Thèse Docteur ès Sciences Naturelles : Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso, Cas du plateau central, Univ. OUAGA

OGUNWANDE IA, Bello MO, Olawore ON, Muili KA. (2001) *Fitoterapia*. 72(1) : 54-6. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*.

OKOKON, J. E.; Ita, B. N.; Udokpoh, A. E. (2006) *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100(7), 585-590. The in-vivo antimalarial activities of *Uvaria chamae* and *Hippocratea africana*.

OMS/UNICEF, « Résumé analytique du Rapport mondial sur le paludisme 2005 ». *The Roll Back Malaria Partnership (RBM)*1, 3 mai 2005

Philippe, G. , Angenot, L., Mol, P.D., Goffin, E., Hayette, M.P. , Tits, M. , Frederich, M. , In vitro screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity , *Journal of Ethnopharmacology* (2005), 97 (3), p.535-539,

POUSSET J-L : Plantes médicinales africaines. Utilisation pratique. Tome I et II. (1989), ISBN : 2-7298-8918-3

POUSSET J-L : Plantes médicinales d'Afrique, comment les reconnaître et les utiliser ? (2004) Edisud, Aix en Provence ; ISBN : 2-7440-0432-5

RAVINDRANATH, N, Venkataiah, B. Ramesh, C. , Jayaprakash, P. , Das, B. (2003) *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 51 (7), 870-871, Jatrophinone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*.

SANON S, Ollivier E, Azas N, Mahiou V, Gasquet M, Ouattara CT, Nebie I, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P, Fumoux F, (2003) J Ethnopharmacol. 86 (2-3):143-7, Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso.

SAWADOGO, W. R; Meda, A.; Lamien, C.E.; Kiendrebeogo, M.; Guissou, I. P.; Nacoulma, O. G. (2006) Journal of Biological Sciences, 6 (2), 249-252 Phenolic content and antioxidant activity of six *Acanthaceae* from Burkina Faso.

SOH P.N. et Benoit-Vical F., Are West African plants a source of future antimalarial drugs? (2007) Journal of Ethnopharmacology 114 (1) : 130–140

SUKSAMRARN A., Tanachatchairatana T. and Kanokmedhakul S. (2003) Journal of Ethnopharmacology, 88 (2-3):275-277 Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*

TRAORE Dominique (1983) Médecines et magies africaines ou Comment le noir se soigne, Ed. Présences africaines, ISBN 2-7087-0597-0

TRAORÉ M., A Guiguemdé, I.Yago, J.B. Nikièma, H. Tintoa, Z.P. Dakuyo, J.B. Ouédraogo, I.P. Guissou, T.R. Guiguemdé, (2006) African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 3 (4) 34-41, Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch

TROPICOS: <http://www.tropicos.org/> consulté en mars 2008 et en février 2013.

WENIGER B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. (2001) J Ethnopharmacol. 78(2-3):193-200 Antiprotozoal activities of Colombian plants.

ZHANG HJ, Tamez PA, Aydogmus Z, Tan GT, Saikawa Y, Hashimoto K, Nakata M, Hung NV, Xuan le T, Cuong NM, Soejarto DD, Pezzuto JM, Fong HH, (2002) Planta Med. 68(12) : 1088-91 Antimalarial agents from plants. III. Trichothecenes from *Ficus fistulosa* and *Rhaphidophora decursiva*

ZDERO C. and Bohlmann F. (1990) Phytochemistry 29 (1) : 83-187, Sesquiterpene lactones from *Dicoma* species

3 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DES EXTRAITS SUR *P. FALCIPARUM*

3.1 Avant-propos

Ce chapitre sera consacré à l'évaluation des propriétés antiplasmodiales des espèces végétales récoltées au Burkina Faso. A partir de chaque échantillon, 3 types d'extraits (dichlorométhane, méthanol et décoction aqueuse) seront préparés et testés *in vitro* sur *P. falciparum* 3D7 (CQ-sensible). Ce screening a pour objectif de déterminer les espèces qui ont une réelle activité envers le parasite et qui sont donc susceptibles de fournir de nouvelles substances antiplasmodiales. Par ailleurs, l'activité détectée lors de ce test démontre la présence de substances antiplasmodiales dans la plante, validant – au moins partiellement – son usage traditionnel contre le paludisme.

Le modèle de test mis en œuvre lors de ce screening est basé sur la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase parasitaire. Ce test possède une bonne sensibilité mais présente tout de même quelques limites par rapport aux conclusions à tirer des résultats obtenus. Il s'agit d'abord d'un modèle *in vitro* dans lequel tout effet lié à la métabolisation de principes actifs éventuels (activation de pro-drug ou inactivation) n'est pas pris en compte. D'autre part, ce test permet uniquement de détecter une activité au niveau de la phase intra-érythrocytaire de développement du parasite. Certaines plantes montrées inactives lors de ce screening pourraient donc ne pas être complètement dénuées d'intérêt dans la prise en charge globale de la maladie, par une action sur d'autres phases du cycle du *Plasmodium* ou sur les symptômes associés aux crises de paludisme, ces activités n'étant pas décelables lors du présent screening.

Les extraits identifiés comme les plus actifs lors de ce screening *in vitro* seront testés sur souche CQ-résistante de *P. falciparum*, et leur toxicité envers des cellules humaines sera également évaluée afin de déterminer la sélectivité de leur activité envers le parasite. Les plantes les plus intéressantes seront enfin sélectionnées pour un fractionnement bio-guidé.

L'essentiel de ce chapitre est constitué par la publication: **“Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties.”** publiée dans **Journal of Ethnopharmacology (2010) 130, 143–150**, et dans laquelle sont détaillées les méthodologies utilisées et les résultats de ce screening antiplasmodial. L'(in)activité de chaque espèce végétale y est également discutée. Une brève discussion quant aux plantes à sélectionner pour un fractionnement bio-guidé sera proposée à l'issue de ce chapitre, en guise d'**avant propos aux chapitres 4 et 5.**

3.2 "Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties."

Journal of Ethnopharmacology 130 (2010) 143–150



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties

Olivia Jansen^{a,*}, L. Angenot^a, M. Tits^a, J.P. Nicolas^b, P. De Mol^c, J.-B. Nikiéma^{d,e}, M. Frédérick^a

^aLaboratoire de Pharmacognosie, Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament (CRM), Université de Liège, Av. de l'Hôpital 1, CHU-B36, B-4000 Liège, Belgium
^bAssociation Jardins du Monde, 15, rue St Michel, 29190 Brasparts, France
^cLaboratoire de Microbiologie médicale, Université de Liège, Av. de l'Hôpital 1, B23, B-4000 Liège, Belgium
^dUnité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021, Ouagadougou 03, Burkina Faso
^eDirection de la promotion de la médecine et de la pharmacopée traditionnelle, Ministère de la Santé, 03 BP 7009, Ouagadougou 03, Burkina Faso

<p>ARTICLE INFO</p> <p><i>Article history:</i> Received 8 February 2010 Received in revised form 13 April 2010 Accepted 20 April 2010 Available online 7 May 2010</p> <hr/> <p><i>Keywords:</i> Malaria Antiplasmodial activity <i>Dicoma tomentosa</i> <i>Psorospermum senegalense</i> Burkina Faso Traditional medicine</p>	<p>ABSTRACT</p> <p><i>Aim of the study:</i> The aim of this study was to evaluate the antiplasmodial properties of 13 plants used against malaria in traditional medicine in Burkina Faso.</p> <p><i>Materials and methods:</i> <i>In vitro</i> antiplasmodial activity of dichloromethane, methanol and aqueous crude extracts obtained from vegetal samples collected in Burkina Faso was first evaluated on the <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 chloroquine-sensitive strain using a colorimetric method.</p> <p><i>Results:</i> Thirteen extracts obtained from 8 different species were found to exhibit antiplasmodial activity (IC₅₀ < 50 µg/ml). Five species demonstrated a moderate activity (15 µg/ml < IC₅₀ < 50 µg/ml): <i>Boswellia dalzielii</i> (leaves), <i>Waltheria indica</i> (roots and aerial parts), <i>Bergia suffruticosa</i> (whole plant), <i>Vitellaria paradoxa</i> (bark) and <i>Jatropha gossypifolia</i> (leaves). The best results were obtained with extracts from the <i>Dicoma tomentosa</i> whole plant, from <i>Psorospermum senegalense</i> leaves and from <i>Gardenia sokotensis</i> leaves. These extracts found to display promising antiplasmodial activity, with IC₅₀ values ranging from 7.0 to 14.0 µg/ml.</p> <p>The most active plant extracts were then tested for <i>in vitro</i> activity on the <i>Plasmodium falciparum</i> W2 chloroquine-resistant strain and also for <i>in vitro</i> cytotoxicity on normal human fibroblasts (WI-38) in order to determine the selectivity index.</p> <p><i>Conclusions:</i> <i>Dicoma tomentosa</i> (Asteraceae) and <i>Psorospermum senegalense</i> (Clusiaceae) appeared to be the best candidates for further investigation of their antiplasmodial properties, reported for the first time by this study.</p> <p style="text-align: right; font-size: x-small;">© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2.1. INTRODUCTION

Malaria, a parasitic disease caused by *Plasmodium sp.* and transmitted by *Anopheles* mosquitoes, currently ranks highly among the most important infectious diseases around the world. The disease mainly affects Southern countries where malaria is a major public health problem. According to the last World Malaria Report [WHO, 2009], there are almost 250 million malaria cases and about one million people dying of malaria each year. The majority of deaths from malaria occur in the sub-Saharan African region (89%), particularly in children under 5 years of age (88%). The World Health Organization (WHO) has estimated that one child dies of malaria every 40 seconds.

The situation is all the more critical because a growing problem of parasite resistance towards available drugs, particularly chloroquine, has occurred in recent years. The WHO is now promoting ACT (artemisinin-based combination therapy) as the reference drugs for health care management of uncomplicated falciparum malaria in order to reduce the resistance risk [WHO, 2006]. However, resistance to artemisinin has been recently described in Asia [Burki, 2009; Egan, 2009]. It is thus now more necessary than ever to continue the search for new antimalarial drugs.

The vegetal kingdom remains a good source of pharmacologically active compounds and especially antiplasmodial agents, as reviewed by Bero et al. (2009) and Kaur et al. (2009). In this context, the pharmacological and phytochemical study of plants from traditional pharmacopoeias could lead not only to the discovery of new antimalarial “lead compounds”, but also to the valorization of local vegetal species whose efficacy and safety would have been demonstrated in laboratory investigations. Indeed, people from developing countries often do not have access to modern therapeutics such as ACT to treat malaria because of financial, geographical and/or cultural obstacles.

The WHO estimates that up to 80% of the world’s population relies on traditional medicinal products for some aspects of primary health care. Better knowledge of plants from traditional pharmacopoeias and local valorization of validated traditional remedies in ITM (Improved Traditional Medicine) could lead to access to effective, standardized, available and affordable therapeutics for management of malaria by local populations.

Moreover, the pharmacological value detected for tropical species represents a huge argument for the conservation of biodiversity through the protection of species of medicinal interest. It is therefore important to report scientific evidence of the usefulness of plants in order to prevent the extinction of valuable species.

We decided to focus our study on the flora of Burkina Faso, to search for plants which could be active against *Plasmodium falciparum*. The plants were selected using an ethnopharmacological approach: we first identified and listed the plants used by local people for the traditional healing of malaria. In this West African country, the WHO estimated up to 3.5 million cases of malaria in 2008 – for a population of 15 million inhabitants –with 50% of cases being observed in children under 5 years age [WHO, 2009]. Malaria thus has a major socio-economic impact and is also associated with mortality (about 8000 deaths in 2008) and a high incidence of serious complications, mainly in children under 5 years of age. The use of traditional medicine and plants is still widespread in the country for malaria health care management, often in association with modern treatment, especially chloroquine and paracetamol [Beiersmann et al., 2007].

Ethnopharmacological investigations conducted in Burkina Faso allowed us to identify 72 vegetal species used in traditional medicine to treat malaria. From these 72 species, we selected 13 plants with the intention of investigating their antiplasmodial properties. Selection was mainly based on our ethnopharmacological data but also on bibliographic data collected for the listed species. Chemotaxonomic links with species from the same genus or family already known to exhibit antiplasmodial properties and the possibility of local valorization of active and non-toxic plants in “Improved Traditional Medicine” (ITM) was also considered [Jansen et al., 2008]. Finally, 17 samples obtained from the 13 selected species were collected in different areas of Burkina Faso (**Table 3-1**).

The aim of this study was firstly, to evaluate the antiplasmodial activity of extracts obtained from the 13 selected plants in order to identify active species to be investigated in further studies and secondly, to (un)confirm traditional use of these medicinal plants against malaria.

Dichloromethane, methanol and aqueous crude extracts were prepared for each plant sample and their *in vitro* antiplasmodial activity was evaluated on the *Plasmodium falciparum* 3D7 chloroquine-sensitive strain using a colorimetric method [Kenmogne et al., 2006]. The most active plant extracts were then tested for *in vitro* activity on the *Plasmodium falciparum* W2 chloroquine-resistant strain and their selectivity index was also evaluated using the WST-1 assay on WI-38 normal human foetal lung fibroblasts.

3.2.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.2.1. Plant Material

For the 13 selected plant species, a total of 17 vegetal samples (leaves, twigs, bark, aerial parts, roots and whole plants, depending on the species) were collected in different areas of Burkina Faso (Centre-West region and Cascades region), between June 2007 and October 2007. The samples were authenticated by the Botany Department Staff of the “UFR/SVT, Université de Ouagadougou” in Burkina Faso and confirmed by the National Botanic Garden of Belgium (Meise). Voucher specimens were deposited at the National Botanic Garden of Belgium at Meise and at the Herbarium of the Laboratory of Pharmacognosy at the University of Liège (Belgium). Details are shown in **Table 3-1** for each sample. The samples (mainly leaves and aerial parts) were washed, dried in a ventilated room and then powdered.

3.2.2.2. Crude Extracts

Dichloromethane and methanol crude extracts were obtained by macerating 5 g of dried plant powder (leaves, twigs, barks, aerial parts, etc.) three times with 50 ml of

solvent, under shaking for 30 min. The preparation was filtered and evaporated under reduced pressure. For the aqueous crude extracts, we proceeded by decoction of 5 g of dried plant powder in 150 ml distilled water for 1 h in order to try to approximate the traditional preparation method. The preparation was filtered and freeze dried. Three extracts were finally obtained for each sample with a total of 51 extracts.

Table 3-1: Selected plants and collected samples

Species	Family	Plant part	Place of collection	Voucher number	Traditional use (associated with malaria and related symptoms)	Previous report of antiplasmodial activity
<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	Fabaceae	Le.	Koudougou	BR0000005012077	Malaria (leafy stem decoction)	No report for <i>Bauhinia rufescens</i> but reported for other <i>Bauhinia</i> sp. Muñoz et al. (2000) and Kittakoop et al. (2000)
<i>Bergia suffruticosa</i> Ferz. l.	Elatinaceae	Tw. Wh.Pl.	Koudougou Koudougou	BR0000005012077 07-BFOJ-06	Childhood malaria – tonic (whole plant decoction)	No report
<i>Boswellia dalzielii</i> Hutch.	Burseraceae	Le.	Kassou	BR0000005011971	Malaria – fever (leaf and bark decoction)	No report
<i>Crossopteryx febrifuga</i> Benth.	Rubiaceae	Le.	Banfora	07-BFOJ-10	Malaria – fever – icterus (leafy stem decoction – sometimes in combination)	<i>In vitro</i> activity of leaf alkaloid extract (<i>Plasmodium falciparum</i>) Sanon et al. (2003) and <i>in vivo</i> activity of stem bark EtOH extract (<i>Plasmodium berghet</i>) Elufoye and Agbedahunsi (2004)
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass.	Asteraceae	Wh. Pl.	Banfora	07-BFOJ-02	Childhood malaria with spleen inflammation (whole plant decoction); also for adults	No report
<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze	Acanthaceae	Ae.Pa.	Koudougou	07-BFOJ-01	Childhood malaria (aerial part decoction)	No report
<i>Ficus thonningii</i> Blume	Moraceae	Le.	Godin	07-BFOJ-09	Malaria (pernicious form) – fever (leaf decoction)	No report for <i>Ficus thonningii</i> but reported for other <i>Ficus</i> sp. Sanon et al. (2003) and Muregi et al. (2007)
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch.	Rubiaceae	Le.	Godin	BR0000005012299	Fever – malaria with gastrointestinal disorder (leaf decoction – often in combination)	<i>In vivo</i> activity of DCM:EtOH (7:3) extract (<i>Plasmodium berghet</i>) Traoré et al. (2006)
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Euphorbiaceae	Le.	Bonyolo	BR0000005144952	Malaria – fever – anaemia (leaf decoction)	<i>In vitro</i> activity of hot water extract (<i>Plasmodium falciparum</i>) Gbeassor et al. (1989)
<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) N. Hallé Syn: <i>Hippocatea africana</i> Loes ex Engl.	Celastraceae	Le.	Banfora	BR0000005012190	Fever – childhood malaria with spleen inflammation (leaf decoction)	<i>In vivo</i> activity of EtOH roots extract (<i>Plasmodium berghet</i>) Okokon et al. (2006)
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach.	Clusiaceae	Le.	Banfora	BR0000005012398	Malaria (leaf decoction – sometimes in combination)	No report
<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn. syn. <i>Butyrospermum paradoxum</i> Hepper	Sapotaceae	Ba. (1)	Godin	07-BFOJ-08	Malaria – fever – icterus (leaf decoction or infusion)	No report
<i>Waltheria indica</i> L.	Sterculiaceae	Ba. (2)	Réo	BR0000005012176	Malaria (aerial part decoction)	<i>In vitro</i> inactivity of water and DCM:MeOH (1:1) extracts Clarkson et al. (2004)
		Le.	Réo	BR0000005012176		
		Ae. Pa.	Réo	07-BFOJ-13		
		Ro.	Réo	07-BFOJ-13		

e. = leaves; Tw. = twigs; Ba. = bark; Ro. = roots; Ae.Pa. = aerial parts; Wh.Pl. = whole plant.

3.2.2.3. Antiplasmodial Assays**Culture**

Continuous cultures of the *Plasmodium falciparum*, chloroquine-sensitive (3D7) and chloroquine-resistant (W2) strains were maintained following the method of Trager and Jensen (1976), as described by Frédérick et al. (2002). Both strains were obtained from Prof. Grellier ("Museum National d'Histoire Naturelle" in Paris, France).

Assays

Each extract was first dissolved in DMSO (Sigma) to a concentration of 10 mg/ml. *Plasmodium falciparum* culture was placed in contact with a set of 8 twofold dilutions of each extract in medium (final concentrations ranging from 0.8 to 100 µg/ml and final DMSO concentration \leq 1%) on 2 columns of a 96-well microplate for 48 h. Parasite growth was estimated by colorimetric revelation (630 nm) based on the measurement of the plasmodial lactate dehydrogenase activity according to the method of Makler et al. (1993) and as described previously by Kenmogne et al. (2006). Artemisinin (Sigma–Aldrich) and chloroquine (Sigma–Aldrich) were used as standards, and infected and uninfected erythrocytes were added as positive and negative controls, respectively. IC₅₀ values, indicating the concentration of the drug needed to obtain 50% inhibition of parasite growth, were calculated by linear regression from a set of eight concentrations tested for each extract. Each extract was tested in triplicate (n = 3).

3.2.2.4. Cytotoxicity Assays**Culture**

WI-38 normal human foetal lung fibroblasts were maintained in continuous culture in DMEM medium (Bio Whittaker) in a humid atmosphere at 37 °C and 5.5% CO₂. Each medium was supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Bio Whittaker), 1% L-glutamine (200mM) (Bio Whittaker) and antibiotics: penicillin (100 UI/ml) – Streptomycin (100 µg/ml) (Pen-strep®, Bio Whittaker).

Assays

Each extract was first dissolved in DMSO (Sigma) to a concentration of 10 mg/ml. For the assays, 96-well tissue culture microplates (Micro Test-96®, Falcon, Becton-Dickinson) were seeded with 200 µl medium containing 8000 cells in suspension. After 24 h incubation, cells were treated with 6 dilutions with final concentrations of crude extracts in culture medium of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml and a final DMSO concentration \leq 1%. After 48 h incubation, cell viability was determined by adding WST-1 (Roche Biomolecular) tetrazolium salt as a cytotoxicity indicator and by reading absorbance at 450 nm with a scanning multiwell spectrophotometer after about a 1-h wait. Tetrazolium salts are cleaved to formazan dye by cellular enzymes. The absorbance directly correlates to the viable cell number.

Each condition was reproduced in triplicate and each set of tests was performed twice. Camptothecin (Sigma–Aldrich) was used as a positive cytotoxic control. IC₅₀ values, indicating the concentration of the drug needed to obtain 50% inhibition of

cell growth, were calculated by linear regression from a set of six concentrations tested for each extract.

Selectivity index (SI)

The SI value allows the evaluation of the toxicity impact of the extracts against normal human cells compared to the toxicity against the parasite and allows the assessment of the selectivity of extracts for the parasite. The SI is calculated as the ratio between cytotoxic IC50 values and 3D7 or W2 parasitic IC50 values.

3.2.3. RESULTS

The 17 vegetal samples obtained from 13 selected plants traditionally used against malaria were extracted by dichloromethane, methanol and water to give 51 extracts. These extracts were first tested for activity against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. Antiplasmodial results are presented in **Table 3-2**.

In line with WHO guidelines and with previous results from our team [Jonville et al., 2008; Philippe et al., 2005; Pink et al., 2005], antiplasmodial activity was classified as follows: IC50 ≤15µg/ml: promising activity; IC50 = 15–50µg/ml: moderate activity; IC50 >50µg/ml: weak activity, but at a level that could not explain the existence of antiplasmodial activity in the plant; IC50 > 100µg/ml: inactivity.

Thirteen extracts obtained from 8 different plants displayed antiplasmodial activity (IC50 <50µg/ml). The dichloromethane extracts were generally more active than the methanol and water extracts. Five species showed moderate activity (15µg/ml < IC50 <50µg/ml): *Boswellia dalzielii* (leaves), *Waltheria indica* (roots and aerial parts), *Bergia suffruticosa* (whole plant), *Vitellaria paradoxa* (bark) and *Jatropha gossypifolia* (leaves).

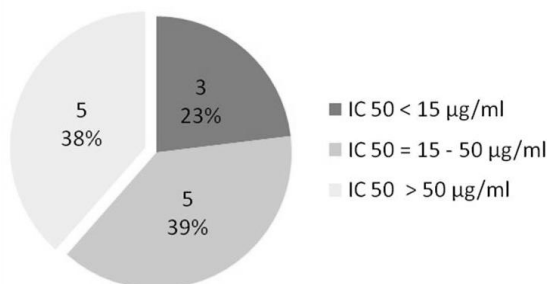


Figure 3-1: Classification of the species according to antiplasmodial IC50

The best results were obtained with extracts from the *Dicoma tomentosa* whole plant, from *Psorospermum senegalense* leaves and from *Gardenia sokotensis* leaves. These extracts displayed promising antiplasmodial activity, with IC₅₀ values ranging from 7.0 to 14.0µg/ml.

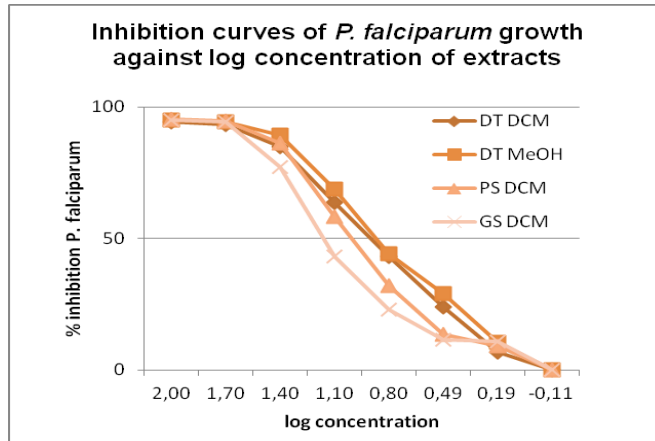


Figure 3-2: Inhibition of *P. falciparum* 3D7 growth according to log concentration for the 4 most active extracts (DT = *Dicoma tomentosa*; GS = *Gardenia sokotensis*; PS = *Psorospermum senegalense*)

Among active plants, the *in vitro* antiplasmodial activity of *Jatropha gossypifolia* was previously reported by Gbeassor et al. (1989) and *Gardenia sokotensis* was also reported to exhibit *in vivo* antiplasmodial activity by Traoré et al. (2006).

However, the present study constitutes the first report of activity against the *Plasmodium falciparum* of *Dicoma tomentosa*, *Psorospermum senegalense* and also of *Boswellia dalzielii*, *Bergia suffruticosa*, *Waltheria indica* and *Vitellaria paradoxa*. *Dicoma tomentosa* was the most active species on the 3D7 strain and the only one for which the aqueous extract showed significant activity against *Plasmodium falciparum*.

Table 3-2: Antiplasmodial activity (IC₅₀) of the 51 extracts against *Plasmodium falciparum* 3D7 strain.

<i>Species</i> (<i>FAMILY</i>)	Sample	CH ₂ Cl ₂ Extracts IC ₅₀ 3D7 ± S.D (µg/ml)	MeOH Extracts IC ₅₀ 3D7 ± S.D (µg/ml)	H ₂ O Extracts IC ₅₀ 3D7 ± SD (µg/ml)	Yield CH ₂ Cl ₂ Extracts	Yield MeOH Extracts	Yield H ₂ O Extracts
<i>Bauhinia rufescens</i> Lam. (FABACEAE)	Leaves	52.96 ± 7.43	> 100	> 100	2.2 %	24.2 %	27.1 %
	Twigs	> 100	> 100	> 100	0.7 %	7.1 %	16.7 %
<i>Bergia suffruticosa</i> Fenzl. (ELATINACEAE)	Whole plant	19.53 ± 2.50	> 100	> 100	1.2 %	12.7 %	15.8 %
<i>Boswellia dalzielii</i> Hutch (BURSERACEAE)	Leaves	41.01 ± 11.30	18.85 ± 1.93	> 100	4.7 %	24.7%	33.4 %
<i>Crossopteryx febrifuga</i> Benth (RUBIACEAE)	Leaves	56.85 ± 5.15	> 100	> 100	4.0 %	30.0 %	31.9 %
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass. (ASTERACEAE)	Whole plant	7.90 ± 0.26	7.04 ± 1.15	21.87± 6.33	3.9 %	4.1 %	8.3 %
<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze (ACANTHACEAE)	Aerial parts	> 100	> 100	> 100	2.6 %	7.3 %	4.8 %
<i>Ficus thonningii</i> Blume (MORACEAE)	Leaves	58.74 ± 9.65	> 100	> 100	1.8 %	10.6 %	25.6 %
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch. (RUBIACEAE)	Leaves	14.01 ± 3.60	27.62 ± 7.83	> 100	9.1 %	17.9 %	23.3 %
<i>Jatropha gossypifolia</i> L. (EUPHORBIACEAE)	Leaves	35.66 ± 2.86	87.65 ± 7.84	> 100	2.8 %	8.8 %	27.5 %
<i>Loeseneriella africana</i> N. Hallé (CELASTRACEAE)	Leaves	> 100	> 100	> 100	2.9 %	13.2 %	30.0 %
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach (CLUSIACEAE)	Leaves	10.03 ± 2.00	80.46 ± 13.61	> 100	2.8 %	22.3 %	24.3 %
<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn. (SAPOTACEAE)	Bark (Godin)	43.94 ± 13.44	78.11 ± 12.25	> 100	3.7 %	17.1 %	16.2 %
	Bark (Reo)	81.24 ± 10.19	> 100	> 100	4.1 %	19.1 %	16.8 %
	Leaves (Reo)	55.45 ± 12.60	> 100	> 100	5.4 %	22.6 %	25.2 %
<i>Waltheria indica</i> L. (STERCULIACEAE)	Aerial parts	33.73 ± 13.44	57.21 ± 11.64	> 100	1.3 %	10.5 %	23.8 %
	Roots	29.71 ± 6.23	62.09 ± 14.80	> 100	0.6 %	15.3 %	16.2 %

Artemisinin: IC₅₀ = 0.0067 ± 0.0018 µg/ml; Chloroquine: IC₅₀ = 0.016 ± 0.004 µg/ml
 Values in bold show a significant level of activity.

The four most active extracts ($IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$), obtained from three different plant species, were tested for *in vitro* activity against the *Plasmodium falciparum* W2 chloroquine-resistant strain, in order to confirm their activity. All four extracts were at least as active against this second strain.

The selectivity of those extracts was then evaluated using the WST-1 cytotoxicity assay on normal human foetal lung fibroblasts in order to check that their toxicity was specific to the parasite. The impact of the toxicity was established by analysing the selectivity index (SI) values. Only *Psorospermum senegalense* showed some selectivity ($SI > 3$), while *Gardenia sokotensis* dichloromethane extract showed an SI (WI-38/3D7) < 1 . Additional results obtained with the most active extracts are summarized in Table 3-3.

Table 3-3: Antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (3D7 and W2 strains) and cytotoxicity on WI-38 normal human fibroblasts, for the most active extracts

Species	Extracts	IC_{50} WI38 \pm S.D (μg/ml)	IC_{50} 3D7 \pm S.D (μg/ml)	SI* _{3D7}	IC_{50} W2 \pm S.D (μg/ml)	SI* _{W2}
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass. (ASTERACEAE)	CH ₂ Cl ₂	17.03 \pm 3.01	7.90 \pm 0.26	2.2	6.34 \pm 1.49	2.7
	MeOH	15.96 \pm 3.53	7.04 \pm 1.15	2.3	7.25 \pm 1.68	2.2
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch. (RUBIACEAE)	CH ₂ Cl ₂	12.67 \pm 1.13	14.01 \pm 3.60	0.9	6.75 \pm 1.29	1.9
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach (CLUSIACEAE)	CH ₂ Cl ₂	36.39 \pm 6.86	10.03 \pm 2.00	3.6	3.63 \pm 0.49	10.0

* Selectivity index is calculated by $SI = IC_{50(WI38)} / IC_{50(3D7 \text{ or } W2)}$, respectively).
 Standard drugs: Artemisinin (3D7): $IC_{50} = 0.0067 \pm 0.0018 \mu\text{g/ml}$; Artemisinin (W2): $IC_{50} = 0.0034 \pm 0.0009 \mu\text{g/ml}$;
 Chloroquine (3D7): $IC_{50} = 0.016 \pm 0.004 \mu\text{g/ml}$; Chloroquine (W2): $IC_{50} = 0.35 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$; Camptothecin (WI-38): $IC_{50} = 0.029 \pm 0.011 \mu\text{g/ml}$

3.2.4. DISCUSSION

Eight of the 13 selected plants used for traditional malaria healing in Burkina Faso exhibited promising to moderate antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum*, the causative agent of the disease. These findings provide some evidence underlying the traditional use of these plants as antimalarials.

However, it is not so easy to draw conclusions from *in vitro* results in order to (un)confirm the use of plants in traditional medicine [Gertsch, 2009], particularly in the field of malaria, a disease which involves many different symptoms and which has a complex physiopathology. Indeed, several plants that are frequently reported

to be used as antimalarials in different countries do not necessarily show high activity in *in vitro* screening.

For the 8 active plants in this study, the detected antiplasmodial activity allows the validation, at least partially, of the traditional use of these plants for malaria symptom management. For the inactive species, we cannot conclude categorically to their uselessness in traditional malaria healing. In fact, several elements might explain the absence of activity for some of the evaluated extracts. Firstly, the *in vitro* test model used in this study reproduces the erythrocytic development stage of the parasite but some plants could also be active against the liver phase of *Plasmodium* development, as shown by Carraz et al. (2006) and documented in a review by Bourdy et al. (2008). This activity against hepatic schizonts could not be detected with our *in vitro* model but such plants could however act as prophylactics as well as treatment of the dormant hypnozoites which can cause relapses sometimes several months after the first infection (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*).

Moreover, traditional remedies often consist of a combination of several different plants and some plants used in the treatment could have therapeutic effects other than an antiparasitic effect, such as antipyretic, analgesic, hepatoprotective, anti-inflammatory or immunomodulatory effects. The different constituents of the mixture can exert a synergistic action against several associated symptoms of malaria, and this synergy has an impact on the patient's recovery. Finally, plants could be effectively more active against *Plasmodium falciparum* in man than *in vitro*, as is the case for plants containing prodrugs. Prodrugs are non-active by themselves and need a metabolization step in order to become active drugs; they cannot therefore be detected in an *in vitro* test model. This could also explain why dichloromethane extracts are generally more active *in vitro* than aqueous extracts; these extracts are even closer to the remedies produced by the traditional preparation method, but contain polar compounds such as heterosides. Like prodrugs, it is possible that these heterosides are inactive *in vitro* but active *in vivo* after metabolization, and that dichloromethane extract contains the corresponding aglycone, which may be capable of being active *in vitro* without the need of a metabolization step.

3.2.4.1. *Bauhinia rufescens* Lam.

A decoction of *Bauhinia rufescens* leafy stems is used in traditional medicine in Burkina Faso to treat malaria and fevers. In the present study, no significant activity was found in any extracts obtained from either sample collected for this species. There is no previous report of the



antiplasmodial properties of this plant, although other *Bauhinia species* (*Bauhinia guianensis*, *Bauhinia malabrica*) have been found to be active in different studies [Kittakoop et al., 2000; Muñoz et al., 2000].

3.2.4.2. *Bergia suffruticosa* Fenzl.



The whole plant is traditionally used in Burkina Faso to treat childhood malaria, and it is also used as a tonic. Our results showed that only dichloromethane extract was moderately active against *Plasmodium falciparum*. The antiplasmodial properties of this plant have been highlighted for the first time in this study. The *Elatinaceae* family is not very widely studied in

the literature. However, *Bergia suffruticosa* is known to exhibit free-radical scavenging activity [Anandjiwala et al., 2007] and was recently described to contain antibacterial compounds [Elegami, 2009].

3.2.4.3. *Boswellia dalzielii* Hutch.

Decoctions of the leaves and bark of this plant are used for the traditional treatment of malaria, fevers and inflammation. We found methanol leaf extract to be more active against *Plasmodium falciparum* than dichloromethane extract. This study is the first report of the antiplasmodial properties of *Boswellia dalzielii*. The resin of this tree has been shown to exhibit anti-inflammatory activity [Duwiejua, 1993], while stem bark extracts have been shown to possess antioxidant and antibacterial properties [Alemika, 2006].



3.2.4.4. *Crossopteryx febrifuga* Benth.



The leaves of this plant are used (often in combination with other plants) in Burkina Faso and West Africa to treat malaria and related symptoms such as fevers and icterus but also to treat many different disorders. No significant *in vitro* antiplasmodial activity was detected in our tests for this species. Antiplasmodial properties of this plant have previously been described *in vitro* for alkaloid leaf

extract (IC₅₀ <10µg/ml) by Sanon et al. (2003) and also *in vivo* by Elufioye and Agbedahunsi (2004) for ethanol stem bark extract.

However, to our knowledge, no active compound has been isolated to date. The lack of activity observed in our study could be explained by the fact that we tested crude extracts and not alkaloid extracts and/or that we tested only leaf extracts (and not stem bark) against an *in vitro* model (and not *in vivo*).

3.2.4.5. *Dicoma tomentosa* Cass.



Dichloromethane and methanol *Dicoma tomentosa* whole plant extracts were found to be the most active against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. This was the only species for which the aqueous extract (the nearest to the method of preparation of traditional remedies) also showed moderate antiplasmodial activity. Activity of *Dicoma tomentosa* was confirmed on the W2 chloroquine-resistant strain. This study is the first report on the antiplasmodial properties of this plant. Named “gômtigda” in the local language (Mooré), this Asteraceae is mainly used for the traditional treatment of malaria in adults and children in Burkina Faso.

The plant is known to contain flavonoids [Aqil et al., 1998, 2001; Aqil and Khan, 1999a,b] and sesquiterpen-lactones [Bohlmann et al., 1982; Krishna et al., 2003; Zdero and Bohlmann, 1990]. There are no data concerning antiplasmodial or any other pharmacological properties of this plant or isolated compounds, but another species, *Dicoma anomala*, has already been reported to possess antiplasmodial properties [Matsabisa et al., 2006].

3.2.4.6. *Dyschoriste perottetii* O. Kuntze

A decoction of the aerial parts of this plant is used in traditional medicine in Burkina Faso for the treatment of childhood malaria. All extracts were found to be inactive against *Plasmodium falciparum* in our tests. Few data are available regarding this plant and there is no previous report of its antiplasmodial properties. The plant's antioxidant properties were identified by Sawadogo et al. (2006), who also reported its use in fever, malaria and diarrhoea and its rich content of phenolic compounds and flavonoids.



3.2.4.7. *Ficus thonningii* Blume



The leaves of this tree are traditionally used in Burkina Faso to treat malaria and related symptoms such as fever, icterus and anaemia but also pernicious malaria. No significant antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* was detected for this plant in our study. Few data are available regarding this plant and there is no previous report of antiplasmodial properties. However, other *Ficus sp.* have been found to be active as shown *in vivo* by Muregi et al. (2007) for *Ficus sur* (leaves and stem barks) and also *in vitro* by Sanon et al. (2003) for leaf extract of *Ficus sycamorus*.

3.2.4.8. *Gardenia sokotensis* Hutch.

Dichloromethane and methanol extracts of *Gardenia sokotensis* leaves showed, respectively, promising and moderate antiplasmodial activity but dichloromethane extract also exhibited a high cytotoxic activity (SI(WI-38/3D7) = 0.9). The leaves of this bush tree are used in traditional remedies (often in combination with other plants) in Burkina Faso to treat malaria and some



related symptoms such as fevers, weakness, icterus and gastrointestinal disorders. Few bibliographic data are available regarding this plant but its antiplasmodial properties have already been described by Traoré et al. (2006) with an *in vivo* model of *Plasmodium berghei*. The same study showed the presence of flavonoids, triterpens and carotenoids in the plant, but the active compounds were not identified. Another *Gardenia species* (*Gardenia saxatilis*) has been shown to contain antiplasmodial triterpens [Suksamrarn et al., 2003].

3.2.4.9. *Jatropha gossypifolia* L. This plant is used in traditional medicine to treat malaria and fevers but also various other disorders.

Only the dichloromethane extract of our leaf sample was found to be moderately active against *Plasmodium falciparum*. Hot water extract of *Jatropha gossypifolia* leaves has already been shown to exhibit *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum* [Gbeassor et al., 1989] for a specimen collected in Togo. The fact that no activity was detected in our aqueous extract could be explained by a different

place of collection and/or a different experimental methodology (e.g. proceeding by working on patients' blood and counting parasites). Many different compounds have been isolated from this plant (mainly terpenoids, lignans, alkaloids, flavonoids, and amino and fatty acids), as reviewed by Kakade et al. (2008). However, to our knowledge, there has been no study on the antiplasmodial properties of isolated compounds from *Jatropha gossypifolia*.



Other pharmacological properties such as antimicrobial, anticoagulant and anticancer activity have been detected for some crude extracts and isolated compounds [Kakade et al., 2008].

3.2.4.10. *Loeseneriella africana* (Willd.) N. Hallé (syn. *Hippocratea africana* Loes ex Engl.)



The leaves and roots of this plant are used in traditional medicine by the local population in Burkina Faso to treat malaria and fevers. All extracts (leaves) were found to be inactive against *Plasmodium falciparum* in our tests. However, *in vivo* antiplasmodial properties against *Plasmodium berghei* were previously shown by Okokon et al. (2006) for ethanol roots extract obtained from *Hippocratea Africana*, a botanical synonym for *Loeseneriella africana*, but no active compounds were isolated.

3.2.4.11. *Psorospermum senegalense* Spach.

Our results showed that dichloromethane extract of *Psorospermum senegalense* leaves demonstrated promising activity against both strains. This extract was found to be the most active on the W2 chloroquine-resistant strain and showed a good SI(WI-38/W2) equal to 10. This plant is traditionally used to treat malaria and also different disorders (particularly skin disorders but also epilepsy) in some West African countries. There is no previous report of the antiplasmodial properties of this plant, which, to date, has not been much studied. Recently, anticonvulsive

properties were found in ethanol extract from the roots of this plant [Pedersen et al., 2009]. We found no phytochemical studies in the literature for this species. However, there is a great deal of ambiguity in the literature regarding the botanical name of this plant. Indeed, *Psorospermum guineense* Hochr. and *Vismia guineensis* (L.) Choisy have sometimes been reported as botanical synonyms for *Psorospermum senegalense* Spach. Nevertheless, according to some specialists in botany (National Botanic Garden of Belgium, Meise) consulted in our study, *Vismia guineensis* cannot be considered as a synonym. Several (bi)anthrones, anthraquinones, flavonoids, benzophenones, vismiones, xanthonnes and derivatives have been previously identified from *Vismia guineensis* (as well as other *Vismia* and/or *Psorospermum* species). Some of these compounds exhibit cytotoxic activity [Botta et al., 1986; Bilia et al., 2000; Politi et al., 2004]. Vismione H, isolated from *Vismia guineensis* has been found to show promising *in vitro* activity on *Plasmodium falciparum* [François et al., 1999].



3.2.4.12. *Vitellaria paradoxa* Gaertn. (syn. *Butyrospermum paradoxum* Hepper)



The present study is the first report of antiplasmodial properties for this tree, which is widespread in the area. Decoctions of leaves and barks are traditionally used in Burkina Faso to treat malaria, fever and many other disorders such as pain, inflammation, and gastrointestinal disorders. The antibacterial and antifungal properties of *Vitellaria paradoxa* have been demonstrated by Ogunwande et al.

(2001) for different parts of this plant. In our study, the best results were obtained with dichloromethane extracts. Only the barks collected in Godin showed antiplasmodial properties while those collected in Reo were almost inactive. Leaves obtained from this last specimen showed weak activity against *Plasmodium falciparum*. The difference between the antiplasmodial results obtained for extracts prepared in the same way from two different plant parts of the same specimen and/or for the same plant part but collected on two geographically

different specimens reflects the differences between the different samples in the phytochemical content of bioactive compounds.

3.2.4.13. *Waltheria indica* L.

Aerial parts and roots of this plant are used in traditional medicine in Burkina Faso to treat malaria, fevers, icterus and various disorders (particularly gastrointestinal and respiratory disorders). In the present study, both tested plant parts showed comparable antiplasmodial activities: both dichloromethane extracts were moderately active, while both methanol extracts were weakly active against *Plasmodium falciparum*. This study constitutes the first report of antiplasmodial properties in this plant. However, some extracts obtained with *Waltheria indica* were found to be inactive by Clarkson et al.



(2004) with an $IC_{50} > 100\mu\text{g/ml}$ for a specimen collected in South Africa. The discordance between results obtained with different samples from the same plant species could be explained by various parameters such as localization, period of collection and method of extract preparation, which could modify the phytochemical content and therefore the pharmacological response of a particular species. Previous phytochemical studies have revealed the presence of various flavonoids and polyphenolic compounds in the plant [Petrus, 1990; Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006]. The plant and some isolated compounds have been described as exhibiting anti-inflammatory and antibacterial activity [Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006].

3.2.5. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The present study allowed us to identify the antiplasmodial activity of some extracts obtained from 8 plants out of the 13 tested and constitutes the first report of antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* for crude extracts obtained from *Dicoma tomentosa*, *Psorospermum senegalense*, *Boswellia dalzielii*, *Bergia suffruticosa*, *Waltheria indica* and *Vitellaria paradoxa*. *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and *Psorospermum senegalense* (Clusiaceae) combine the best antiplasmodial activity against two *Plasmodium falciparum* strains and an acceptable cytotoxicity against normal human cells. As such, these two plants could be selected as the best candidates for further investigations in the field of new antimalarial drug discovery as well as valorization of the use of these plants in traditional medicine.

Further pharmacological and phytochemical studies regarding these active plants are needed. In our own future studies, we plan to focus on the evaluation of the *in vivo* activity of these plants against a mouse model of *Plasmodium berghei*, on the isolation and identification of active compounds through a bioguided fractionation and on the study of the activity and toxicity of these active isolated compounds. From these additional results, we will also consider the possibilities of local valorization of active and non-toxic plants in standardized Improved Traditional Medicine.

Acknowledgements

The authors wish to thank Profs. Nacoulma O., Millogo J., Guinko S. as well as Drs. Dakuyo Z. and Olivier M. for their precious advice concerning plants used in Burkina Faso for the traditional healing of malaria. We also warmly thank C. Crunet and S. Cousineau for their help in collecting vegetal samples. We are also very grateful to Profs. E. Robbrecht and P. Bamps from the National Botanic Garden of Belgium (Meise) for confirmation of botanical identification of our vegetal samples. This research was supported by the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS – grant no. 3452005). M.F. is a senior research associate from the FNRS.

3.3 Avant-propos aux chapitres 4 et 5 : commentaire sur le choix des plantes sélectionnées pour une étude approfondie

La démarche ethnopharmacologique suivie depuis le début de ce travail nous a permis, parmi les 72 espèces végétales recensées pour leur utilisation en médecine traditionnelle burkinabè contre le paludisme, d'en sélectionner 13 dont les propriétés antiplasmodiales ont été évaluées lors du screening *in vitro* sur *P. falciparum*. L'usage traditionnel des plantes dans la prise en charge locale du paludisme aura été un bon guide vers les espèces intéressantes puisque 8 plantes sur les 13 sélectionnées ont montré une activité significative sur le parasite, signe qu'elles renferment des substances à potentialités antiplasmodiales.

A l'issue de ce screening, il s'agissait donc de faire une nouvelle sélection : celle des plantes qui feront l'objet d'une étude approfondie par fractionnement bio-guidé dans le but d'en isoler les composés responsables de leur activité.

Notre choix s'est naturellement porté prioritairement vers les 3 espèces les plus actives.

Le choix de ***DICOMA TOMENTOSA* Cass.** nous a semblé le plus évident car c'est la plante qui s'est montrée la plus active sur la souche 3D7 de *P. falciparum* et qui a confirmé son activité prometteuse sur la souche CQ-résistante W2. Cette espèce est surtout la seule dont l'extrait aqueux (décoction), proche de la forme traditionnelle de préparation, a montré une activité significative sur *P. falciparum*. Cela est particulièrement intéressant quand on s'intéresse à l'usage traditionnel de la plante et que l'on envisage une valorisation locale potentielle de celle-ci. Seul bémol pour cette espèce, une sélectivité modérée (mais réelle) pour le *Plasmodium* révélée lors des tests de cytotoxicité sur cellules humaines. Cependant, comme le test a été effectué sur un extrait brut, il se pourrait que les substances responsables de l'activité antiplasmodiale ne soient pas les mêmes que celles qui lui confèrent sa cytotoxicité. Le fractionnement bio-guidé permettra d'apporter une réponse à cette hypothèse. Un autre argument qui plaide en faveur de l'étude de *D. tomentosa* est son appartenance à la famille des Asteraceae, dont de nombreuses autres espèces se sont avérées renfermer des lactones sesquiterpéniques à propriétés antiplasmodiales, telle la célèbre artémisinine extraite d'*Artemisia annua*. De plus, si la littérature mentionne quelques données sur la phytochimie de la plante, elle n'avait encore jamais été étudiée pour une quelconque activité

pharmacologique/biologique avant le présent screening. Un autre *Dicoma*, Sud-Africain (*D. anomala*) a, par contre, déjà été mentionné pour ses propriétés antiplasmodiales prometteuses [Matsabisa et al., 2006 ; Becker et al., 2011]. C'est pour toutes ces raisons que nous avons décidé de sélectionner *D. tomentosa* pour une étude approfondie par fractionnement bio-guidé (voir Chapitre 4). Une nouvelle récolte de la plante entière a été réalisée en octobre 2008, par nos partenaires de Jardins du monde au Burkina Faso.

La deuxième espèce dont l'étude nous paraissait intéressante à approfondir est le ***PSOROSPERMUM SENEGALENSE Spach***. En effet, même si seul son extrait au dichlorométhane s'est montré actif lors de ce screening *in vitro*, c'est surtout celui qui s'est montré le plus actif sur la souche chloroquino-résistante de *P. falciparum* W2 (confirmant la présence de composés antiplasmodiaux prometteurs dans la plante) et qui a montré la meilleure sélectivité (IS = 10). De plus, contrairement à d'autres *Psorospermum sp.* largement étudiés, nous avons trouvé extrêmement peu de données sur *P. senegalense* Spach dans la littérature, nous laissant apparemment le champ libre pour nos investigations.

Cependant, c'est lors de nos recherches bibliographiques approfondies sur cette espèce et en particulier sur des synonymes botaniques potentiels, afin de voir si la plante n'avait pas déjà été étudiée sous un autre nom dans la littérature, que nous avons constaté une certaine **confusion dans la classification botanique du genre *Psorospermum sp.***

En effet, les sources et banques de données botaniques consultées [Arbonnier, 2002 ; Berhaut, 1975 ; Burkill, 1985 ; Aluka ; Tropicos ; IPNI ; GBIF ; CJB] ont fourni des données contradictoires quant à la synonymie botanique de *P. senegalense*, les synonymes renseignés variant fortement d'une source à l'autre.

En particulier, les espèces *P. guineense* Hochr. et *Vismia guineensis* L. Choisy - synonymes entre elles selon la plupart des sources consultées - sont parfois également citées comme synonyme de *P. senegalense* Spach, alors que cette synonymie est exclue ou seulement partielle dans d'autres sources. Ces 2 synonymes potentiels ont par ailleurs été très largement étudiés dans la littérature: plusieurs anthraquinones, vismiones, bianthrone, xanthone, benzophénone et flavonoïdes en ont été isolés [Botta et al., 1986 ; Bilia et al., 2000 ; Politi et al., 2004]. En outre, les propriétés antiparasitaires (*Plasmodium* et *Leishmania*) et

cytotoxiques de ces espèces ont déjà été rapportées dans la littérature [Menan, 2006 ; Ahua, 2007]. L'isolement de différentes vismiones à l'activité antiplasmodiale prometteuse à partir de *V. guineensis*, ainsi que les relations structure-activité de ces substances ont également déjà été décrites par François et al. en 1999.

Si notre espèce est bien un synonyme de *P. guineense* Hochr. et/ou de *V. guineensis* L. Choisy, il semblait donc moins intéressant d'en réaliser le fractionnement bio-guidé, le sujet semblant déjà bien étudié.

Cet extrait de Debray et Bouquet (1974) semble appuyer cette hypothèse :

« Fièvres et dermatoses sont les indications les plus fréquentes de *Psorospermum alternifolium* Hool. f., *P. fébrifugum* Spach., *P. senegalense* Spach. ainsi que de *Vismia guineensis* (L.) Choisy. Une certaine confusion règne dans les synonymes de ces espèces. L'une d'entre elles, le *P. guineense* Hochr., qui par sa répartition serait l'actuel *P. senegalense* Spach., étudié par O. Planche (1948) renferme un pigment de nature anthraquinonique pouvant être de l'hypericine. Ce pigment provoque sur la souris des réactions photosensibilisantes et un effet irritant sur les reins et l'intestin. »

Face aux données quelque peu contradictoires collectées dans les banques de données botaniques et les différentes références consultées, nous avons demandé l'avis des Profs E. Robbrecht et P. Bamps, du Jardin Botanique Royal de Bruxelles (Meise). Ces spécialistes ont confirmé que notre échantillon était bien *Psorospermum senegalense* Spach. Ils ont cependant reconnu que la classification du genre *Psorospermum* nécessiterait une révision car il y a de nombreuses ambiguïtés se traduisant par de multiples sous-espèces se recoupant souvent entre elles. La difficulté de la classification des genres *Vismia* et *Psorospermum* réside selon eux dans le fait que la morphologie des organes de ces plantes peut varier considérablement en fonction du stade de développement du specimen mais également que certaines espèces ont été (sous)classées en fonction de leur répartition géographique.

Voici un extrait d'un courrier qui nous a été adressé par le Prof. Robbrecht à ce sujet :

« *Vismia* (5-8 ovules par loge) et *Psorospermum* (1-(2) ovules par loge) sont deux genres différents et ne devraient pas être confondus, ce qui s'est quand même fait dans la littérature. C'est ainsi que Bamps en 1966, mentionne qu'un *Vismia* (*V. guineensis* (L.)

Choisy) a été erronément appelé *Psorospermum guineense* (L.) Hochr. par Hochreutiner. A cela s'ajoute que le genre *Psorospermum* est difficile pour le taxonomiste car les espèces sont largement distribuées et TRES variables. Les distinctions (en grande partie basées sur forme et pubescence des feuilles) varient de flore en flore, et une révision moderne utilisant des marqueurs moléculaires s'impose. Par exemple, l'espèce variable *Psorospermum febrifugum* a été morcelée, sans doute à titre injuste, en 28 espèces par Spirlet (...) A mon avis d'ailleurs, la plasticité morphologique des espèces de *Psorospermum* pourrait être traduite par une grande variabilité chimique. »

Pour ajouter à la confusion, il souligne également que, si les genres *Vismia* et *Psorospermum* doivent bien être différenciés, certaines espèces étudiées dans la littérature sous le nom de *Vismia guineensis* L. Choisy pourraient cependant être en réalité *Psorospermum guineense* Hochr., comme on peut le soupçonner à la lecture de cet extrait de Bilia et al. 2000 :

« The titled plant (*Vismia guineensis* L. Choisy) was locally identified as *Psorospermum guineense* Hochr., but several synonyms are reported: *Psorospermum senegalense* Spach., *Hypericum guineense* L., *Vismia leonensis* Hook, *Vismia laurentii* De Wild., and *Vismia guineensis* (L.) Choisy. In particular, the last name seems to be the proper botanical terminology".

Devant cette situation plus qu'incertaine concernant la classification botanique du genre, par ailleurs déjà largement étudié, nous avons préféré laisser cette espèce de côté pour le moment car il nous semblait délicat de travailler sur du matériel végétal présentant une telle ambiguïté quant à son identification et à sa classification botanique.

Une comparaison par CCM a toutefois été tentée entre notre échantillon et un échantillon de feuilles de *Psorospermum guineense* Hochr. collecté au Mali et fourni par le Prof. Rokia Sanogo. Les contenus en flavonoïdes et en anthraquinones ont été analysés et comparés. Les profils étaient dans l'ensemble assez comparables avec cependant quelques différences (notamment un spot majoritaire d'anthraquinone supplémentaire repéré dans *P. guineense* et un spot supplémentaire de flavonoïde/acide phénol dans *P. senegalense*). L'expérience ne nous a malheureusement pas permis de trancher si ces différences sont liées au fait que ces espèces soient réellement différentes ou résultent simplement d'une variation de composition liée à un lieu de collecte différent. Les conditions expérimentales ainsi que les photos des CCM obtenues sont reprises à l'annexe 3.

Enfin, nous nous sommes heurtés à un problème pratique de disponibilité d'un échantillon bien identifié de *P. senegalense* Spach. en quantité suffisante pour un fractionnement bio-guidé, nous détournant définitivement de la poursuite de l'étude de cette plante.

La troisième espèce qui s'était distinguée par son activité lors du screening est le ***Gardenia sokotensis* Hutch.** L'extrait au dichlorométhane a montré une activité prometteuse, sur souches CQ-sensible et CQ-résistante de *P. falciparum* tandis que l'extrait méthanolique s'est montré modérément actif. La toxicité de l'extrait au dichlorométhane envers le parasite semblait peu sélective (SI~1). Poursuivre l'étude de cette espèce ne serait cependant pas dénué d'intérêt car aucun composé purifié n'a jamais été isolé de *G. sokotensis* et son fractionnement bio-guidé pourrait donc permettre d'en isoler de nouveaux composés antiplasmodiaux. De plus, comme pour *D. tomentosa*, on peut émettre l'hypothèse que la sélectivité de l'extrait brut ne reflète pas celle des principes actifs antiplasmodiaux. Par ailleurs, l'activité antiplasmodiale de *G. sokotensis* a déjà été confirmée *in vivo* par Traoré et al. en 2006, pour un échantillon collecté au Burkina Faso mais dans une autre aire géographique. Cette étude mentionne également la non-toxicité de la plante. Cela confirme le potentiel antiplasmodial de l'espèce, largement utilisée mais finalement peu étudiée pour sa phytochimie. D'un point de vue chimiotaxonomique, il est à noter que 4 autres espèces de *Gardenia* sont rapportées pour leurs propriétés antiplasmodiales et que des triterpènes actifs ont été isolés de l'une d'entre elle [Suksamrarn, 2003]. Nous avons donc décidé de sélectionner *G. sokotensis* pour réaliser un fractionnement bio-guidé (voir Chapitre 5). C'est dans cet objectif qu'une nouvelle récolte de feuilles de cette plante a été réalisée en septembre 2011 avec nos partenaires de Jardins du monde au Burkina Faso.

Les 2 prochains chapitres seront consacrés à l'étude respective de ***Dicoma tomentosa* Cass.** et ***Gardenia sokotensis* Hutch.**

3.4 Bibliographie (3) :

Ahua, K.M. / Ioset, J-R / Ioset, K N/ Diallo, D. / Mauël, J. / Hostettmann, K., 2007. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 110 (1), 99-104

Alemika, T.E., Onawunmi, G.O., Olugbade, T.A., 2006. Antibacterial phenolics from *Boswellia dalzielii*. *Journal of Natural Products and Medicine* 10, 108–110.

Aluka (JSTOR Plant science - African plant initiative), <http://www.aluka.org> consulté en avril 2010 et <http://plants.jstor.org> consulté en février 2013.

Anandjiwala, S., Srinivasa, H., Kalola, J., Rajani, M., 2007. Free-radical scavenging activity of *Bergia suffruticosa*. *Journal of Natural Medicines* 61, 59–62.

Aqil, M., Akinniyi, J.A., Ndahi, N.P., 1998. Flavonoids from *Dicoma tomentosa*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 4, 135–137.

Aqil, M., Khan, I.Z., 1999a. Dicomatin – a new flavone glycoside from *Dicoma tomentosa*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 5, 357–358.

Aqil, M., Khan, I.Z., 1999b. Three flavone glycosides from *Dicoma tomentosa* Cass. *Ultra Scientist of Physical Sciences* 11, 378–380.

Aqil, M., Khan, I.Z., Dimari, G.A., 2001. A new flavone glycoside from *Dicoma tomentosa*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 7, 273–275.

Bamps, P., 1966 Notes sur les Guttiferae d'Afrique Tropicale. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat, Bruxelles*, Vol. 36: 425-459

Becker JW, van der Merwe MM, van Brummelen AC, Pillay P, Crampton BG, Mmutlane EM, Parkinson C, van Heerden FR, Crouch NR, Smith PJ, Mancama DT, Maharaj VJ: *In vitro* anti-plasmodial activity of *Dicoma anomala* subsp. *gerrardii* (Asteraceae): identification of its main active constituent, structure-activity relationship studies and gene expression profiling. *Malar J* 2011, 10:295.

Beiersmann, C., Sanou, A., Wladarsch, E., De Allegri, M., Kouyaté, B., Müller, O., 2007. Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behavior. *Malaria Journal* 6, 106.

Berhaut, J., 1975, Flore illustrée du Sénégal, tome IV. Gouvernement du Sénégal, Ministère du développement rural et de l'hydraulique, Direction des eaux et Forêts, Dakar, Sénégal.

Bero, J., Frédérick, M., Quetin-Leclercq, J., 2009. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61, 1401–1433.

Bilia, A.R., Yusuf, A.W., Braca, A., Keita, A., Morelli, I., 2000. New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guineensis*. *Journal of Natural Products* 63, 16–21.

Bohlmann, F., Singh, P., Jakupovic, J., 1982. Germacranolides from *Dicoma tomentosa*. *Phytochemistry* 21, 2122–2124.

Botta, B., Delle Monache, G., Delle Monache, F., Marini Bettolo, G.B., Menichini, F., 1986. Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guineensis*. *Phytochemistry* 25(5), 1217–1219.

Bouquet, A et Debray, M. 1974. Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Travaux et Documents de l'ORSTOM n°32, p95-96, O.R.S.T.O.M., Paris.

Bourdy, G., Willcox, M.L., Ginsburg, H., Rasoanaivo, Ph., Graz, B., Deharo, E., 2008. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal for Parasitology* 38, 33–41.

Burki, T., 2009. Artemisinin resistance could endanger fight against malaria. *The Lancet Infectious Diseases* 9, 213.

Burkill, H.M. 1985. The useful plants of west tropical Africa, Vol 2. Richmond, éd. Royal Botanic Gardens Kew, London, United Kingdom.

Carraz, M., Jossang, A., Franetich, J.-F., Siau, A., Ciceron, L., Hannoun, L., Sauerwein, R., Frappier, F., Rasoanaivo, P., Snounou, G., Mazier, D., 2006. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *PLoS Medicine* 3, 2392–2402.

CJB (Site du Conservatoire du Jardin Botanique de Genève – African Flowering Plants Data Base), <http://www.ville-ge.ch/cjb/bd/africa>, consulté en avril 2010 et février 2013.

Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Fol, P.I., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 177–191.

Delle Monache F., Botta B., Delle Monache G., Marini Bettolo G. B., 1993, Prenylated anthranoids from *Psorospermum* species *Phytochemistry*, 34(5), 1413-1420

Duwiejua, M., Zeitlin, I.J., Waterman, P.G., Chapman, J., Mhango, G.J., Provan, G.J., 1993. Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *Planta Medica* 59, 12–16.

Egan, T.J., 2009. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiology* 4, 637–639.

Elegami, A.A. and Gray, A.I. and Waigh, R.D. and Khalid, H.E.: Bioactive constituents from *Bergia suffruticosa*. *Planta Medica* 2009, 75 (9)/ 963.

Elufioye, T.O., Agbedahunsi, J.M.: Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* , 93: 167–171.

François, G., Steenackers, T., Ake Assi, L., Steglich, W., Lamottke, K., Holenz, J., Bringmann, G., 1999. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structure–activity relationships. *Parasitology Research* 85, 582–588.

Frédérich, M., Jacquier, M.J., Thepenier, P., De Mol, P., Tits, M., Philippe, G., Delaude, C., Angenot, L., Zeches-Hanrot, M., 2002. Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *Journal of Natural Products* 65, 1381–1386.

GBIF (Global Biodiversity Information Facility) <http://www.data.gbif.org> consulté en avril 2010 et février 2013.

Gbeassor, M., Kossou, Y., Amegbo, K., de Souza, C., Koumaglo, K., Denke, A., 1989. Antimalarial effects of eight African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 25, 115–118.

Gertsch, J., 2009. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 177–183.

IPNI (International Plant Name Index), <http://www.ipni.org>, consulté en avril 2010 et février 2013.

Jansen, O., Frédéricich, M., Tits, M., Angenot, L., Cousineau, S., Bessot, L., Crunet, C.,

Nicolas, J.P., 2008. Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso: sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues. *Ethnopharmacologia* 41, 74–78.

Jonville, M.C., Kodja, H., Humeau, L., De Mol, P., Cao, M., Angenot, L., Frédérick, M., 2008. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 382–386.

Kakade, A., Pawar, M., Wadkar, K., Patil, S., Magdum, C.S., Naikwade, N.S., 2008. A comprehensive review of *Jatropha gossypifolia* Linn. *Pharmacognosy Reviews* 2, 3–6.

Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R., 2009. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 3229–3256.

Kenmogne, M., Prost, E., Harakat, D., Jacquier, M.J., Frédérick, M., Sondengam, L.B., Zeches, M., Waffo-Tegu, P., 2006. Five labdane diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiacum*. *Phytochemistry* 67, 433–443.

Kittakoop, P., Kirtikara, K., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y., 2000. Antimalarial preracemosols A and B, possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb. *Phytochemistry* 55, 349–352.

Krishna, V., Natani, K., Singh, P., 2003. Oxygenated germacranolides from compositae and their taxonomic significance. *Journal of the Indian Chemical Society* 80, 971–977.

Maheswara, M., Rao, Y.K., Rao, V.M., Rao, C.V., 2006. Antibacterial activity of acylated flavonol glycoside from *Waltheria indica*. *Asian Journal of Chemistry* 18, 2761–2765.

Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinrichs, D.J., 1993. Parasite lactate-dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug-sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48, 739–741.

Matsabisa, M.G., Campbell, W.E., Folb, P.I., Smith, P.J., 2006. Treatment of parasitic infections in humans and animals. Patent Cooperation Treaty Application wo06048734.

Mélan, H., Banzouzi, J.T., Hocquette, A., Péliissier, Y., Blache, Y., Koné M., Mallié M., Aké Assi L., Valentin A. (2006) Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 105: 131–136

Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., Bravo, J.A., Deharo, E., 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 127–137.

Muregi, F.W., Ishih, A., Miyase, T., Suzuki, T., Kino, H., Amano, T., Mkoji, G.M., Terada, M., 2007. Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 190–195.

Ogunwande, I.A., Bello, M.O., Olawore, O.N., Mulli, K.A., 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*. *Fitoterapia* 72, 54–56.

Okokon, J.E., Ita, B.N., Udokpoh, A.E., 2006. The in-vivo antimalarial activities of *Uvaria chamae* and *Hippocratea africana*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100, 585–590.

Pedersen, M.E., Vestergaard, H.T., Hansen, S.L., Bah, S., Diallo, D., Jager, A.K., 2009. Pharmacological screening of Malian medicinal plants used against epilepsy and convulsions. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 472–475.

Petrus, A.J.A., 1990. Polyphenolic components of *Waltheria indica*. *Fitoterapia* 61, 371.

Philippe, G., Angenot, L., Mol, P.D., Goffin, E., Hayette, M.P., Tits, M., Frédéricich, M., 2005. In vitro screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 535–539.

Pink, R., Hudson, A., Mouries, M.A., Bendig, M., 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 727–740.

Planche O. *Psorospermum guineense* or "kari-diakouma" of French Guinea, *Annales Pharmaceutiques Francaises* 1948, 6: 546-64.

Politi, M., Sanogo, R., Ndjoko, K., Guilet, D., Wolfender, J.L., Hostettmann, K., Morelli, I., 2004. HPLC–UV/DAD and HPLC–MS analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical Analysis* 15, 355–364.

Rao, Y.K., Fang, S.H., Tzeng, Y.M., 2005. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- α and IL-12 in activated macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 912–915.

Sanon, S., Ollivier, E., Azas, N., Mahiou, V., Gasquet, M., Ouattara, C.T., Nebie, I., Traore, A.S., Esposito, F., Balansard, G., Timon-David, P., Fumoux, F., 2003. Ethnobotanical survey and *in vitro* antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 143–147.

Sawadogo, W.R., Meda, A., Lamien, C.E., Kiendrebeogo, M., Guissou, I.P., Nacoulma, O.G., 2006. Phenolic content and antioxidant activity of six Acanthaceae from Burkina Faso. *Journal of Biological Sciences* 6, 249–252.

Suksamrarn, A., Tanachatchairatana, T., Kanokmedhakul, S., 2003. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 275–277.

Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675.

Traoré, M., Guiguemdé, A., Yago, I., Nikiéma, J.B., Tintoa, H., Dakuyo, Z.P., Ouédraogo, J.B., Guissou, I.P., Guiguemdé, T.R., 2006. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 3, 34–41.

Tropicos (Missouri Botanical Garden), <http://www.tropicos.org>, consulté en avril 2010 et février 2013.

World Health Organization (WHO), 2006. WHO Guidelines for the Treatment of Malaria. Available at <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>.

World Health Organization (WHO), 2009. World Malaria Report. Available at <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563901/en/index.html>.

Zdero, C., Bohlmann, F., 1990. Sesquiterpene lactones from *Dicoma* species. *Phytochemistry* 29, 83–187

4 CONTRIBUTION A L'ETUDE DE *DICOMA TOMENTOSA* Cass. (ASTERACEAE)

4.1 Avant-propos

Dans ce chapitre, nous commencerons par répertorier les **données disponibles dans la littérature** sur *Dicoma tomentosa* Cass.

Nous détaillerons ensuite quelques résultats obtenus lors de l'**étude phytochimique préliminaire** menée sur l'échantillon végétal qui sera utilisé pour le fractionnement bioguidé.

L'essentiel de nos travaux personnels sur *D. tomentosa* sera ensuite présenté sous la forme de l'article "**Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound.**", publié dans *Malaria Journal*, 11:289 en 2012. Celui-ci reprend notamment les résultats obtenus lors de l'étude approfondie des potentialités antiplasmodiales de différents extraits de la plante avec des modèles de tests *in vitro* et *in vivo*. Les activités hémolytique et cytotoxique des extraits ont aussi été évaluées. Le processus de fractionnement bio-guidé qui a mené à l'isolement du principe actif majoritaire de *D. tomentosa* : l'urospermal A-15-O-acétate (UA15OA) y est également décrit, ainsi que les activités antiplasmodiale et cytotoxique *in vitro* de ce composé.

Enfin, nous clôturerons le chapitre en détaillant quelques résultats complémentaires obtenus lors de travaux relatifs, d'une part à l'**évaluation du potentiel génotoxique** des extraits de *Dicoma tomentosa* et de l'UA15OA, qui a été réalisée en collaboration avec l'Université d'Aix Marseille II (Prof. E. Ollivier). D'autre part, une **étude des propriétés cytotoxiques de l'UA15OA** envers des souches de cellules cancéreuses a été menée en collaboration avec l'ULB (Prof. R. Kiss).

4.2 *Dicoma tomentosa* Cass.

4.2.1. DESCRIPTION BOTANIQUE

- CLASSIFICATION :

Famille : ASTERACEAE, COMPOSITAE

Tribu : Mutisieae

Synonyme : *Dicoma gnaphaloides* Mattei



Figure 4-1 : *D. tomentosa*, vue générale

- MORPHOLOGIE : [Le Bourgeois, 1995]

Généralités : Plante dressée, abondamment ramifiée et couverte d'une pubescence laineuse blanche. Les feuilles sont simples, entières et linéaires. Les capitules floraux sont axillaires et sessiles, entourés d'un involucre de longues bractées épineuses.



Figure 4-2 : *D. tomentosa*, tiges feuillées

Espèce annuelle. Multiplication par graines (vent).

La germination débute au début du mois de juin, quand les pluies sont irrégulières. Elle se prolonge jusqu'en juillet. La dissémination des akènes débute en septembre et se prolonge jusqu'au dessèchement de la plante en début de la saison sèche.

Description détaillée : Le port principal est dressé. L'axe principal est très ramifié. La plante mesure 20-60cm de haut. La **racine** est pivotante. La **tige** est cylindrique, pleine et ligneuse à la base chez les individus âgés. Les **feuilles** sont alternes et sessiles. Le limbe est linéaire, aux bords presque parallèles. La marge est très finement dentée. Seule la nervure centrale est visible. Tiges et feuilles (2 faces)

sont couvertes d'une forte pubescence laineuse blanche. La face supérieure est verdâtre tandis que l'inférieure est plus argentée.

Les **fleurs** sont assemblées en capitules axillaires et subsessiles. Ces capitules de 10-12 mm de diamètre portent à la base un involucre composé de 5-6 rangées de bractées rigides, lancéolées, au sommet effilé en pointe. Ces bractées sont longues de 5-20mm ; celles de l'extérieur sont laineuses. Les fleurs sont toutes tubulées, de couleur blanc verdâtre à rose pâle. Elles sont peu visibles car elles sont masquées par les bractées de l'involucre et les poils des akènes. Les **fruits** sont des akènes cylindriques qui mesurent 2 mm de long et 1 mm de large. Ils sont couverts de longs poils soyeux de 3-4 mm, de couleur blanchâtre à jaune pâle. Ils portent au sommet un pappus composé de 2 rangées de soies longues de 10-12mm. Les soies externes sont filiformes et finement pubescentes sur toute leur longueur. Les soies internes sont lancéolées, membraneuses avec une nervure centrale très marquée.



Figure 4-3 : *D. tomentosa*, fleur



Figure 4-4 et 4-5: *D. tomentosa*, feuilles (face inférieure) et rameaux

4.2.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Présente dans toute l'Afrique tropicale, elle s'est répandue à travers le Soudan et l'Ethiopie jusqu'en Asie. L'espèce est caractéristique des régions sahélo-soudaniennes dont la pluviométrie annuelle est inférieure à 800 mm. La plante se développe de préférence sur un terrain filtrant et se desséchant rapidement (sol gravillonnaire en sommet de pente, sol ferrugineux dégradé). Elle croît dans les parcelles cultivées de façon traditionnelle, sans engrais ni herbicide et pour lesquelles le labour est absent ou superficiel. Espèce peu fréquente [Le Bourgeois, 1995].

4.2.3. NOMS VERNACULAIRES

MOORE : Gômtidga [Guinko, 1988] ; Gomtidga, Sakwipèelga [Nacoulma, 1996]

4.2.4. UTILISATIONS TRADITIONNELLES

- Utilisée seule

Les tiges feuillées sont préconisées dans le paludisme des enfants avec inflammation de la rate, le paludisme (adultes), les douleurs rhumatismales et les entéralgies [Nacoulma, 1996]. Guinko, en 1988, rapporte également l'utilisation d'une décoction de tiges feuillées de *D. tomentosa* administrée en lavement contre le paludisme des enfants avec inflammation de la rate.

Des enquêtes ethnobotaniques supplémentaires, menées par l'équipe locale de Jardins du monde en 2010 à propos de l'utilisation de *D. tomentosa* Cass., ont révélé que la plante est également utilisée contre la toux en **zone Mossi, à Boutoko.**

Le mode d'emploi est le suivant (Baba Cissé, Jardins du monde, 2010):

« Mâcher les feuilles, aspirer le jus, avaler ce jus et rejeter le résidu. Pour les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans, on prépare une tisane avec la plante. »

Dans la même zone, la plante est aussi utilisée de manière traditionnelle chez les femmes accouchées pour les laver et « bien nettoyer le ventre ». Les tiges feuillées sont bouillies et la solution, une fois filtrée, est bue et utilisée en bain et en lavement.

La plante est cependant renseignée par les mêmes populations comme contre-indiquée chez les femmes enceintes car elle pourrait provoquer des avortements.

En **zone Gourounsi, à Bonyolo, Mogueya et Poun**, *D. tomentosa* est également connue pour le traitement des gonflements du foie des enfants lors du paludisme pendant « le froid » (correspondant à la saison humide) et est aussi utilisée dans le cas paludisme simple.

- Utilisée en association [Prelude, 2010]

La plante est répertoriée dans la littérature pour son usage au Togo en cas de convulsions, fièvres et paludisme. Les tiges feuillées de *D. tomentosa*, de *Lycopodium cernum* et de *Newbouldia laevis* sont carbonisées et la poudre obtenue est délayée dans du jus de citron et administrée par voie orale.

Une préparation à base des poudres carbonisées puis délayées dans l'eau des feuilles de *D. tomentosa*, associées aux feuilles de *Spilanthes uliginosa*, de *Trichilia prieureana* et d'*Euphorbia hirta*, est également indiquée en médecine traditionnelle togolaise pour le traitement des gastro-entérites et maux gastro-intestinaux (voie orale).

4.2.5. COMPOSITION CHIMIQUE

Quelques publications font état de recherches phytochimiques sur *Dicoma tomentosa* Cass. Plusieurs substances appartenant à différentes classes ont été isolées de la plante.

- **Acide gras** : acide octacosanoïque = acide montanique (racines) [Mehta, R. et al., 1981]

- **Triterpènes et stérols** : acétate de lupéyle, acide bétulinique, stigmastérol, β -sitostérol, taraxastérol [Mehta, R. et al., 1981 ; Catalan, A. et al., 1996]

- **Lactones sesquiterpéniques** : Une dizaine de lactones sesquiterpéniques ont été isolées des parties aériennes de *D. tomentosa* Cass. [Bohlmann F. et al. 1982 ; Zdero, C. et al., 1990 ; Catalan, A. et al., 1996 ; Krishna, V. et al., 2003] (**Figure 4-6**).

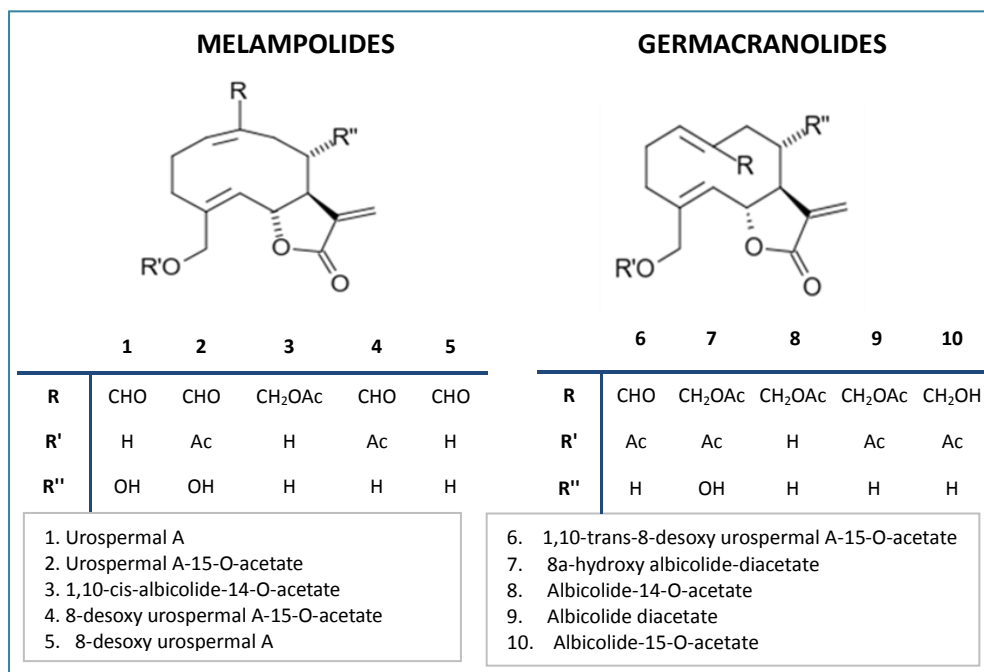


Figure 4-6 : Lactones sesquiterpéniques de *D. tomentosa*

- **Flavonoïdes** : Plusieurs flavonoïdes ont été isolés des parties aériennes d'échantillons nigériens de *D. tomentosa* Cass. [Aqil, M. et al., 1998 ; 1999a ; 1999b; 2001], notamment, une flavone caractéristique, la **dicomaflavone** et 3 hétérosides de celle-ci, la **dicomatine**, la **tomentosine** et **tomentosanine**. Trois génines de flavonols (quercétine, eupatolitine et eupatine) ainsi que les dérivés 3-O-galactosidiques des 2 premières ont également été identifiés (**Figure 4-7**).

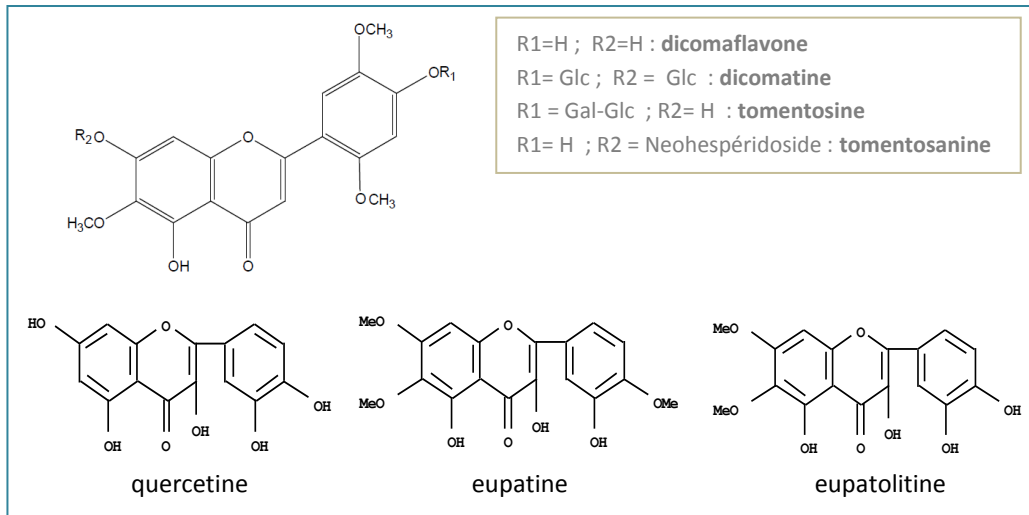


Figure 4-7 : Flavonoïdes de *D. tomentosa*

4.2.6. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

A notre connaissance, *Dicoma tomentosa* n'avait jamais été étudiée sur le plan pharmacologique avant le début de nos travaux.

Toutefois, les propriétés antiplasmodiales d'une autre espèce du genre *Dicoma*, *D. anomala*, ont été décrites par Matsabisa et al., en 2006 et plus récemment par Becker et al. en 2011. Des lactones sesquiterpéniques (de type eudesmanolide) ont été identifiées comme étant les principes actifs de cette plante.

4.2.7. ETUDE DE LA TOXICITE

La plante ne semble pas avoir été étudiée pour sa toxicité en dehors de l'activité cytotoxique *in vitro* (fibroblastes humains) détectée lors de nos recherches.

L'évaluation plus complète de la toxicité (généotoxicité, toxicité *in vivo*, ...) de *D. tomentosa* serait à approfondir avant d'envisager une valorisation potentielle de la plante, et ce afin d'en garantir sa sécurité d'usage. Cette évaluation est d'autant plus nécessaire que la plante a été rapportée comme potentiellement abortive lors de nos enquêtes ethnobotaniques.

4.3 Investigation phytochimique préliminaire de *Dicoma tomentosa* Cass.

Dans ce sous-chapitre, nous détaillerons quelques résultats préliminaires obtenus lors des investigations phytochimiques menées sur cette plante avant le fractionnement bioguidé.

Ces études phytochimiques ont été réalisées sur le nouvel échantillon de plante entière de *Dicoma tomentosa* Cass., récolté en octobre 2008 à Poun (Province du Sanguié, Burkina Faso) par l'équipe de Jardins du monde. Les tests biologiques et le fractionnement bioguidé décrits dans la publication seront également réalisés sur ce nouveau lot de matériel végétal.

4.3.1 SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Un screening phytochimique a été mené afin de déterminer la classe phytochimique des composés présents dans la plante.

Ainsi, la présence d'alkaloïdes, de flavonoïdes, d'acides phénols, d'anthocyanes d'iridoïdes, d'anthraquinones, de coumarines, de terpènes, de saponosides, de tanins galliques et catéchiques a été recherchée dans notre échantillon de *D. tomentosa* Cass. par des réactions de coloration et/ou des analyses par CCM. Le mode opératoire détaillé pour chacune des classes phytochimiques est présenté à l'annexe 4.

Les principales classes phytochimiques identifiées sont **les terpènes ainsi que les flavonoïdes** (et acides phénols), confirmant les données de la littérature pour cette plante. La présence de tanins galliques en faible quantité a également été détectée.

4.3.2 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Dans le cadre de nos travaux sur *D. tomentosa*, plusieurs phases mobiles ont été testées, à la fois pour les **terpènes** et les **flavonoïdes**, afin de réaliser un profil CCM de notre échantillon.

Ci-dessous (Fig. 4-8 et 4-9) sont présentés les résultats obtenus avec les CCM ayant permis la meilleure séparation. Les extraits utilisés pour les dépôts sont ceux qui ont été testés pour leur activité antiplasmodiale dans le sous-chapitre suivant.

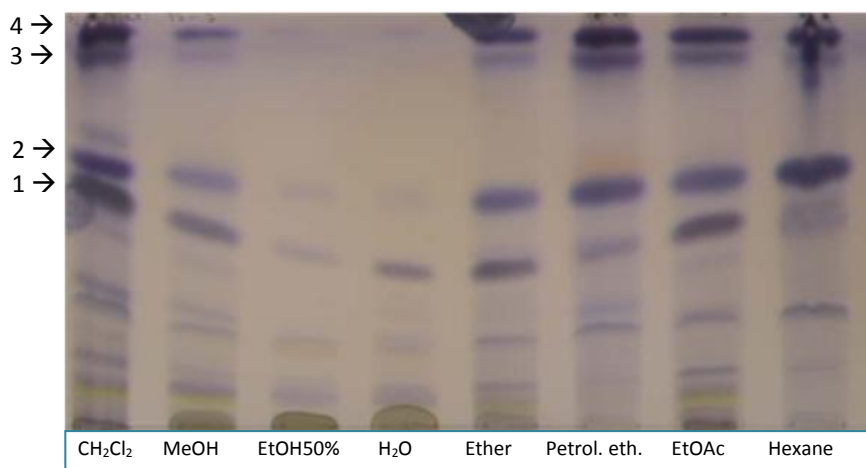


Figure 4-8 : Profil CCM des terpènes de différents extraits de *D. tomentosa*
(φ . stat. : Si_{60} ; φ . mob. : $CH_2Cl_2 - MeOH$ (95 :5); réactif vanilline sulfurique 2% + ΔT 105°C - 10', visible)

Ces profils CCM obtenus avec le réactif des terpènes montrent qu'au moins 4 constituants terpéniques majoritaires sont observés dans les extraits organiques, en abondance variable selon le type d'extrait. Les extraits hydroéthanolique et aqueux semblent quant à eux contenir moins de composés terpéniques bien qu'un des terpènes majoritaires (1) soit également présent en faible quantité.

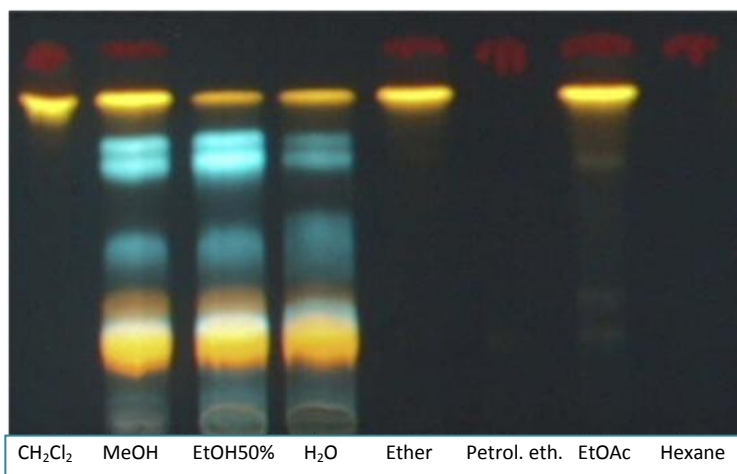


Figure 4-9 : Profil CCM des flavonoïdes/ac. phénols de différents extraits de *D. tomentosa*
(φ . stat. : Si_{60} ; φ . Mob. : $EtOAc - Ac$ formique- H_2O (90 :6 :9); réactif DPBAE, UV366nm)

Dans les extraits les plus apolaires (hexane, éther de pétrole), aucune trace de flavonoïde n'est détectée. Pour les extraits au dichlorométhane, diéthylether et acétate d'éthyle, on observe au moins un composé flavonoïdique (génine), donnant un spot jaune-orangé de $R_f \sim 0,9$. Pour les extraits plus polaires (méthanolique, hydroalcoolique 50% et décoction aqueuse), on observe en plus plusieurs spots orange et bleu-vert correspondant certainement à des acides phénols et/ou à des hétérosides de flavonoïdes.

4.3.3 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Afin de compléter l'analyse phytochimique de *D. tomentosa* Cass., nous avons également établi un profil chromatographique des extraits par HPLC analytique.

Plusieurs méthodes ont été expérimentées à partir de celles décrites dans la littérature pour d'autres lactones sesquiterpéniques isolées de diverses *Asteraceae* [Merfort, 2002 ; Bilia et al., 2006].

La méthode retenue est une méthode en phase inverse et en mode gradient dont les conditions sont les suivantes :

Phase stationnaire : Pursuit Diphenyl, 250X4 mm, 5 μ

Phase mobile :

A : Acetonitrile - B : Eau + 0,05%TFA

T (min)	%A	%B
0	10	90
30	40	60
40	60	40
41	10	90

Température : 25°C

Détection : UV/DAD : $\lambda = 230$ et 340 nm

Débit : 1ml/min

L'appareillage utilisé est constitué d'un système HPLC *Agilent Technologies 1200 series* couplé à un détecteur UV/DAD et connecté à un injecteur automatique et à une pompe *Quatpump* à 4 canaux *Hewlett Packard 1100*. Les données sont collectées à l'aide du programme *Agilent Chemstation*.

Les extraits utilisés sont ceux qui sont décrits dans l'article au point 4.4.2. Ils ont été préparés à une concentration de 5mg/ml dans du méthanol et un volume de 20µl de chaque solution a été injecté dans le système.

Les chromatogrammes HPLC enregistrés à 230nm pour les extraits au dichlorométhane, méthanolique et aqueux sont repris dans cet ordre (de haut en bas) à la **figure 4-10**.

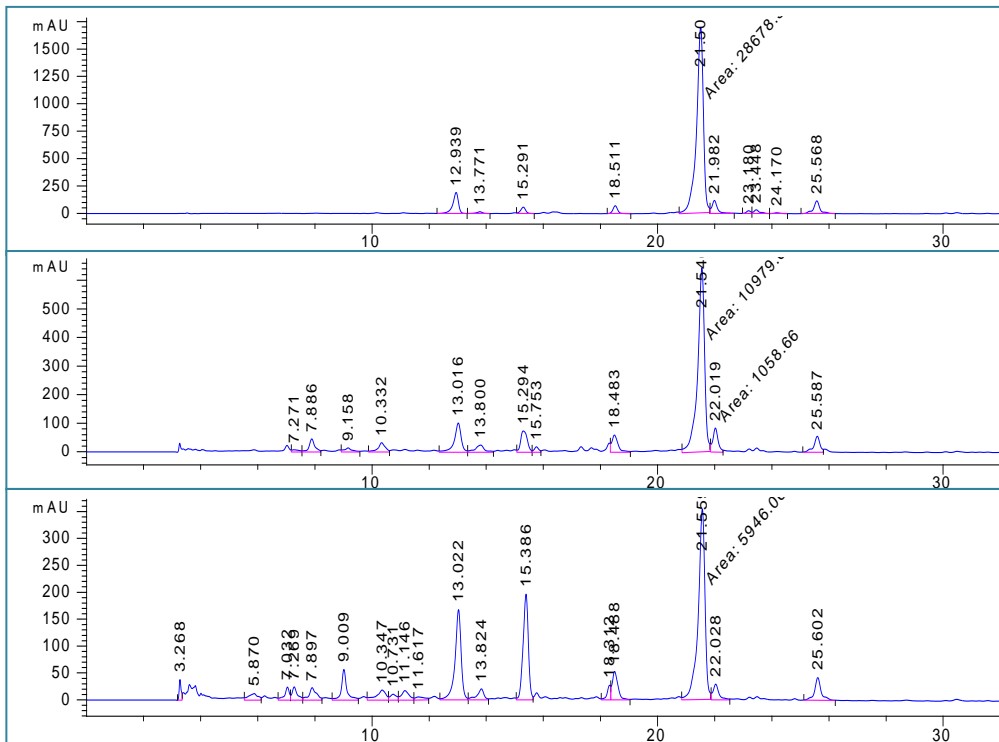


Figure 4-10 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux (λ = 230nm)

Un pic largement majoritaire de Tr = 21,55 min est présent dans les chromatogrammes des 3 extraits enregistrés à 230 nm, en particulier dans l'extrait au dichlorométhane.

Les chromatogrammes HPLC des extraits au dichlorométhane, méthanolique et aqueux, enregistrés à 340nm (pour la détection des flavonoïdes) sont repris dans cet ordre (de haut en bas) à la **figure 4-11**.

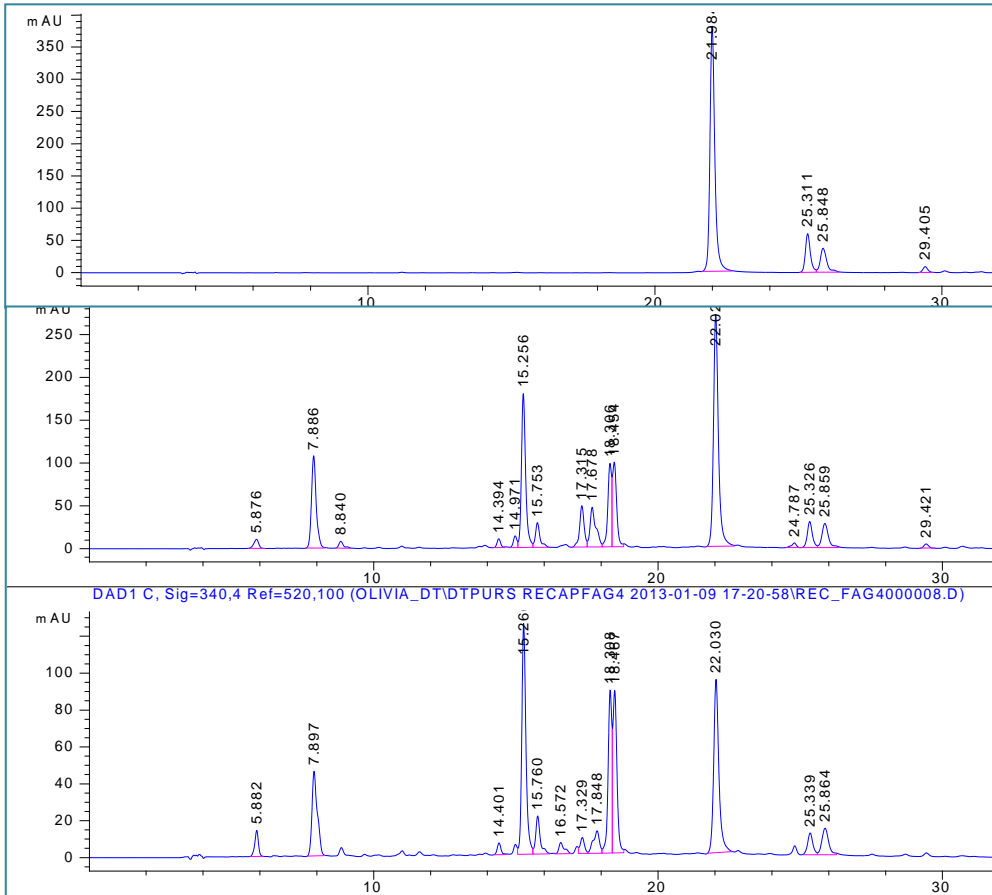


Figure 4-11 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux ($\lambda = 340\text{nm}$)

L'extrait au dichlorométhane renferme une génine flavonoïdique largement majoritaire (Tr = 22.0 min). Celle-ci est également présente dans l'extrait méthanolique et la décoction aqueuse.

4.4 “Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound.”

Jansen *et al. Malaria Journal* 2012, **11**:289
<http://www.malariajournal.com/content/11/1/289>



RESEARCH

Open Access

Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound

Olivia Jansen^{1*}, Monique Tits¹, Luc Angenot¹, Jean-Pierre Nicolas², Patrick De Mol³, Jean-Baptiste Nikiema⁴ and Michel Frédérix¹

Abstract

Background: Natural products could play an important role in the challenge to discover new anti-malarial drugs. In a previous study, *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) was selected for its promising anti-plasmodial activity after a preliminary screening of several plants traditionally used in Burkina Faso to treat malaria. The aim of the present study was to further investigate the anti-plasmodial properties of this plant and to isolate the active anti-plasmodial compounds.

Methods: Eight crude extracts obtained from *D. tomentosa* whole plant were tested *in vitro* against two *Plasmodium falciparum* strains (3D7 and W2) using the p-LDH assay (colorimetric method). The Peters' four-days suppressive test model (*Plasmodium berghei*-infected mice) was used to evaluate the *in vivo* anti-plasmodial activity. An *in vitro* bioguided fractionation was undertaken on a dichloromethane extract, using preparative HPLC and TLC techniques. The identity of the pure compound was assessed using UV, MS and NMR spectroscopic analysis. *In vitro* cytotoxicity against WI38 human fibroblasts (WST-1 assay) and haemolytic activity were also evaluated for extracts and pure compounds in order to check selectivity.

Results: The best *in vitro* anti-plasmodial results were obtained with the dichloromethane, diethylether, ethylacetate and methanol extracts, which exhibited a high activity ($IC_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$). Hot water and hydroethanolic extracts also showed a good activity ($IC_{50} \leq 15 \mu\text{g/ml}$), which confirmed the traditional use and the promising anti-malarial potential of the plant. The activity was also confirmed *in vivo* for all tested extracts. However, most of the active extracts also exhibited cytotoxic activity, but no extract was found to display any haemolytic activity. The bioguided fractionation process allowed to isolate and identify a sesquiterpene lactone (urospermal A-15-O-acetate) as the major anti-plasmodial compound of the plant ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ against both 3D7 and W2 strains). This was also found to be the main cytotoxic compound ($SI = 3.3$). While this melampolide has already been described in the plant, this paper is the first report on the biological properties of this compound.

Conclusions: The present study highlighted the very promising anti-plasmodial activity of *D. tomentosa* and enabled to identify its main active compound, urospermal A-15-O-acetate. The high anti-plasmodial activity of this compound merits further study about its anti-plasmodial mechanism of action. The active extracts of *D. tomentosa*, as well as urospermal A 15-O-acetate, displayed only a moderate selectivity, and further studies are needed to assess the safety of the use of the plant by the local population.

Keywords: Antiplasmodial, Asteraceae, Melampolide, Burkina Faso, *Dicoma tomentosa*, Natural compound

4.4.1 BACKGROUND

Chemotherapeutic treatment of malaria has evolved in the last ten years due to the spread of multi-resistant *Plasmodium falciparum* strains. The World Health Organization (WHO) currently promotes artemisinin-based combination therapy (ACT) as the reference medicine for health care management of uncomplicated falciparum malaria in order to reduce the risk of resistance [WHO, 2010a]. However, some signs of resistance to artemisinin have recently been detected in Asia [Egan, 2009; Dondorp et al., 2010; Phyo et al., 2012], representing an enormous threat for the control of the disease. The discovery of new anti-malarial drugs is urgently needed and natural products could play an important role in this new challenge. The plant kingdom has been and remains a good source of pharmacologically active compounds and especially anti-plasmodial agents, as attested by quinine, isolated from *Cinchona sp.*, and artemisinin extracted from *Artemisia annua*. Besides these well-known examples, various new anti-plasmodial natural compounds are frequently being discovered, as reviewed by several authors in recent years [Batista et al., 2009; Bero et al., 2009; Bero et al., 2011; Kaur et al., 2009; Nogueira and Lopez, 2011].

WHO estimates that up to 80% of the world's population relies on traditional medicinal products for some aspects of primary health care [WHO, 2008 and 2010b]. Many people living in developing countries do not have access to modern therapeutics, such as ACT, to treat malaria because of financial, socio-economical, geographical and/or cultural reasons, and they use plants, often in combination, for the health care management of malaria. The search for new anti-malarial natural products, following an ethnopharmacological strategy (based on traditional knowledge of plants), has led to interesting results, as reviewed and commented on by Willcox et al. [Willcox et al., 2004; Willcox and Bodecker, 2004]. Moreover, there is now evidence that some whole plant extracts can be more active than single compounds, as a result of synergy and positive interactions between different constituents in the extracts, compared to a single product [Rasoanaivo et al., 2011, Deharo and Ginsburg, 2011].

In this context, the pharmacological and phytochemical study of plants from traditional pharmacopoeias can be of interest, not only in discovering new anti-malarial "lead compounds", but also in valorizing local vegetal species whose efficacy and safety has been demonstrated in laboratory and clinical investigations [Ginsburg and Deharo, 2011]. Better knowledge of plants from traditional pharmacopoeias and local valorization of traditional remedies in improved traditional medicine (ITM) could lead to effective, standardized, available and affordable therapeutics for the management of malaria by local populations, when modern drugs are unavailable [Willcox et al., 2011]. Validated anti-malarial phytomedicines formulated from traditional medicines have been reported in

recent years. Some are government approved in different countries, e g, *Argemone mexicana* in Mali, whose anti-malarial activity has been confirmed in clinical trials [Graz et al., 2010], and “Saye” in Burkina Faso, a combination of three plants, used for several years as a curative anti-malarial and recently studied for its benefits in the prophylaxis of malaria [Yerbanga et al., 2012].

In a previous study dealing with the screening of several plants used in Burkina Faso in the traditional treatment of malaria, *Dicoma tomentosa* was selected for its promising anti-plasmodial activity [Jansen et al., 2010].

Dicoma tomentosa is a plant of the Asteraceae family growing in Asia and tropical Africa. It is an uncommon species, mainly found in the Sahelo-Sudanian area. Called “Gômtigdà” in the local language (Mooré), the decoction of the whole plant is traditionally used in Burkina Faso to treat malaria in adults and children, particularly malaria with spleen and liver “inflammation” [Jansen et al., 2008]. The plant is also known for its benefits against cough and in postnatal care to “wash the belly”, but it is not recommended for pregnant women because it is known to cause abortion. The plant has been described as containing several sesquiterpene lactones [Bolhmann et al., 1982; Zdero et al., 1990 ; Catalan et al., 1996; Krishna et al., 2003], triterpenes and sterols [Mehta et al., 1983; Catalan et al., 1996] as well as flavonoids [Aqil et al., 1998, 1999a, 1999b, 2001], but has never been studied for any biological or pharmacological properties.

The aim of the present study was to further evaluate the anti-plasmodial potential of *D. tomentosa* using *in vitro* and *in vivo* models. *In vitro* cytotoxic and haemolytic properties were also studied in order to check the selectivity of the plant and thereby to appreciate its safety of use. Finally, a bioguided fractionation was undertaken to complete the study. This phytochemical analysis led to the isolation and identification of the major active compound.

4.4.2 METHODS

4.4.2.1 Plant material

Dicoma tomentosa whole plant (400 g) was collected in Poun, province of Sanguié, Burkina Faso in October 2008. The sample was authenticated by the Herbarium of the National Botanic Garden of Belgium, at Meise (Belgium). A voucher specimen was deposited in the same Herbarium under the number BR0000005088959. The plant material was washed and dried in a ventilated room (30°C) and then ground to a powder.

4.4.2.2 Preparation of crude extracts

Eight crude extracts were prepared using eight different solvents: petroleum ether, hexane, dichloromethane, diethylether, ethylacetate, methanol, ethanol/water (50%, v/v) and hot water. For each solvent, 5 g of dried plant powder were macerated with 50 ml of solvent, while being shaken for 30 minutes with a magnetic stirrer. This step was repeated twice. The preparations were filtered and evaporated under reduced pressure.

For the aqueous crude extract, we prepared a decoction of 5 g dried plant powder in 150 ml distilled water for 90 min in order to approximate the traditional preparation method. The preparation was then filtered and freeze-dried.

4.4.2.3 *In vitro* anti-plasmodial assays

Culture

Continuous cultures of *P. falciparum*, chloroquine-sensitive (3D7) and chloroquine-resistant (W2) strains were maintained as described by Frédérick et al. in 2002. Both strains were obtained from Prof Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France).

Assay

The *in vitro* anti-plasmodial assay reproduces the erythrocytic development stage of the parasite and was performed as previously described [Jansen et al., 2010]. Each of the eight crude extracts was first dissolved in DMSO (Sigma) at a concentration of 10 mg/ml (5 mg/ml for pure compound). *Plasmodium falciparum* culture was placed in contact with a set of eight two-fold dilutions in the medium of each extract on two columns of a 96-well microplate for 48 h (final concentrations ranging from 0.8 (0.4) to 100 (50) $\mu\text{g}/\text{ml}$ and final DMSO concentration $\leq 1\%$, each condition in duplicate). Parasite growth was estimated by colorimetric revelation and measurement of absorbance at 630 nm with a multiwell scanner (Stat Fax 2100, Awareness TechnologyInc). The test is based on the evaluation of the plasmodial lactate dehydrogenase (pLDH) activity and was performed according to the method of Makler et al. in 1993 and as described previously [Kenmogne et al., 2006]. Artemisinin (Sigma–Aldrich) and chloroquine (Sigma–Aldrich) were used as positive standards, and infected and uninfected erythrocytes were added as positive and negative controls, respectively. The inhibition of growth was calculated by comparison with the infected non-treated erythrocytes (=100% growth). IC_{50} values, indicating the concentration of the drug needed to obtain 50% inhibition of parasite growth, were calculated by linear regression from a set of eight concentrations tested for each extract/pure compound. Each sample was tested three times (3 independent assays, $n = 3$) for each plasmodial strain. In line with WHO guidelines and basic criteria for antiparasitic drug discovery [Pink et al., 2005; Fidock et al., 2004], activities of extracts were classified into four classes according to their IC_{50} values: high activity ($\text{IC}_{50} \leq 5 \mu\text{g}/\text{ml}$); promising activity ($5 \mu\text{g}/\text{ml} < \text{IC}_{50} \leq 15 \mu\text{g}/\text{ml}$); moderate activity (15

$\mu\text{g/ml} < \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$); weak activity ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$). A pure compound is defined as highly active when its $\text{IC}_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$.

4.4.2.4 *In vitro* cytotoxicity assays

Culture

WI-38 normal human foetal lung fibroblasts were maintained in continuous culture in DMEM medium (Bio Whittaker) in a humid atmosphere at 37°C and 5.5% CO₂. Each medium was supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Bio Whittaker), 1% L-glutamine (200 mM) (Bio Whittaker) and antibiotics: penicillin (100 UI/ml) – streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) (Pen-strepW, Bio Whittaker).

Assays

Each of the eight crude extracts was first dissolved in DMSO (Sigma) to a concentration of 10 mg/ml (5 mg/ml for pure compound). For the assays, 96-well tissue culture microplates (Micro Test-96W, Falcon, Becton-Dickinson) were seeded with 200 μl medium containing 8,000 cells in suspension.

After 24 h incubation, cells were treated with six dilutions at a final concentration of crude extracts in culture medium of 1, 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ (half concentration for pure compounds) and a final DMSO concentration $\leq 1\%$. After 48 h incubation, cell viability was determined by adding WST-1 (Roche Biomolecular) tetrazolium salt as a cytotoxicity indicator and by reading absorbance at 450 nm with a scanning multiwell spectrophotometer (Stat Fax 2100, Awareness Technology Inc) after about a one hour wait. Tetrazolium salts are cleaved to formazan dye by cellular enzymes. The absorbance directly correlates to the viable cell number. Each condition was reproduced in triplicate and each set of tests was performed twice. Camptothecin (Sigma-Aldrich) was used as a positive cytotoxic control. The inhibition of growth was calculated by comparison with the negative control (non-treated cells). IC_{50} values, indicating the concentration of the drug needed to obtain 50% inhibition of cell growth, were calculated by linear regression from a set of six concentrations tested for each extract.

Selectivity index (SI)

The SI value allows the evaluation of the selective activity of the extracts/pure compound against the parasite compared to its toxicity for human cells. The SI value is calculated as the ratio between cytotoxic IC_{50} values and 3D7 or W2 parasitic IC_{50} values.

4.4.2.5 *In vitro* haemolysis assays

Haemolysis assays were conducted with the eight crude extracts and isolated pure compound, according to a previously described procedure [Robert et al., 2010]. Briefly, red blood cells suspensions (10% in PBS (v/v)) were incubated under agitation at room temperature for one hour with extract or pure compound solutions (final concentration = 100 $\mu\text{g/ml}$ and DMSO $< 1\%$). The mixtures were

then centrifuged at room temperature for 5 min at 10,000 × g and the absorbance (OD) of the supernatants was measured at 550 nm with a microplate reader (Stat Fax 2100, Awareness Technology Inc). The crude extracts/pure compound were tested in triplicate at a final concentration of 100 µg/ml. Triton X-100 1% (v/v) was used as a positive control (100% red blood cell lysis) and PBS as a negative control (0% red blood cell lysis). The red blood cell lysis percentage (H) was determined as follows: $H = (OD_{550nm} \text{ sample} - OD_{550nm} \text{ PBS}) / (OD_{550nm} \text{ Triton X-100 1\%} - OD_{550nm} \text{ PBS})$. The results were expressed as means ± SD with n = 3.

4.4.2.6 *In vivo* anti-plasmodial assays

The present study was approved by the Ethical Committee for the use of laboratory animals at the University of Liège (no. 721) and was designed according to the internationally recognized guidelines. Methanol, hydroethanolic and aqueous extracts of *D. tomentosa* were tested using a test protocol based on the four-day suppressive test of Peters [Fidock et al., 2004]. Female Swiss mice (10 weeks of age, 25 ± 2 g), obtained from Charles River Laboratories (Brussels), were infected by the rodent parasite *Plasmodium berghei* NK173, following the protocol described et al. [Frédérich et al., 2004]. Groups of five mice were formed randomly. The treatment doses (100 mg/kg ip or 300 mg/kg po, dissolved in 7% Tween 80 and 3% ethanol) were given intraperitoneally (methanol and hydroethanolic extracts) or orally (hydroethanolic and aqueous extracts), four hours after infection (day 0). The treatment was repeated once daily for the next three days (on days 1, 2 and 3 post-infection). On day 4 and day 7, thin blood smears were made from mouse-tail blood and were stained with Giemsa. Slides were inspected under the microscope and parasitaemia was determined by counting at least 500 erythrocytes. Mice were controlled for their mortality for two weeks. Chloroquine diphosphate salt at 4 mg/kg (ip) was used as positive control and a methanol extract of the bark of *Cinchona succirubra* at 200 mg/kg (ip) was used as “positive plant extract control” due to the known presence of quinine in this *Cinchona* bark extract. This was used as a supplemental positive control to observe the profile of inhibition with a plant extract containing a known active ingredient. The vehicle solution (7% Tween 80 and 3% ethanol) was used as a negative control. Inhibition of Plasmodium growth (%) was calculated by comparison of the parasitaemia counted for the test group with the parasitaemia in the negative control group, at days 4 and 7, respectively. Except for extracts tested by the oral route, which were tested once, the experiment was performed twice and the results represent means of inhibition of parasitaemia obtained for both experiments.

4.4.2.7 Bioguided fractionation

Extraction

60 g of *D. tomentosa* whole plant powder were first percolated with 0.9 l of hexane followed by 1.8 l of dichloromethane to give 1.1 g of hexane extract (E1) and 1.9 g of dichloromethane extract (E2), respectively (yield E2 = 3.1% (w/w)).

TLC analysis

Extracts and fractions were analysed by thin layer chromatography on Si60 silica gel plate (Merck) using dichloromethane-methanol (95:5) as the mobile phase. The plates were observed under UV light (254 and 366 nm) and then revealed by spraying of sulphuric vanillin reagent (2% in ethanol (w/v)) and heating at 105°C for 10 min.

Preparative HPLC

300 mg of the dichloromethane extract (E2) were dissolved in 11 ml of methanol-water (50:50). The solution was centrifuged, filtered (0.45 µ membrane) and injected into a reversed-phase preparative HPLC system using a Lichrospher RP-18 column (2.5x25 cm; 12–15 µ, Merck packing system) as the stationary phase. The mobile phase consisted of methanol-water (50:50) in isocratic elution with a flow rate of 20 ml/min (Armen pump). Fractions of 10 ml were collected (Büchi fraction collector) and separation was monitored by TLC analysis. Fractions with the same TLC profiles were assembled to finally give 16 fractions, designated F1 to F16. F16 (99.8 mg) was the insoluble part of the extract collected on the filter. F4 (10.2 mg) and F5 (67.3 mg) contained the main compound of the extract, as shown by TLC analysis.

Preparative TLC

10.2 mg of F4 were dissolved in 0.5 ml of dichloromethane and deposited on a preparative Si60 TLC plate (1.5 mm x 20 cm x 20 cm). Elution was performed with dichloromethane-methanol (95:5) as the mobile phase. The band corresponding to the pure compound 1 was scratched off and extracted with a mixture of dichloromethane and methanol (50:50) using a G4 filter. The filtrate was evaporated under reduced pressure to give 8.0 mg of the pure compound 1 = urospermal A-15-O-acetate. The same procedure was applied to 9.7 mg of F5 to give 7.8 mg of 1.

Spectroscopic analysis

The structure of compound 1 was elucidated using various spectroscopic techniques. NMR spectra (¹H, ¹³C, COSY, HMBC, HSQC) were recorded in CDCl₃ with a Bruker Avance 500 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe and using TMS as the internal reference. Mass spectrometry (MS) was carried out using a micromass ESI-Q-TOF II instrument (Waters) using ESI-ionization in positive mode. The UV spectrum was obtained with a methanol solution using a Kontron Uvikon Spectrophotometer. The identity of the purified compound 1 was assessed by comparison of its NMR and MS data with data from the literature [Bohlmann, 1982].

Biological assays

The fractions as well as E1 and E2 and 1 were tested against the 3D7 *P. falciparum* strain according to the protocol described above. The cytotoxic and haemolytic

properties of 1 were also evaluated, as well as its antiplasmodial activity against the W2 chloroquino-resistant strain. We used the same method as described for the crude extracts.

4.4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.4.3.1 *In vitro* and *in vivo* anti-plasmodial activity of crude extracts

All eight tested extracts were found to be active against both chloroquine-sensitive 3D7 and -resistant W2 strains of *P. falciparum* ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$). IC_{50} values obtained with crude extracts are detailed in **Table 4-1**, as well as extraction yields from plants (w/w). Dichloromethane, diethylether, ethylacetate, and methanol extracts were found to be highly active with $IC_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$, while hydroethanolic and hot water extracts displayed a promising activity ($IC_{50} \leq 15 \mu\text{g/ml}$). Petroleum ether and hexane extracts showed a lower level of activity.

Table 4-1 : *In vitro* anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts obtained from *Dicoma tomentosa* (n = 3)

Extracts	Yield (%)	IC_{50} 3D7 ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} W2 ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} W138 ($\mu\text{g/ml}$)	SI 3D7	SI W2	Haemolysis (%)
Petroleum ether	1.8 %	23.2 ± 3.1	21.2 ± 2.2	22.0 ± 0.6	0.9	1.0	< 1%
Hexane	1.7 %	18.7 ± 2.9	17.7 ± 1.2	32.9 ± 4.0	1.8	1.9	< 1%
Dichloromethane	5.4 %	3.4 ± 1.2	1.9 ± 0.2	11.5 ± 0.4	3.3	6.1	< 1%
Diethylether	3.4 %	3.9 ± 0.6	4.8 ± 0.7	6.5 ± 1.4	1.6	1.3	< 1%
Ethylacetate	4.1 %	4.4 ± 1.1	4.6 ± 0.3	5.9 ± 0.6	1.3	1.3	< 1%
Methanol	11.1 %	5.8 ± 2.0	3.0 ± 0.5	19.9 ± 5.4	3.5	6.7	< 1%
Ethanol 50% (v/v)	16.2 %	12.9 ± 3.0	9.7 ± 1.1	28.4 ± 2.9	2.2	2.9	< 1%
Hot water	20.3 %	12.8 ± 2.4	6.7 ± 1.0	47.2 ± 2.9	3.7	7.0	< 1%

SI = selectivity index = $IC_{50(W138)}/IC_{50(3D7 \text{ or } W2)}$, respectively). Standard drugs: artemisinin (3D7): $IC_{50} = 0.0067 \pm 0.0018 \mu\text{g/ml}$; artemisinin (W2): $IC_{50} = 0.0034 \pm 0.0009 \mu\text{g/ml}$; chloroquine (3D7): $IC_{50} = 0.016 \pm 0.004 \mu\text{g/ml}$; chloroquine (W2): $IC_{50} = 0.35 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$; camptothecin (W1-38): $IC_{50} = 0.029 \pm 0.011 \mu\text{g/ml}$

The levels of activity observed with the dichloromethane, methanol and hot water extracts were about twice as high as the anti-plasmodial IC_{50} values obtained for the same extracts in the previous study. That previous study was conducted with a batch of *D. tomentosa* also collected in Burkina Faso, at the same time of year but in 2007 and in a different area (and with samples from stock maintained in less adequate storage conditions) [Jansen et al., 2010]. The anti-plasmodial activity

obtained with this new batch was found to be in the same range as can be observed with *Artemisia annua* extracts [Phillipson and Wright, 1991]. The anti-plasmodial activity of the hot water extract supports the traditional use of this plant to treat malaria and is an interesting result when considering further prospects for its local valorization.

In vivo experiments with methanol, hydroethanolic and aqueous extracts of *D. tomentosa* whole plant confirmed the anti-plasmodial activity of this Asteraceae. Both treatments given intraperitoneally (methanol and hydroethanolic extracts, 100 mg/kg) displayed an inhibition of parasitaemia in the range of 40-60% at days 4 and 7. Unfortunately, both extracts were found to be toxic when the dose was increased to 200 mg/kg/day, i.p. (all the mice died before day 4). Both treatments given by oral route (hydroethanolic and hot water extracts, 300 mg/kg) showed a much lower activity at day 4, but at day 7 the inhibition of *Plasmodium* growth was in the same range as for the extracts given intraperitoneally. Detailed results are presented in Figure 4-12.

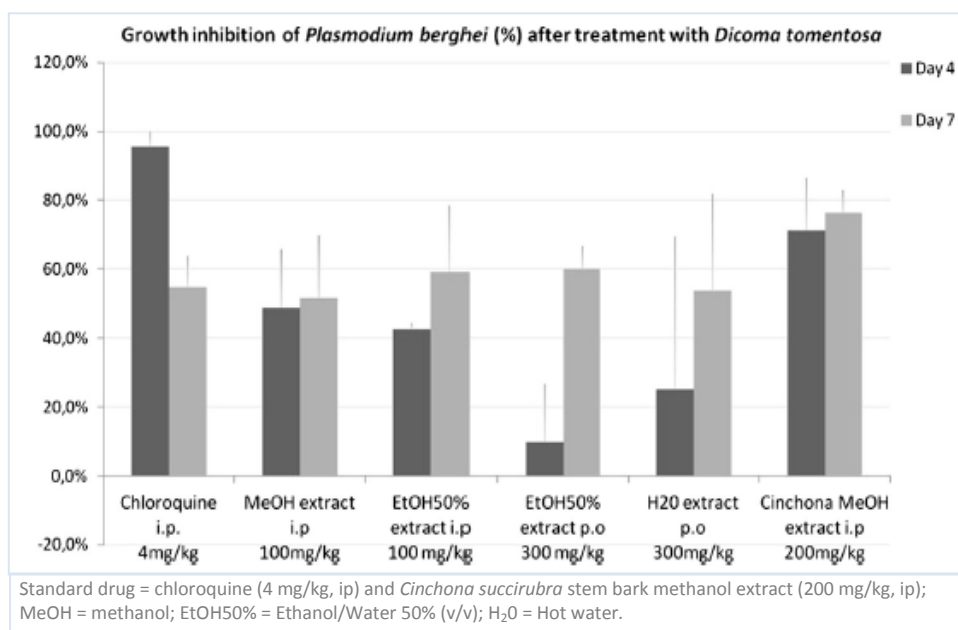


Figure 4-12: *In vivo* antiplasmodial activity of *Dicoma tomentosa* extracts

The inhibition of parasitaemia was thus maintained (for ip-tested extracts and *Cinchona* control extract) or improved (for po-tested extracts) between days 4 and 7, in contrast with chloroquine, for which the activity was high at day 4 but clearly decreased at day 7. The prolonged activity obtained with the plant extracts against the parasite indicates either a long half-life of the active compounds in the extract, or the implication of metabolization in the activity with production of active

metabolites. That (as well as the gastrointestinal resorption process) could explain the delayed effect observed with oral treatments.

4.4.3.2 Cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts

Additional *in vitro* studies concerning the haemolytic potential and the cytotoxic activity on normal human fibroblasts were also carried out in order to check the anti-plasmodial selectivity of *D. tomentosa*. Results are detailed in **Table 4-1**. No extract was found to exhibit significant red blood cells lysis activity with a percentage of haemolysis <1% for all tested extracts (C = 100 µg/ml). This indicates that anti-plasmodial activity is not correlated with haemolysis of red blood cells but with a real action against the parasite. However, all eight extracts were found to be quite cytotoxic on WI38 cells (IC₅₀ values from 5.9 to 47.2 µg/ml) and showed a low to moderate selectivity (SI from 0.9 to 7.0, depending on the extract and the plasmodial strain).

4.4.3.3 Bioguided fractionation: isolation and identification of the major active compound

A bioguided fractionation was carried out in order to identify the compound(s) responsible for the anti-plasmodial activity. Preliminary TLC analysis of the CH₂Cl₂ crude extract revealed the presence of some major terpenic compounds in the plant, especially one grey spot (R_f ~0.65), using the sulphuric vanillin reagent. The intensity of this grey spot, named "**compound 1**", seemed to be correlated with the *in vitro* anti-plasmodial activity of the different tested extracts (**Fig. 4-13**).

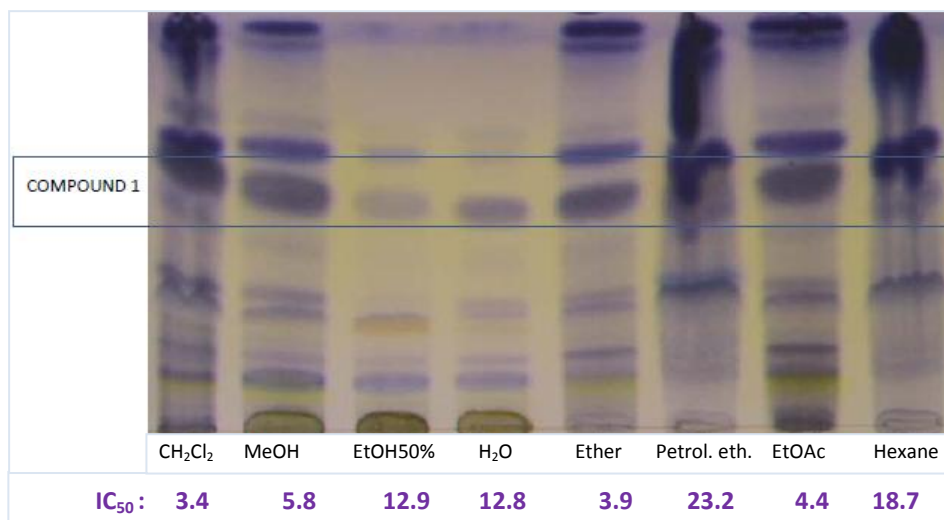


Figure 4-13: TLC analysis of *D. tomentosa* extracts tested *in vitro* for antiplasmodial activity
 (Mobile phase: CH₂Cl₂ - MeOH (95:5), reveal. : sulphuric vanillin reagent)
IC₅₀ in µg/ml (*P. falciparum* 3D7)

For the bioguided fractionation and depending on the results obtained with the eight crude extracts, powdered plant was first extracted by hexane (E1), followed by dichloromethane (E2 = “defatted extract” – yield = 3.1%). E2 was submitted to preparative reversed-phase HPLC to give 16 fractions (F1-F16). The activity of the extracts and fractions was evaluated against *P. falciparum* 3D7 strain. IC₅₀ values of E1 and E2 were 36.9 and 2.0 µg/ml, respectively. E2 containing compound 1 as the major compound was found to be even more active than the crude dichloromethane extract, while E1, found to contain the other major terpenes in TLC analysis, was much less active. All tested fractions obtained from E2 were found to possess high or promising anti-plasmodial activity, with IC₅₀ values ranging from 0.95 µg/ml (F4 and F5) to 6.9 µg/ml (F16) see Fig. 4-14 and 4-15.

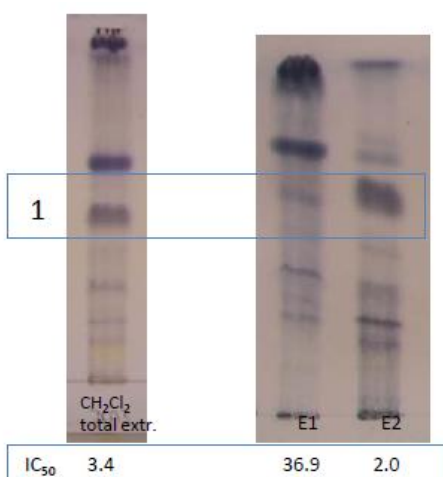


Figure 4-14:
Bioguided fractionation of *D. tomentosa* :
TLC profiles of total CH₂Cl₂ extract, E1 and E2 (= successive hexane and CH₂Cl₂ extracts) and IC₅₀ in µg/ml (*P. falciparum* 3D7)

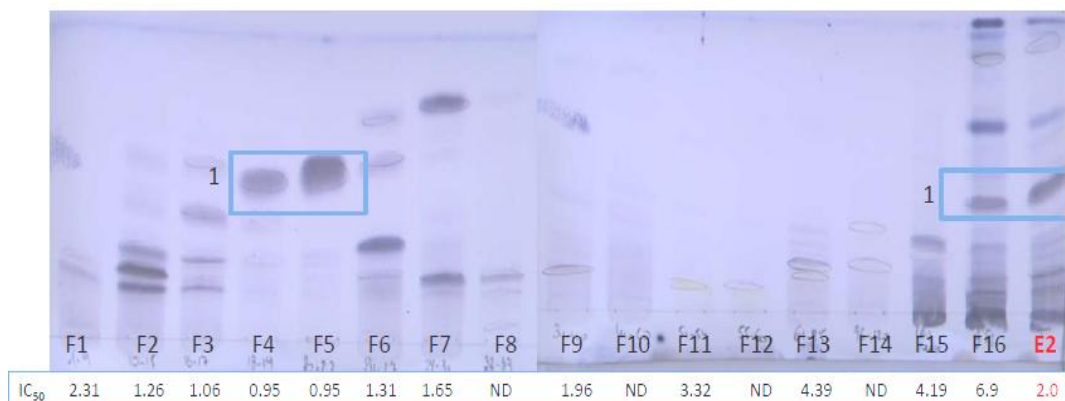


Fig 4-15: Bioguided fractionation of *D. tomentosa* :
TLC of the fractions collected from preparative HPLC (E2) and IC₅₀ in µg/ml (*P. falciparum* 3D7)

F16 is the insoluble part of E2, collected on the filter and not injected.

The significant activity detected in several fractions with different TLC profiles means that several compounds can be said to contribute to the overall *in vitro* antiplasmodial properties of *D. tomentosa* dichloromethane extract. However, major compound **1** - the grey spot - was the main constituent of the two most active fractions F4 and F5 (respectively 10.2 mg and 67.3 mg = 25.84% E2 (w/w)) and this compound could therefore be considered as the major active compound in the plant. Compound **1**, a terpene, was finally isolated as a pure compound after an additional preparative TLC step on F4 and F5 and was submitted to UV, MS/MS and NMR analysis (Table 4-2, Figure 4-16 et 4-17). Compound **1** was identified as urospermal A- 15-O-acetate, a melampolide-type sesquiterpene lactone (Figure 4-18). Its identity was confirmed by comparison of its spectral profile with spectral data available for known compounds in *D. tomentosa* [Bolhman et al., 1982]. Melampolides are 10-membered ring sesquiterpene lactones. They can be considered a subgroup of germacranolides but with a 1,10 cis-double bond configuration. Yield of urospermal A-15-O-acetate was estimated to 20.7% (w/w) of the dichloromethane extract (E2), corresponding to 0.64% (w/w) of the dried plant.

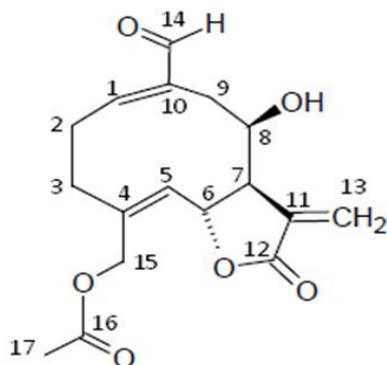


Figure 4-18 : Compound **1** = urospermal A-15-O-acetate (MM = 320.34)

Table 4-2: Spectroscopic data of compound 1

Common name : Urospermal A -15-O-acetate

Molecular formula : C₁₇H₂₀O₆ (MM = 320.3)

MS : [m/z]⁺ = 343.1 [M+Na]⁺

UV : λ_{MAX} = 229.5 nm

NMR : Chemical shifts (δ) in ppm from TMS.

¹H-NMR spectroscopic data (500MHz, CDCl₃):

2.08 (1H, m, H3'); 2.13 (3H, s, H17); 2.37 (1H, m, H2'); 2.48 (1H, m, H7); 2.50 (1H, m, H9'); 2.52 (1H, m, H9); 2.61 (1H, m, H2); 2.67 (1H, m, H3); 3.98 (1H, m, H8); 4.60 (1H, dd - J=10.6Hz, 10.3Hz, H6); 4.71 (1H, d - J=12.8Hz, H15'); 4.84 (1H, d - J=12.8Hz, H15); 5.22 (1H, d-J=10.6Hz, H5); 5.63 (1H, d, OH); 6.33 (1H, m, H13); 6.54 (1H, m, H13'); 6.83 (1H, t, H1); 9.47 (1H,s, H-14).

¹³C-NMR spectroscopic data (500MHz, CDCl₃):

20.8 (CH₃, C-17); 27.7 (CH₂, C-2); 32.9 (CH₂,C-3); 33.2 (CH₂, C-9); 51.7 (CH, C-7); 61.9 (CH₂, C-15); 70.0 (CH, C-8); 75.5 (CH, C-6); 125.4 (CH₂, C-13); 129.9 (CH, C-5); 136.4 (C, C-11); 136.6 (C, C-4); 144.4 (C, C-10); 159.2 (CH,C-1);170.0 (C, C-12); 170.5 (C, C-16); 199.3 (C, C-14).

Position	¹ H ^a	¹³ C ^b	COSY
1	6.83 (t)	159.2 (CH)	H2,H2'
2	2.61 (m)	27.7 (CH ₂)	H1, H2', H3, H3'
2'	2.37 (m)		H1, H2, H3, H3'
3	2.67 (m)	32.9 (CH ₂)	H2, H2', H3'
3'	2.08 (m)		H3, H2, H2'
4	-	136.6 (C)	-
5	5.22 (d, 10.6Hz)	129.9 (CH)	H6
6	4.60 (dd, 10.6Hz, 10.3Hz)	75.5 (CH)	H5, H7
7	2.48 (m)	51.7 (CH)	H6, H8, H13, H13'
8	3.98 (m)	70.0 (CH)	H7, H9, H9', OH
9	2,52 (m)	33.2 (CH ₂)	H8, H9'
9'	2,50 (m)		H8, H9
10	-	144.4 (C)	-
11	-	136.4 (C)	-
12	-	170.0 (C)	-
13	6.54 (m)	125.4 (CH ₂)	H7, H13'
13'	6.33 (m)		H7, H13
14	9.47 (s)	199.3 (CH)	-
15	4.84 (d, 12.8Hz)	61.9 (CH ₂)	H15'
15'	4,71 (d, 12.8Hz)		H15
16	-	170.5 (C)	-
17	2.13 (s)	20.8 (CH ₃)	-
OH	5.63 (d, 11.2Hz)	-	H8

^a Chemical shifts (δ) in ppm from TMS. Multiplicities and coupling constants in Hz are in parentheses. ^b Carbon multiplicities in parentheses were deduced from APT spectrum.

Figure 4-16 : NMR ^1H spectrum of urospermal A 15-O-acetate

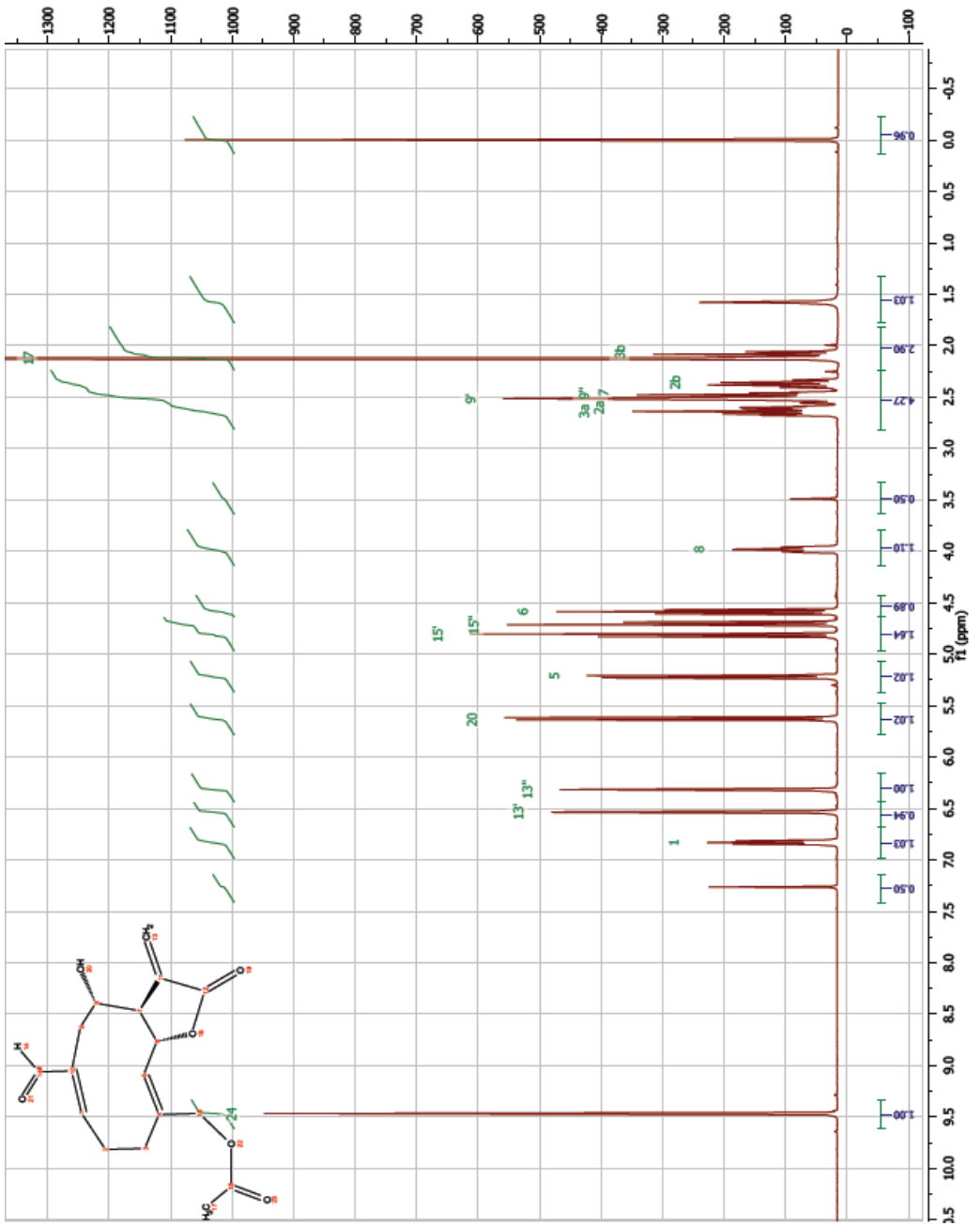
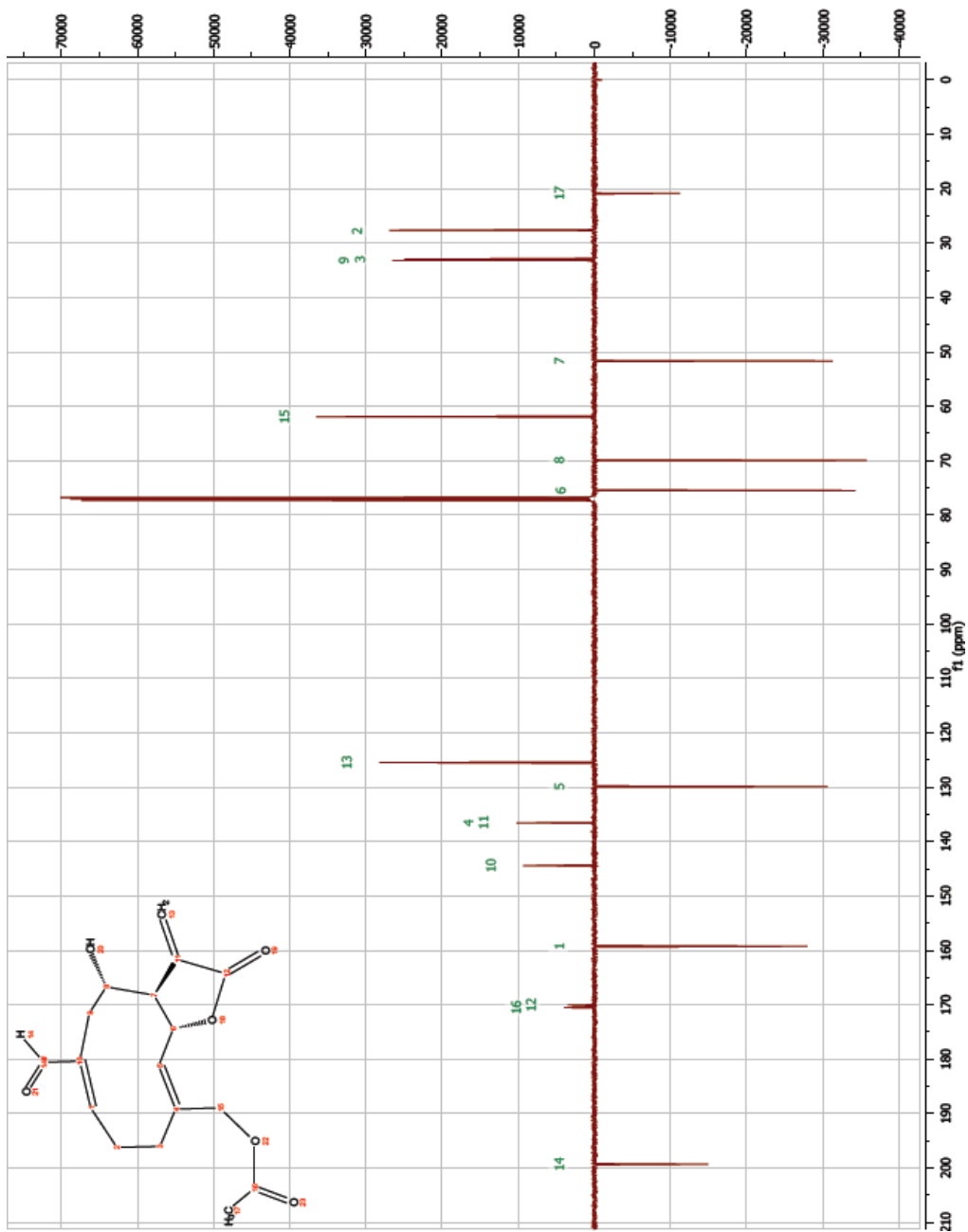


Figure 4-17 : NMR ^{13}C spectrum of urospermal A 15-O-acetate



4.4.3.4 Anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic properties of urospermal A-15-O-acetate

Purified compound **1** was also tested for its anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic properties. Results are presented in **Table 4-3**. Urospermal A-15-O-acetate was found to display a very strong anti-plasmodial activity with $IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ against both chloroquine-sensitive and –resistant *P. falciparum* strains. The contribution of this active compound to the activity of the dichloromethane extract (E2) can be estimated to 62.1%, according to the method described by Deharo and Ginsburg in 2011. This confirmed that urospermal A-15-O-acetate could be considered as the main active compound of the plant. It is likely that other minor closely related sesquiterpene lactones – such as the other germacranolides and melampolides already described in the plant [Bolhman et al., 1982; Zdero et al., 1990] – also displayed additive/synergistic anti-plasmodial activity, as attested by the significant activity detected in almost all the fractions. Products from other phytochemical classes, such as flavonoids (already described in the plant [Aqil et al., 1998, 1999a, 1999b, 2001]) could also play some role in the overall anti-plasmodial effect by several mechanisms, as widely described for *A. annua* [Phillipson and Wright, 1991 ; Ferreira et al., 2010]. No significant haemolytic activity was detected for **1**. However, this sesquiterpene lactone appeared to be cytotoxic with $IC_{50} = 3.0 \mu\text{g/ml}$ on WI-38 human fibroblasts.

The selectivity index (SI = 3.3) was the same as those obtained with the crude CH_2Cl_2 extract, which suggests that this major anti-plasmodial compound is the main cytotoxic product in the plant.

Table 4-3 : *In vitro* anti-plasmodial, cytotoxic and haemolytic activity of crude extracts and pure compound (1) obtained from *Dicoma tomentosa* (n = 3)

Pure compound	Yield (in the plant)	IC_{50} 3D7 $\mu\text{g/ml}$ (μM)	IC_{50} W2 $\mu\text{g/ml}$ (μM)	IC_{50} WI38 $\mu\text{g/ml}$ (μM)	SI 3D7	SI W2	Haemo lysis (%)
Urospermal-15-O-acetate (MM = 320.34)	0.64 %	0.92 ± 0.05 (= 2.87 ± 0.16)	0.77 ± 0.25 (= 2.41 ± 0.78)	3.03 ± 0.18 (= 9.47 ± 0.56)	3.3	3.9	< 1%

Urospermal A-15-O-acetate has already been described as a major compound of *D. tomentosa* by Bolhmann et al. in 1982, for a batch collected in South Africa. The present study is, however, the first report of the compound's antiplasmodial and cytotoxic properties. Moreover, this compound has never been described in any other plant. Recently, another plant from the same genus, *Dicoma anomala ssp gerrardii* was described for its anti-plasmodial activity [Becker et al., 2011]. The main active compound in that plant was also a sesquiterpene lactone but of the

eudesmanolide-type and represented 0.0013% (w:w) of the dried plant powder. Cytotoxic activity was also detected for this compound in that study.

Many sesquiterpene lactones isolated from Asteraceae have already been described as anti-plasmodial and cytotoxic in the literature, such as (pseudo)guaianolides, eudesmanolides and also germacranolides/melampolides (e.g., tagitinin C from *Tithonia diversifolia* [Goffin et al., 2002] and recently acanthospermolide derivatives from *Acanthospermum hispidum* [Ganfou et al., 2012]). Structure–activity relationship studies have shown that the α -methylene- γ -lactone moiety (or more widely, at least one potentially reactive α,β -unsaturated bond) is the main element needed for anti-plasmodial or cytotoxic activity of such compounds, and that antiprotozoal activity is significantly correlated with cytotoxicity [Scotti et al., 2007; Schmidt et al., 2009]. The low selectivity of such compounds can be explained by the chemical reactivity of the α,β -unsaturated bond, especially towards free thiol groups (e.g., cysteine residues in enzymes and transcription factors).

4.4.4 CONCLUSIONS

Dicoma tomentosa Cass. showed promising anti-plasmodial properties through *in vitro* and *in vivo* tests performed in the present study, and this supports the traditional use of this plant. However, the plant's lack of selectivity would urge caution in its consumption by the local population. Further studies (e.g., regarding genotoxicity, acute/chronic toxicity) are needed to assess the safe use of the plant. We found that the main active compound of the plant, urospermal A-15-O-acetate, showed a promising anti-plasmodial activity with a low but real selectivity. Its mechanism of action is currently under study. A pharmacomodulation process may need to be undertaken in order to decrease the compound's toxicity while maintaining (or improving) its activity. On the other hand, its cytotoxic activity could also be investigated in the field of cancerology.

Acknowledgments

The authors wish to thank the local "Jardins du monde" team in Burkina Faso for their help in collecting plant samples and ethnobotanical information regarding *Dicoma tomentosa*. They would also like to thank Pr A Chariot (GIGA, University of Liège, Belgium) for providing technical support and installations to perform the cytotoxicity assay, Dr J Widart for her precious help in mass spectrometry analysis, Dr A. Tchinda for his help with the NMR data and Pr E Robbrecht (National Herbarium of Belgium, Meise) for identification of the plant.

4.5 Evaluation de la concentration d'UA150A dans les extraits (HPLC)

Nous avons cherché à évaluer la concentration d'UA150A dans différents extraits de *D. tomentosa*, notamment pour mettre ces résultats en relation avec l'activité antiplasmodiale de ceux-ci.

La méthode HPLC appliquée est celle décrite au point 4.3.3. Celle-ci n'a pas été validée par une droite de calibration et ne peut donc être qualifiée de méthode de dosage mais elle nous permet cependant de procéder à une évaluation préliminaire de la concentration de l'UA150A dans les extraits.

Les chromatogrammes HPLC enregistrés à 230nm ont été utilisés pour mesurer les surfaces des pics correspondant à l'UA150A ($T_r = 21,55$ min) dans les extraits au dichlorométhane, méthanolique et aqueux, présentés dans cet ordre (de haut en bas) à la figure 4-19.

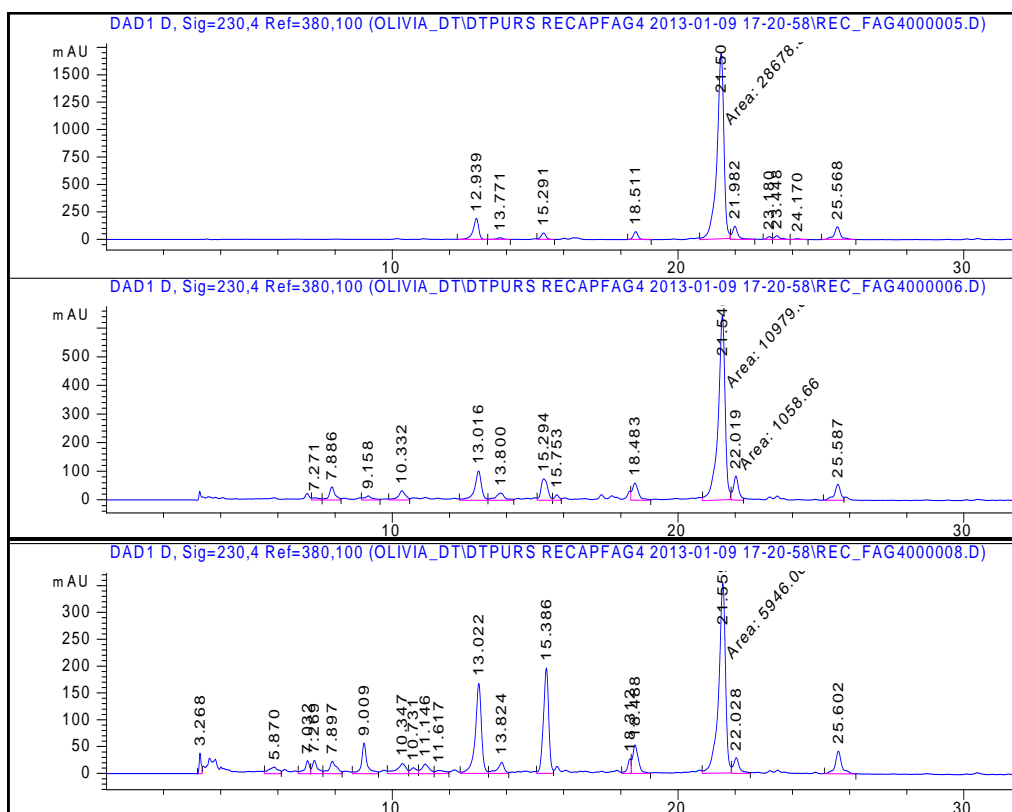


Figure 4-19 : Profils HPLC des extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux ($\lambda = 230$ nm)

La comparaison de la surface du pic de l'UA150A (S = 19756) dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin d'UA150A (C = 1,0mg/ml) avec la surface de ce pic dans les chromatogrammes respectifs des différents extraits a permis l'évaluation de la quantité d'UA150A dans ceux-ci (Tableau 4-4) .

Tableau 4-4 : Evaluation de la quantité d'UA150A dans les extraits

	Concentration de la solution d'extrait	Surface du pic de l'UA150A	Evaluation de la quantité d'UA150A dans les extraits (m/m)	IC ₅₀ (µg/ml, <i>P. falciparum</i>)
Extrait CH ₂ Cl ₂	5,0 mg/ml	28678	29%	3.4 ± 1.2
Extrait MeOH	5,0 mg/ml	10980	11%	5.8 ± 2.0
Extrait H ₂ O	5,0 mg/ml	5946	6%	12.8 ± 2.4

L'extrait CH₂Cl₂ contient environ 2,5 fois plus d'UA150A que l'extrait MeOH et 5 fois plus que la décoction aqueuse, et, par comparaison de leur IC₅₀, ces extraits sont respectivement environ 2 et 4 fois moins actifs sur *P. falciparum* que l'extrait au dichlorométhane. Cela confirme la corrélation entre la présence d'UA150A et l'activité antiplasmodiale des différents extraits de *D. tomentosa* et que ce composé est le principe actif largement majoritaire de la plante ; il n'est pas exclu que d'autres composés puissent participer à son activité globale sur *P. falciparum*.

Si un MTA devait être mis au point à partir de cette plante, le développement d'une méthode de dosage validée de l'UA150A devrait être envisagé afin de standardiser les échantillons en principe actif. L'identification de certains flavonoïdes majoritaires de la plante devra également être réalisée afin de compléter l'identification des extraits par la détection de marqueurs spécifiques qui pourraient être utilisés pour garantir la qualité (et l'identité) des échantillons.

4.6 Etude du potentiel génotoxique des extraits de *Dicoma tomentosa*

Dans ce sous-chapitre, nous détaillerons quelques résultats obtenus lors de l'évaluation de la génotoxicité de *D. tomentosa* Cass, afin d'obtenir des données complémentaires par rapport à la sécurité d'usage de la plante.

La **génotoxicité** est définie comme la capacité d'une substance à induire des modifications physiques ou fonctionnelles dans un génome. Ainsi, des produits génotoxiques peuvent être à l'origine de l'apparition de cancer lorsque les altérations touchent des gènes critiques impliqués dans les processus de division cellulaire.

Il est donc primordial de vérifier que les remèdes naturels issus des pharmacopées traditionnelles sont dépourvus de propriétés génotoxiques, en particulier si on envisage leur valorisation dans un médicament traditionnel amélioré (MTA).

En Europe, des recommandations concernant l'évaluation de la génotoxicité potentielle des plantes médicinales utilisées en thérapeutique ont été émises par le comité HMPC (Herbal Medicinal Products Comitee) de l'Agence Européenne du Médicament [EMA, 2008].

Dans le cadre de ce travail, il nous a paru important d'évaluer le potentiel génotoxique de différents extraits de *D. tomentosa* et de son principe actif majoritaire, l'UA150A. En effet, si tant les extraits que l'UA150A ont montré des propriétés antiplasmodiales prometteuses, leur innocuité doit également être vérifiée. Cela d'autant plus que les extraits et l'UA150A avaient déjà montré quelques signes de toxicité lors des tests de cytotoxicité réalisés *in vitro* sur fibroblastes humains WI-38 [Jansen et al., 2010].

Les tests de génotoxicité présentés dans ce travail ont été réalisés à **l'Université d'Aix-Marseille II**, par l'équipe du **Prof. C. Di Giorgio** (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, Faculté de Pharmacie).

Nous avons testé le potentiel génotoxique des extraits au dichrométhane, méthanolique et aqueux (décoction) de *Dicoma tomentosa*, et de son composé antiplasmodial majoritaire, l'UA150A. Les extraits testés sont les mêmes que ceux utilisés lors des tests d'activités antiplasmodiale et cytotoxique décrits précédemment dans l'article (voir 4.4.2.2).

Le modèle utilisé est le **test de numération des micronoyaux sur cellules CHO**.

4.6.1 PRINCIPE DU TEST ET PROTOCOLE

Les micronoyaux se définissent comme des entités nucléaires indépendantes du noyau principal et présentes dans le cytoplasme des cellules en interphases. Ils sont constitués de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose. Ils traduisent des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes, consécutives à des remaniements génomiques, et sont la conséquence de l'action génotoxique d'agents clastogènes (qui induisent des cassures chromosomiques) ou aneugènes (qui induisent des pertes de chromosomes).

La formation de micronoyaux reflète une action génotoxique directe ou un mécanisme épigénétique qui aboutissent tous deux à l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires. Ainsi, ils sont à l'origine de clones de cellules initiées, constituant la première étape de la cancérogénèse.

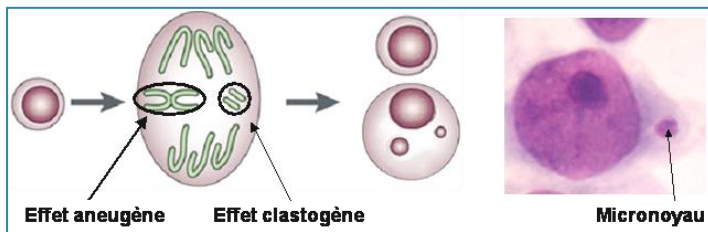


Figure 4-20 : Processus de formation des micronoyaux.

Le test *in vitro* de numération des micronoyaux est un test court de mutagenèse qui permet d'identifier les agents physiques ou chimiques clastogènes ou aneugènes, c'est à dire capables d'induire la formation de micronoyaux dans des cellules de mammifères. Il est maintenant largement validé et fait l'objet d'une recommandation de l'OCDE (N°487, Juin 2004).

La méthodologie employée utilise un protocole qui bloque la cytokinèse cellulaire par l'ajout de cytochalasine B et permet ainsi un contrôle intrinsèque de la division cellulaire et une mesure de la toxicité des substances testées. Afin de mimer les transformations métaboliques caractéristiques des organismes supérieurs, le test inclut l'utilisation d'une source exogène d'activation métabolique (S9).

Protocole sans activation métabolique [OCDE, 2004] :

- Lignée de cellules CHO (Hamster)
- 4 doses croissantes de produit dont au moins 3 doses analysables (toxicité inférieure à 50%)
- 2 essais indépendants par dose pour un total de 2000 cellules analysées
- Témoins négatifs (contrôle de culture cellulaire C- et contrôle contenant le solvant Co) et positif (C+, mitomycine C 0.3 µg/ml) inclus dans chaque test
- Temps de contact de 3 heures

Protocole avec activation métabolique S9 mix [OCDE, 2004]

- Lignée de cellules CHO (Hamster)
- 4 doses croissantes de produit dont au moins 3 doses analysables (toxicité inférieure à 50%)
- 2 essais indépendants par dose pour un total de 2000 cellules analysées
- Témoins négatifs (contrôle de culture cellulaire C- et contrôle contenant le solvant Co) et positif (C+, Benzo-a-pyrène 5 µg/ml) inclus dans chaque test
- Temps de contact de 3 heures

Le test de numération des micronoyaux est considéré comme positif si :

1. Une **relation dose-réponse** a été établie entre les taux de cellules micronucléées et les concentrations testées.
2. Une **augmentation significative** ($P \leq 0,05$) **des taux de cellules micronucléées** a été observée pour au moins une concentration qui n'induit pas plus de 50% de réduction de l'index de prolifération cellulaire (rapport entre les cellules binucléées et les cellules mononucléées) par rapport au contrôle négatif.

Le modèle mathématique qui représente le mieux chaque relation dose-réponse est établi par régression non linéaire. Il permet de calculer, à partir d'une équation entre les taux de cellules micronucléées et les concentrations testées, la **Concentration Minimale Clastogène (CMC)**. Celle-ci est définie comme la concentration d'extrait à partir de laquelle une augmentation significative des taux de cellules micronucléées est observée. La méthodologie complète a été décrite en détail par Liu et al., 2011, Mustafayeva et al., 2010 et Traoré et al., 2000.

4.6.2 RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont détaillés pour chaque extrait et l'UA150A sur les figures 4-21 à 4-24 et résumés dans le tableau 4-5. Les figures ont été construites à partir des 4 doses au-delà desquelles une génotoxicité supérieure ou égale à 50% a été observée.

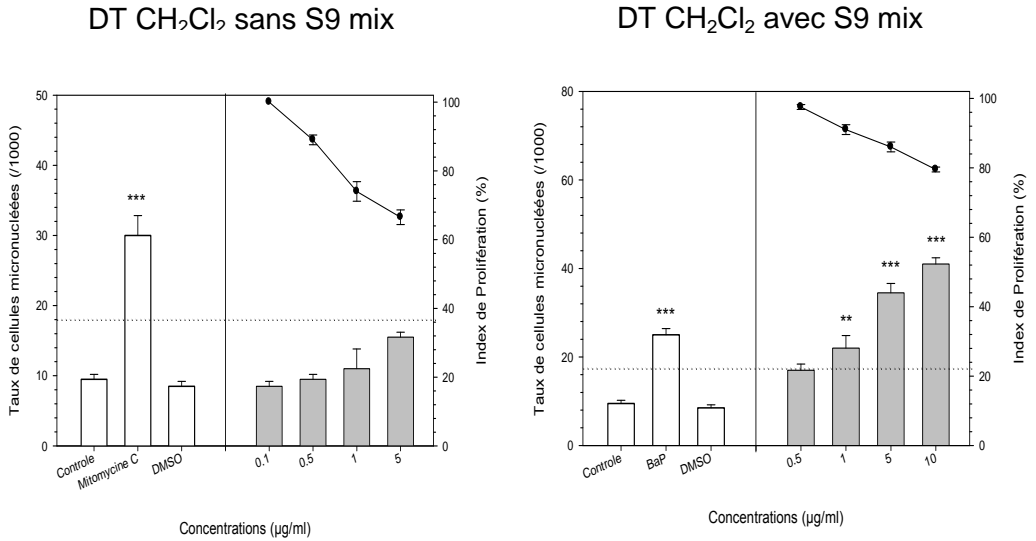


Figure 4-21 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait CH₂Cl₂ de *D. tomentosa*

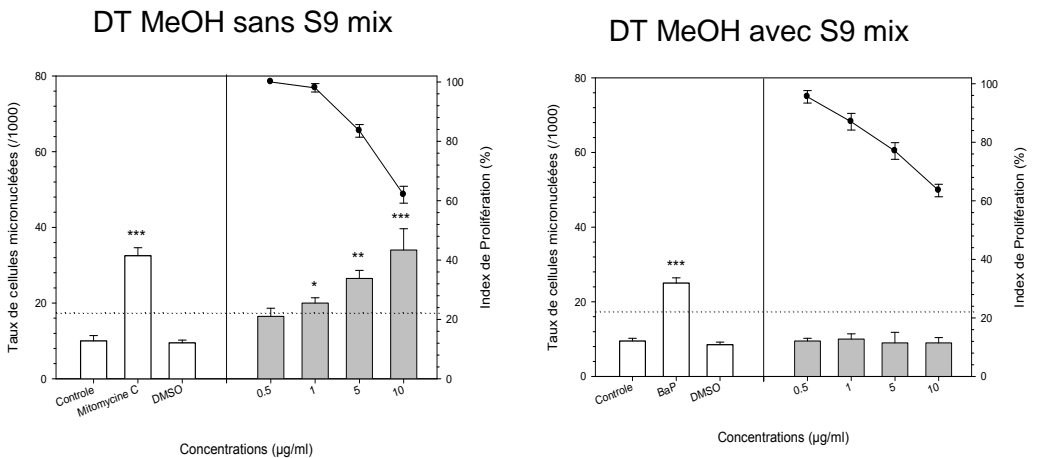


Figure 4-22 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait MeOH de *D. tomentosa*

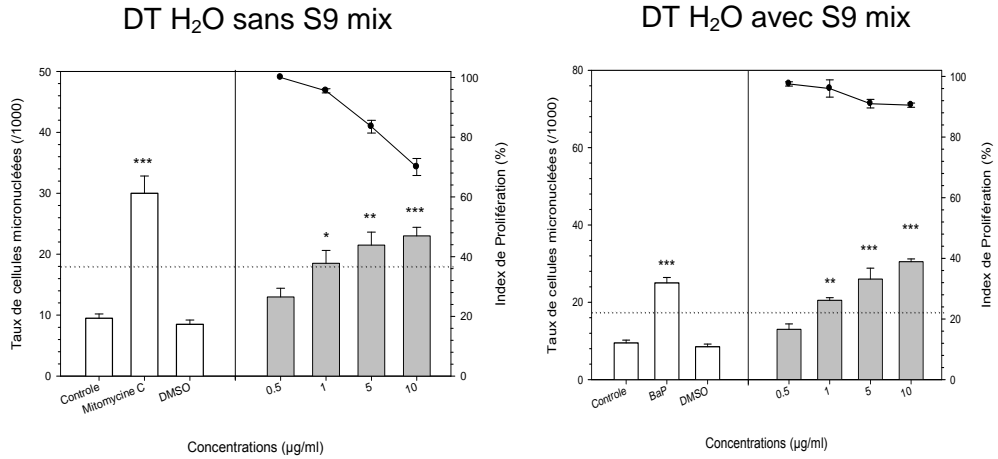


Figure 4-23 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'extrait aqueux de *D. tomentosa*

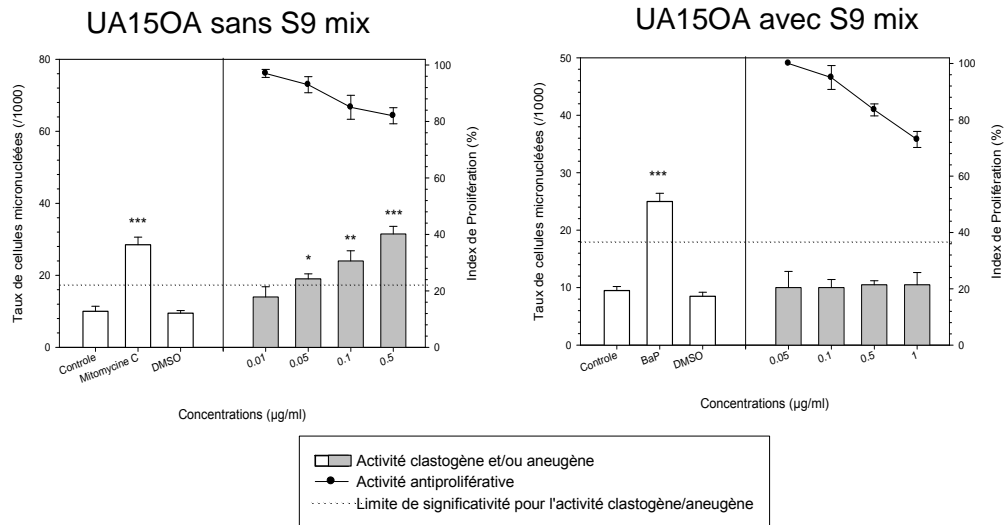


Figure 4-24 : Résultats du test de numération des micronoyaux pour l'urospermal A 15-O-acetate

Tableau 4-5 : Résumé des activités clastogéniques/aneugéniques des extraits et de l'UA15OA : Concentrations minimales clastogènes (CMC)

Extrait		R ²	P	Pe	CMC (µg/ml)
Dichloromethane	- S9mix	-	-	-	-
	+ S9 mix	0.98	0.00004	0.06	0.68
Methanol	- S9mix	0.969	0.03	0.253	1.479
	+ S9 mix	-	-	-	-
Décoction aqueuse	- S9mix	0.92	0.004	0.144	1.31
	+ S9 mix	0.95	0.001		0.88
Urospermal A-15-O-acetate	- S9mix	0.961	0.00024	0.287	0.046
	+ S9 mix	-	-	-	-

R² : Coefficient de corrélation avec le modèle P : Probabilité du modèle Pe : Probabilité de l'erreur

En résumé:

L'UA15OA ainsi que les extraits méthanol et aqueux ont montré des activités clastogènes/aneugènes directes au test des micronoyaux tandis que l'extrait au dichlorométhane s'est avéré clastogène uniquement après activation métabolique. Ce dernier peut donc être qualifié de pro-mutagène, c'est-à-dire qui produit des métabolites génotoxiques après métabolisation.

Alors que l'extrait méthanolique et l'UA15OA sont inactivés au cours des réactions de transformation hépatique, l'activité clastogène/aneugène de l'extrait aqueux varie très peu en présence d'une activation métabolique.

En conclusion :

- L'extrait dichlorométhane de *D. tomentosa* est celui qui s'est montré le plus génotoxique avec une concentration minimale clastogène de 0,68µg/ml (après activation métabolique).
- L'extrait aqueux, proche de la forme traditionnelle de préparation, a également montré des propriétés génotoxiques directes sans que la métabolisation hépatique ait d'effet significatif (CMC =0,88-1,31µg/ml).
- Enfin, cette étude a montré que l'UA15OA est capable d'induire des mutations chromosomiques à une très faible concentration (CMC = 0,046µg/ml) mais que ces propriétés clastogènes pourrait être inactivées après métabolisation hépatique.
- Les résultats obtenus démontrent une génotoxicité dans le modèle étudié et dès lors une suspicion de toxicité humaine lors d'un usage chronique. Si le mécanisme exact de la génotoxicité ainsi que la signification clinique de ces résultats reste à approfondir, notamment par rapport à l'usage (souvent ponctuel) de *D. tomentosa* dans la prise en charge traditionnelle du paludisme par les populations locales, il conviendrait de faire preuve d'une certaine prudence quant à son utilisation. Vu le niveau de génotoxicité détecté lors de nos travaux, y compris pour l'extrait aqueux, la possibilité de valoriser cette plante possédant pourtant une activité prometteuse sur *P. falciparum*, sous forme de MTA dans la prise en charge du paludisme semble quelque peu compromise.
- L'évaluation de la génotoxicité par d'autres modèles de tests recommandés par le HMPC pourrait être envisagée afin de confirmer les résultats obtenus (p.ex. : test d'Ames, tests des comètes).

4.7 Etude de la cytotoxicité de l'UA15OA sur cellules cancéreuses

Bien que cela nous éloigne quelque peu de notre objectif initial, l'évaluation de l'urospermal A 15-O-acetate pour ses propriétés anticancéreuses constitue une autre perspective de valorisation de nos travaux. En effet, la cytotoxicité significative observée avec cette lactone sesquiterpénique lors du fractionnement bioguidé de *Dicoma tomentosa* nous a amené à évaluer son potentiel cytotoxique sur cellules cancéreuses.

Le fait que plusieurs lactones sesquiterpéniques dont des germacranolides aient montré des potentialités anticancéreuses prometteuses [Rungeler et al., 1999; Rivero et al., 2003 ; Ghantous et al., 2011] est un argument de plus qui nous a encouragé à poursuivre dans cette voie.

Les tests présentés dans ce travail ont été réalisés par **l'équipe du Prof. R. Kiss, Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, ULB.**

4.7.1. TEST DE CYTOTOXICITÉ SUR DIFFÉRENTES LIGNÉES CANCÉREUSES (MTT)

4.7.1.1 Méthodologie

Dans un premier temps, le potentiel cytotoxique de l'UA15OA a été évalué *in vitro* par un test au MTT réalisé sur 3 lignées de cellules cancéreuses (A549: cancer du poumon non à petites cellules; SKMEL-28: mélanome humain; U373N: glioblastome), exposées pendant 72h à différentes concentrations d'UA15OA. L' IC_{50} , correspondant à la concentration d'UA15OA capable d'inhiber 50% de la croissance cellulaire a été calculée pour chaque lignée. Le protocole suivi lors de ce test a été décrit antérieurement [Frédérich et al., 2009].

La cytotoxicité a ensuite été évaluée de la même manière sur une série de 8 lignées cancéreuses humaines (A549, Lovo (côlon), MCF7 (sein), PC3 (prostate), SKMEL-28, B16F10 (mélanome), Hs683 (gliome), U373N) et 3 lignées humaines de cellules non cancéreuses (HaCat, HBL100, NHDF).

4.7.1.2 Résultats et Discussion

Le composé a montré une forte inhibition de croissance (IC_{50} A549 = 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; IC_{50} SKMEL-28 = 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; IC_{50} U373N = 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lors du premier test sur ces 3 lignées qui présentent des degrés divers de résistance aux stimuli proapoptotiques et pro-autophagiques.

Son activité cytotoxique a été confirmée lors de la seconde série de tests MTT sur un nombre plus large de lignées (Fig. 4-25). L'UA150A n'a malheureusement pas montré de sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales.

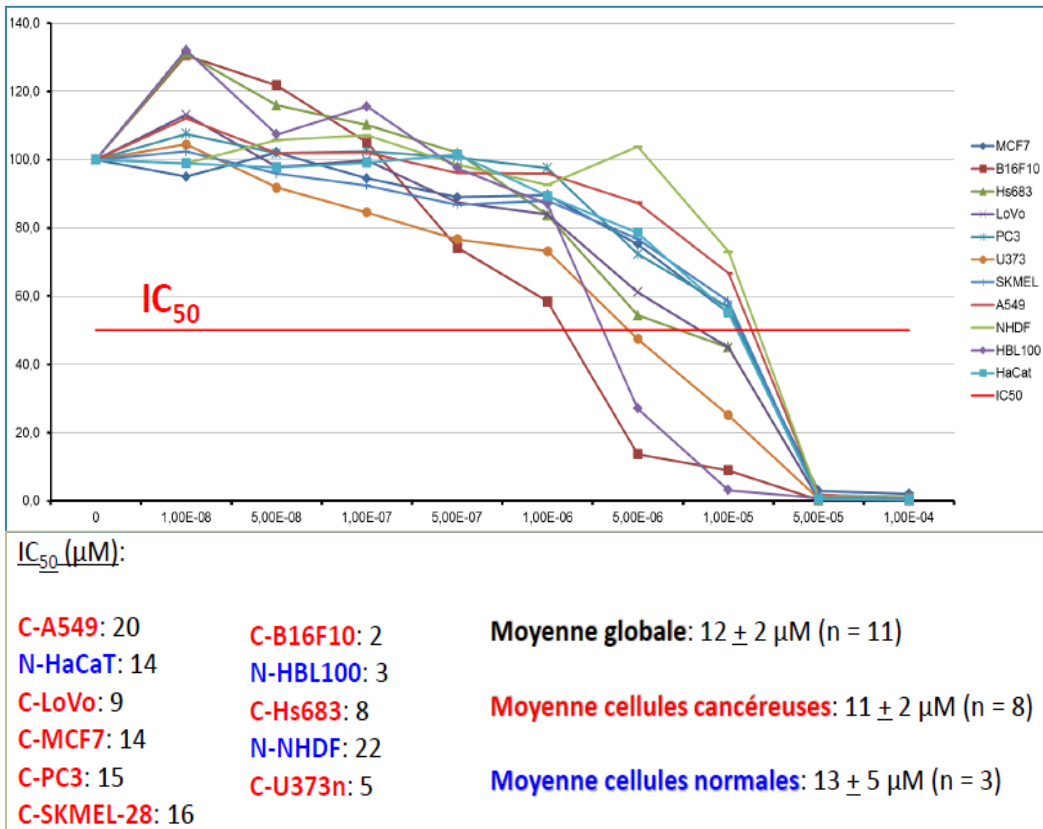


Figure 4-25 : Inhibition de la croissance cellulaire en fonction du log de la concentration après exposition à l'UA150A (72h) et IC_{50} (μM) calculées pour les différentes lignées

4.7.2 TEST DE CYTOTOXICITÉ PAR VIDEOMICROSCOPIE QUANTITATIVE (VMQ)

4.7.2.1 Méthodologie

Des analyses en vidéomicroscopie quantitative (VMQ) ont été entreprises avec l'UA150A afin d'une part, de valider l'IC₅₀ obtenue dans le test colorimétrique d'inhibition de croissance au MTT et, d'autre part, de déterminer si le composé présente des effets cytostatiques ou cytotoxiques.

Les taux de croissance globale des cellules SKMEL-28 et U373, non traitées (contrôle) vs traitées pendant 72h avec l'UA150A, respectivement à 15µM et 5 µM, ont été calculés en se basant sur les images morphologiques obtenues par VMQ (Fig. 4-26 à 4-28).

Une image est digitalisée toutes les 4 minutes, ce qui correspond à un total de 1080 images enregistrées pour chaque condition expérimentale. Chaque condition est testée en triplicate et les expériences sont réalisées en parallèle pour les cellules traitées et non traitées (contrôle).

Le taux de croissance global correspond au ratio entre le nombre moyen de cellules présentes sur chacune des 1080 images et le nombre de cellules présentes sur la première image (T=0h).

Le Global Growth Ratio (GGR) index est ensuite calculé par le rapport du ratio obtenu pour chaque condition traitée avec l'UA150A et le ratio obtenu pour le contrôle. Les valeurs de GGR obtenues en vidéomicroscopie quantitative peuvent être comparées avec les valeurs d'IC₅₀ obtenues lors des tests MTT.

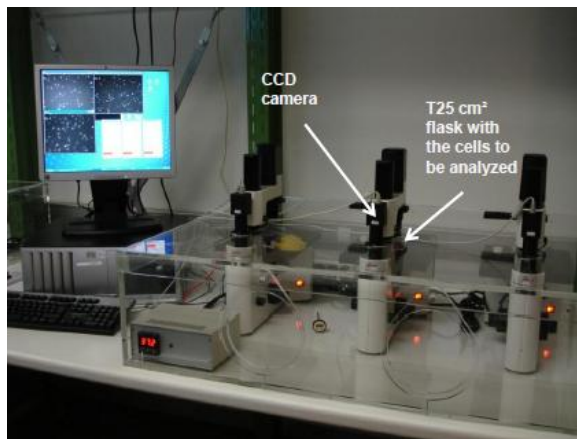


Figure 4-26 : Dispositif pour l'analyse par vidéomicroscopie quantitative (© R. Kiss)

4.7.2.2 Résultats et Discussion

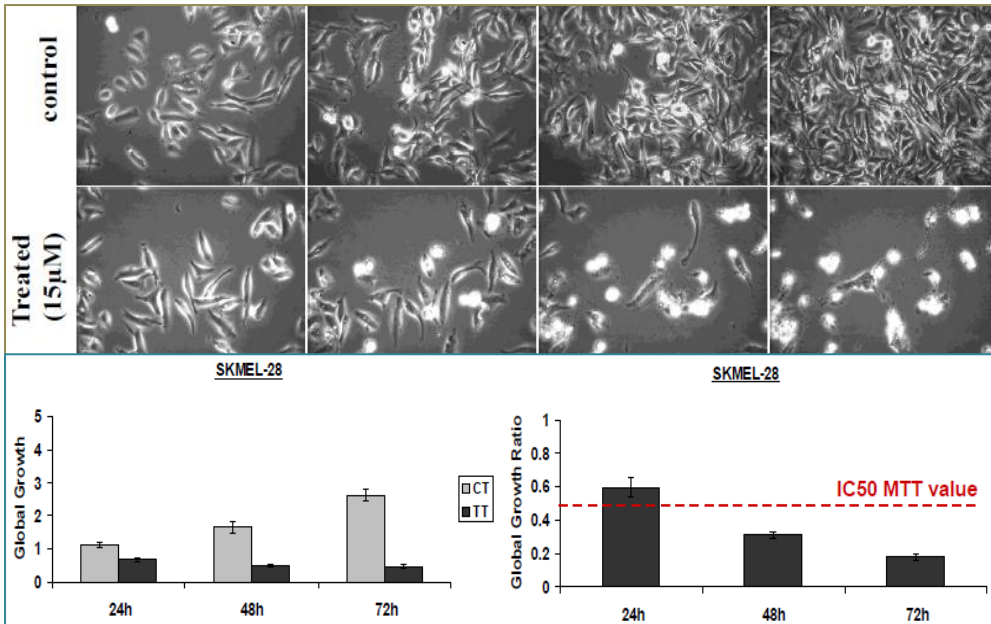


Figure 4-27 : Photos des cellules SKMEL-28 (mélanoïme humain) traitées par l'UA150A 15µM (TT) vs control à 24h, 48h et 72h (CT) et calcul du GGR

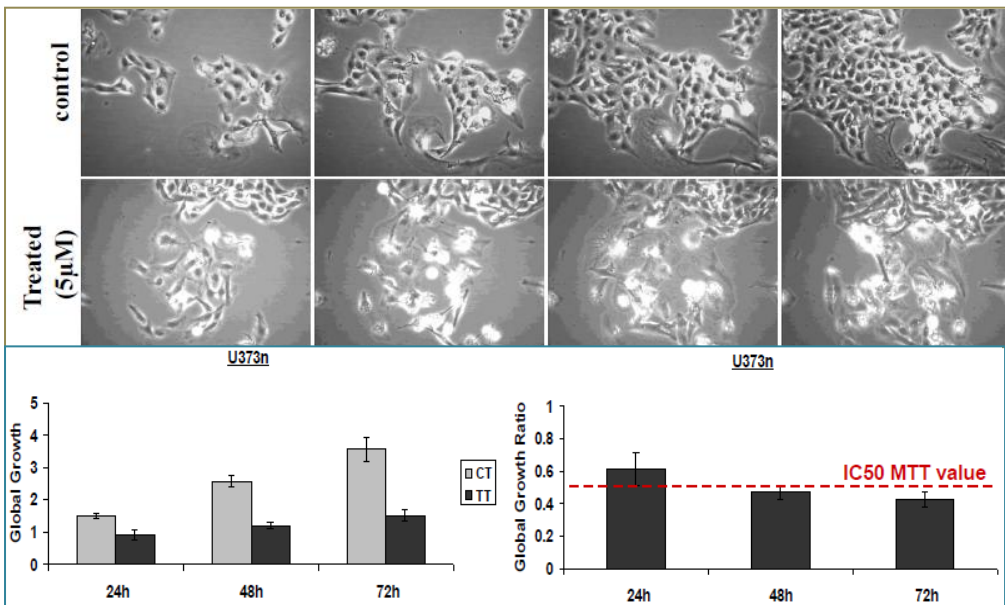


Figure 4-28 : Photos des cellules U373n (glioblastome humain) traitées par l'UA150A 5µM (TT) vs control (CT) à 24h, 48h et 72h et calcul du GGR.

Les résultats obtenus en vidéomicroscopie quantitative confirment ceux obtenus à l'aide du test colorimétrique MTT. L'UA150A s'est avéré fortement cytostatique dès le début des analyses en VMQ. Cette cytostase se traduit en fin d'expérience par des effets cytotoxiques au sein des deux lignées analysées qui montrent des niveaux relativement élevés de résistance aux stimuli pro-apoptotiques.

Les propriétés cytotoxiques élevées de l'UA150A, notamment sur certaines lignées résistantes à l'apoptose, renforcent l'intérêt de poursuivre les analyses pharmacologiques *in vitro* concernant ce produit.

Même si cette voie de recherche s'éloigne quelque peu de notre objectif de départ, à savoir la recherche de nouveaux antipaludiques, elle pourrait cependant constituer une voie alternative prometteuse pour la valorisation de nos travaux.

Les potentialités anticancéreuses d'autres lactones sesquiterpéniques, notamment de type germacranolide/mélampolide ont été mises en évidence dans la littérature [Rungeler et al., 1999 ; Rivero et al., 2003]. Certaines sont en développement voire en étude clinique [Ghantous et al., 2010]. On retiendra en particulier les propriétés cytotoxiques du parthénolide (extrait notamment de la Grande Camomille – *Tanacetum parthenium*) induisant l'apoptose sur différentes lignées de cellules cancéreuses et qui interagit avec les microtubules lors du processus de division cellulaire [Miglietta et al., 2004; Anderson et al., 2008 ; Wyrebska et al., 2012]. Un germacranolide, de structure assez proche de l'UA150A, le costunolide, a également montré des propriétés pro-apoptotiques sur cellules cancéreuses. Les propriétés cytotoxiques de ce composé résulte également d'une interaction avec les microtubules [Yang et al., 2011; Bocca et al., 2004].

4.8 *Dicoma tomentosa* : Discussion générale, conclusion et perspectives

Les tests *in vitro* menés sur différents extraits de *D. tomentosa* ont confirmé le potentiel antiplasmodial prometteur de cette plante. L'activité détectée lors de nos investigations sur ce nouveau lot récolté en octobre 2008 s'est même révélée meilleure qu'avec l'échantillon de 2007 utilisé lors du screening antiplasmodial dans le chapitre précédent. Ce dernier avait dû être collecté chez un herboriste et avait peut-être souffert d'une conservation trop longue et/ou dans de mauvaises conditions.

L'activité marquée de différents extraits de *D. tomentosa* sur souches CQ-S et CQ-R de *P. falciparum* valide l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle pour la prise en charge du paludisme. En effet, la découverte de la très haute activité de son principe actif majoritaire ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$), soluble au moins partiellement dans l'eau, confirme en effet le potentiel antipaludique des préparations traditionnelles confectionnées à partir de cette plante.

Cependant, la sélectivité modérée observée lors des tests de cytotoxicité devrait amener à une certaine prudence quant à l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle, surtout en cas d'usage chronique (ce qui est cependant rarement le cas pour le paludisme). Comme le laissent présager les données recueillies lors des études ethnobotaniques, cette plante doit en tout cas être formellement proscrite chez la femme enceinte.

De surcroît, la génotoxicité détectée dans le modèle utilisé, aussi bien avec différents extraits qu'avec le principe actif majoritaire de la plante, pousserait plutôt à déconseiller actuellement l'usage de cette plante au potentiel antipaludique pourtant réel.

Il est donc malheureusement peu probable d'envisager le développement d'un MTA à partir de *Dicoma tomentosa* Cass.

Concernant le principe actif majoritaire, l'activité génotoxique détectée contrarie également le développement d'un médicament antipaludique basé sur cette molécule; il n'est cependant pas exclu que des analogues structuraux s'avèrent plus intéressants et moins toxiques.

Toutefois, l'activité cytotoxique prometteuse de l'UA150A sur cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose, mise en évidence lors des tests en VMQ, autoriserait de poursuivre des investigations dans le domaine antitumoral avec ce composé.

4.9 Bibliographie (4)

Anderson, K.N. and Bejcek, B.E.: Parthenolide Induces Apoptosis in Glioblastomas Without Affecting NF- κ B. *J Pharmacol Sci* 2008, 2106: 318 – 320 .

Aqil M, Akinniyi J, Ndahi NP: Flavonoids from *Dicoma tomentosa*. *Global J Pure Appl Sci* 1998, 4:135–137.

Aqil M, Khan IZ: Dicomatin - a new flavone glycoside from *Dicoma tomentosa*. *Global J Pure Appl Sci* 1999, 5:357–358.

Aqil M, Khan IZ: Three flavone glycosides from *Dicoma tomentosa* Cass. *Ultra Sci Phys Sci* 1999, 11:378–380.

Aqil M, Khan IZ, Dimari GA: A new flavone glycoside from *Dicoma tomentosa*. *Global J Pure Appl Sci* 2001, 7:273–275.

Batista R, Silva Ade J Jr, de Oliveira AB: Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* 2009, 14:3037–3072.

Becker JW, van der Merwe MM, van Brummelen AC, Pillay P, Crampton BG, Mmutlane EM, Parkinson C, van Heerden FR, Crouch NR, Smith PJ, Mancama DT, Maharaj VJ: *In vitro* anti-plasmodial activity of *Dicoma anomala* subsp. *gerrardii* (Asteraceae): identification of its main active constituent, structure-activity relationship studies and gene expression profiling. *Malar J* 2011, 10:295.

Bero J, Frédéric M, Quetin-Leclercq J: Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol* 2009, 61:1401–1433.

Bero J, Quetin-Leclercq J: Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria. *Planta Med* 2011, 77:631–640.

Bilia, A.R, Melillo de Malgalhaes, P., Bergonzi, M.C., Vincieri, F.F.: Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine* 2006 13, 487–493

Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F., Miglietta, A. : A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. *Chemico-Biological Interactions* 2004, 147: 79–86

Bohlmann F, Singh P, Jakupovic J: Naturally occurring terpene derivatives. Part 428. Germacranolides from *Dicoma tomentosa*. *Phytochem* 1982, 21:2122–2124.

Catalan CAN, Borkosky SA, Joseph-Nathan P: The secondary metabolite chemistry of the Subtribe *Gochnatiinae* (Tribe *Mutisieae*, Family *Compositae*). *Biochem Syst Ecol* 1996, 24:659–718.

Cissé Baba (Jardins du monde), 2010. Note sur l'utilisation traditionnelle de *Dicoma tomentosa*. Enquêtes réalisées au cours des formations à la santé, Avril 2010.

Deharo E, Ginsburg H: Analysis of additivity and synergism in the antiplasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malar J* 2011, 10(Suppl 1):S5.

Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, von Seidlein L: Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* 2010, 8:272–280.

Egan TJ: Artemisinin-resistant *P. falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiol* 2009, 4:637–639.

EMA, European Medicines Agency, Herbal Medicinal Products Committee (HMPC) : Guideline on the assessment of genotoxicity of herbal substances/preparations. May 2008, London Doc. Ref. EMA/HMPC/107079/2007

Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A: Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 2010, 15:3135–3170.

Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S: Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:509–520

Frédérich M, Jacquier MJ, Thepenier P, De Mol P, Tits M, Philippe G, Delaude C, Angenot L, Zeches-Hanrot M: Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *J Nat Prod* 2002, 65:1381–1386.

Frédérich M, Tits M, Goffin E, Philippe G, Grellier P, De Mol P, Hayette MP, Angenot L. : *In vitro* and *in vivo* antimalarial properties of isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos usambarensis*. *Planta Med* 2004, 70:520–525.

Frédérich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Megalizzi, V., Angenot, L., Kiss, R. : *In vitro* anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest. *Planta Med* 2009, 75:1634-1637.

Ganfou H, Bero J, Tchinda AT, Gbaguidi F, Gbenou J, Moudachirou M, Frederich M, Quetin-Leclercq J: Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. *J Ethnopharmacol* 2012, 141:411-417

Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N.A., Darwiche, N.: What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today* 2010, 15: 668-678.

Ginsburg H, Deharo E: A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malar J* 2011, 10(Suppl. 1):S1.

Goffin E, Ziemons E, De Mol P, Do Céude Madureira M, Martins AP, Proença Cunha A, Philippe G, Tits M, Angenot L, Frederich M: *In vitro* antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. *Planta Med* 2002, 68:543–545.

Graz B, Willcox M, Diakite C, Falquet J, Dackuo F, Sidibe O, Giani S, Diallo D: *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010, 104:33–41.

Guinko Sita, 1988. Connaissance des arbres et arbustes du Burkina Faso par les langues vernaculaires, Université de Ouagadougou

Hayot, C., Debeir, O., Van Ham, P., Van Damme, M., Kiss, R., Decaestecker, C.: Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 211: 30–40.

Jansen O, Angenot L, Tits M, Nicolas JP, De Mol P, Nikiéma JB, Frédéric M: Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties. *J Ethnopharmacol* 2010, 130:143–150.

Jansen O, Frédéric M, Tits M, Angenot L, Cousineau S, Bessot L, Crunet C, Nicolas JP: Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso: sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues. *Ethnopharmacologia* 2008, 41:74–78.

Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R: Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem* 2009, 17:3229–3256.

Kenmogne M, Prost E, Harakat D, Jacquier MJ, Frédéric M, Sondengam LB, Zeches M, Waffo-Teguo P: Five labdane diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiacum*. *Phytochem* 2006, 67:433–443.

Krishna V, Natani K, Singh P: Oxygenated germacranolides from *Compositae* and their taxonomic significance. *J Indian Chem Soc* 2003, 80:971–977.

Le Bourgeois Thomas, Merlier Henri : *Adventrop : Les adventices d'Afrique soudano-sahélienne* (1995), Editions Quae, 640 pages (p.296-8) ISBN:2876142112

Liu, W., Di Giorgio, C., Lamidi, C., Elias, R., Ollivier, E., De Méo, M.P, 2011, Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 176–183.

Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ: Parasite lactate-dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug-sensitivity. *AmJ Trop Med Hyg* 1993, 48:739–741.

Mehta R, Arora OP, Mehta M: Chemical investigation of some Rajasthan desert plants. *Indian J Chem Sect B* 1981, 20B:834.

Merfort, I.: Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A* 2002, 967: 115–130

Miglietta, A., Bozzo, F., Gabriel, L., Bocca, C.: Microtubule-interfering activity of parthenolide. *Chemico-Biological Interactions* 2004, 149: 165–173

Mustafayeva, K., Di Giorgio, C., Elias, R., Kerimov, Y., Ollivier, E., De Méo, M., 2010. DNA Damaging, Mutagenic, and Clastogenic Activities of Gentiopicroside Isolated from *Cephalaria kotschyi* Roots. *J. Nat. Prod.*, 73, 99–103

Nacoulma Odile (1996) Thèse Docteur ès Sciences Naturelles : Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso, Cas du plateau central, Univ. Ouagadougou, Burkina Faso.

Nogueira CR, Lopes LMX: Antiplasmodial Natural Products. *Molecules* 2011, 16:2146–2190.

OCDE : Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 : Effets sur la santé, n°487 : Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères (2004), ISSN : 2074-5842

Phillipson DJ, Wright CW: Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J Ethnopharmacol* 1991, 32:155–165.

Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Moo CI, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ, Anderson TJC, Nosten F: Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 2012, 379 (9830) :1960-1966

Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M: Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4:727–740.

Prelude, banque de données consultée en mars 2010 à partir de :

[http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=prelude2008&action=preludeSymptomes&lettre=n&med=h&symptome=H\(201\)&step=2](http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=prelude2008&action=preludeSymptomes&lettre=n&med=h&symptome=H(201)&step=2)

[http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=prelude2008&action=preludeSymptomes&lettre=e&med=h&symptome=H\(002\)&step=2](http://www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=prelude2008&action=preludeSymptomes&lettre=e&med=h&symptome=H(002)&step=2)

Rasoanaivo P, Wright C, Willcox M, Gilbert B: Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J* 2011, 10(Suppl 1):S4.

Rivero, J., Quintana, J., Eiroa, JL., Lopez, M., Triana J., Bermejo J., Estevez, F. : Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid :eukemia cells. *European Journal of Pharmacology* 2003, 482: 77– 84

Robert S, Baccelli C, Devel P, Dogné JM, Quetin-Leclercq J: Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. *J Ethnopharmacol* 2010, 128:641–648.

Rungeler, P., Castro, V., Mora, G., Goren, N., Vichnewski, W., Pahl, HL., Merfort, I., Schmidt, T. : Inhibition of Transcription Factor NF- κ B by Sesquiterpene Lactones: a Proposed Molecular Mechanism of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999) 7, 2343-2352

Schmidt TJ, Nour AMM, Khalid SA, Kaiser M, Brun R: Quantitative structure antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules* 2009, 14:2062–2076.

Scotti MT, Fernandes MB, Ferreira MJP, Emerenciano VP: Quantitative structure activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* 2007, 15:2927–2934.

Traore, F., Gasquet, M. Laget, M., Guiraud, H., Di Giorgio, C., Azas, N., Doumbo, O., Timon-David P. Toxicity and Genotoxicity of Antimalarial Alkaloid Rich Extracts Derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*. *Phytotherapy research* 2000, 14: 608–611

Willcox M, Burford G, Bodeker G: An overview of ethnobotanical studies on plants used for the treatment of malaria. In *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. Boca Raton: CRC Press; Willcox M, Bodeker G, Rasoanaivo P; 2004:187–197.

Willcox M, Bodeker G: Traditional herbal medicine for malaria. *Br Med J* 2004, 329:1156–1159.

WHO: Traditional medicine Fact sheet N°134. Geneva: WHO Media centre; 2008.

WHO: Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization; 2010a.

WHO: Guidelines on registration of traditional medicines in the WHO African region. Brazzaville: WHO Regional Office for Africa; 2010b.

Willcox M, Graz B, Falquet J, Diakite C, Giani S, Diallo D: A "reverse pharmacology" approach for developing an antimalarial phytomedicine. *Malar J* 2011, 10(suppl1):S8.

Wyrebska, A, Szymanski, J, Gach, K., Piekilna, J., Koszuk, J., Janecki, T., Janecka, A. : Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Molecular Biology Reports* (2012) DOI 10.1007/s11033-012-2215-6

Yang , YI., Kim, JH., Lee, KT., Choi, JH.: Costunolide induces apoptosis in platinum-resistant human ovarian cancer cells by generating reactive oxygen species. *Gynecologic Oncology* 2011, 123: 588–596

Yerbanga RS, Lucantoni L, Lupidi G, Dori GU, Tepongning NR, Nikiéma JB, Esposito F, Habluetzel A: Antimalarial plant remedies from Burkina Faso: Their potential for prophylactic use. *J Ethnopharmacol* 2012, 140:255–260.

Zdero C, Bohlmann F: Sesquiterpene lactones from *Dicoma* species. *Phytochem* 1990, 29:183–187.

5 CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE *GARDENIA SOKOTENSIS* Hutch. (RUBIACEAE)

5.1 Avant-propos

Nous débuterons ce chapitre en présentant les quelques **données disponibles dans la littérature** sur le *Gardenia sokotensis* Hutch.

Nous nous attacherons ensuite à détailler les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés antiplasmodiales de différents extraits préparés à partir d'un échantillon de feuilles de *G. sokotensis*. Le fractionnement bioguidé de l'extrait au dichlorométhane a conduit à l'isolement d'un nouveau triterpène de type 3,4-seco-cycloartane modérément actif sur *P. falciparum*. La cytotoxicité de l'extrait et des produits isolés a également été évaluée. Cette partie est présentée dans un projet d'article rédigé en anglais et intitulé : « **Antiplasmodial activity of *Gardenia sokotensis* Hutch and isolation of a new moderately active 3,4-seco-cycloartane** », qui sera soumis d'ici peu à un éditeur scientifique.

5.2 *Gardenia sokotensis* Hutch.

5.2.1 DESCRIPTION BOTANIQUE

- CLASSIFICATION [Arbonnier, 2002]

- Famille : *RUBIACEAE*

- Synonymes :

= *G. mossica* A. Chev.

= *Randia lucida* A. Chev.

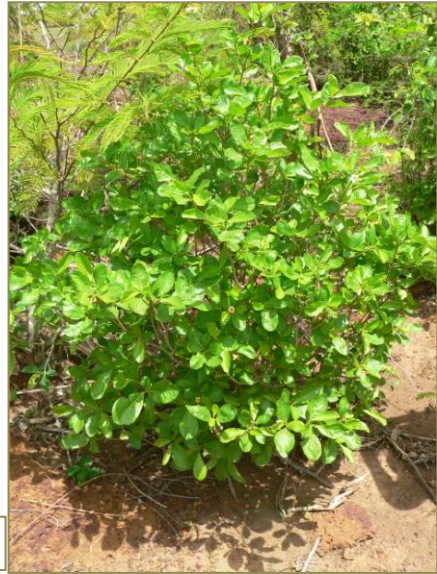


Figure 5-1 : *G. sokotensis*, vue générale

- MORPHOLOGIE [Arbonnier, 2002]

Arbuste plus ou moins buissonnant de 1 – 2,5m de haut à fût très court, à cime irrégulière et ouverte, avec feuilles regroupées en touffes au bout de courtes branches. Ecorce lisse, jaunâtre à tranche jaunâtre. **Rameaux** glabres et paraissant gluants, courts et épais, avec le bourgeon terminal souvent englué d'une goutte de résine verdâtre. **Feuilles** opposées et verticillées par trois, glabres sur les 2 faces, les jeunes feuilles paraissant gluantes, obovales oblongues ou elliptiques, de taille



Figure 5-2 : *G. sokotensis*, fleur et feuilles

très variable (les plus petites étant sur les rameaux fleuris, les plus grandes sur les rejets ou les gourmands), de (2-)4-11 x (1-)2-5 cm, à sommet arrondi ou obtus, à base en coin. **Pétiole** un peu pubescent, devenant glabre, 1-2mm de long. **Nervure** pennée, à 6-15 paires de nervures plus ou moins saillantes, se raccordant pour la plupart vers le sommet. Nervilles plus ou moins parallèles.

Inflorescence : fleur solitaire ou par fascicule de 2-4, à l'aisselle des feuilles sur les jeunes rameaux.

Fleur blanche ou crème virant au brun, pédicellée (pédicelle grêle de 3-12 mm long), odorante, avec un calice en tube à 5(-6) lobes linéaires (7-8mm de long), à corolle en cloche apparaissant plus ou moins gluante extérieurement avec environ 5 lobes elliptiques arrondis (4-5mm de long et de large), de 1-1,5cm de



Figure 5-3 : *G. sokotensis*, fleur et feuilles

long. **Fruit** Ovoïde ou globuleux, lisse, de 0,7x1cm, portant au sommet des pointes correspondant aux lobes du calice desséché, à coque brun clair et fine à maturité, contenant de nombreuses graines. Floraison en début de saison des pluies.



Figure 5-4 : *G. sokotensis*, fruit (haut) et bourgeon terminal résineux (droite)

5.2.2 REPARTITION GEOGRAPHIQUE [Arbonnier, 2002]

Habitat : Savanes sahélo-soudaniennes à soudano-guinéennes, généralement sur sols secs, cuirasses, roches, graviers, talus, termitières.

Répartition : du Sénégal au Cameroun. Distribution irrégulière, localement commune

5.2.3 NOMS VERNACULAIRES

Langue mooré : Tang-ra-kweenga [Nacoulma, 1996] ; Tang rakoènga ; Tang-rambrezûuda [Guinko, 1988]

5.2.4 UTILISATIONS TRADITIONNELLES

- Utilisée seule

Les **TIGES FEUILLÉES** sont utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour de nombreuses affections, notamment en cas d'**asthénie**, de **courbatures fébriles**, d'**états de faiblesse**, de convulsions, de céphalées, d'épilepsie, d'appendicite, de **fièvres**, de **frissons**, de **paludisme avec douleurs gastro-intestinales**, de météorisme intestinal, de vomissement, de fièvre bilieuse hématurique, d'**ictère**, de gastro-entérite, de retards staturo-pondéraux chez l'enfant [Nacoulma, 1996].

Son utilisation en cas de **fièvres** a également été rapportée par Guinko, en 1988 ; tandis qu'Arbonnier en 2002 mentionne son usage en cas de **paludisme, d'ictère et de coliques**.

D'autre part, l'équipe de Jardins du monde nous a également mentionné que la plante est disponible chez les herboristes du marché de Koudougou qui la recommandent pour soigner le **paludisme**.

Les **RACINES** de *G. sokotensis* n'ont pas du tout les mêmes indications que les tiges feuillées. Elles sont utilisées comme stimulant et aphrodisiaque en cas d'asthénie sexuelle [Nacoulma, 1996].

- Utilisée en association [Guinko, 1988]

Les TIGES FEUILLÉES de *Gardenia sokotensis*, en association avec celles de *Guiera senegalensis*, *Fadogia agrestis* et *Psorospermum senegalense* sont utilisées contre le **paludisme**. La décoction de ces plantes est utilisée en bain et en boisson.

Une décoction préparée à partir des tiges feuillées de *G. sokotensis*, *Crossopteryx febrifuga* et *Fadogia agrestis* est également utilisée pour se laver et un peu en boisson en cas d'**accès palustres avec douleurs gastro-intestinales**.

5.2.5 COMPOSITION CHIMIQUE

La composition chimique de cette plante n'a été que très peu étudiée. La littérature mentionne uniquement un screening phytochimique qui a mis en évidence la présence de triterpènes et de flavonoïdes (non identifiés) dans les feuilles de *G. sokotensis* [Traoré et al., 2006].

5.2.6 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

Hormis l'activité antiplasmodiale *in vitro* détectée lors de nos travaux pour les extraits CH₂Cl₂ et MeOH des feuilles de *G. sokotensis* (IC₅₀ *P. falciparum* 3D7= 14,01 µg/ml ; 27,62µg/ml, respectivement) [Jansen, 2010], peu de données existent sur l'étude de propriétés pharmacologiques pour cette plante. Son potentiel antiplasmodial avait déjà été mis en évidence *in vivo* : l'extrait CH₂Cl₂/EtOH (7:3) de feuilles présente une activité intéressante sur *P. berghei* (ED 50 ≈ 115 mg/kg et 50 mg/ kg pour une des fractions) tandis que l'extrait aqueux est faiblement actif [Traoré et al., 2006]. Aucun principe actif n'a été isolé à ce jour.

5.2.7 ETUDE DE LA TOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* réalisés dans le cadre de ce travail sur des fibroblastes humains WI38 ont révélé une activité cytotoxique significative (IC₅₀ = 12,67 µg/ml) pour l'extrait brut CH₂Cl₂ obtenu à partir de feuilles de *Gardenia sokotensis* [Jansen, 2010].

Les extraits de feuilles de *G. sokotensis* ne semblent pas montrer de toxicité *in vivo* chez la souris (LD50>3000mg/kg) [Traoré et al., 2006].

5.3 “ Antiplasmodial activity of *Gardenia sokotensis* Hutch. and isolation of a new moderately active 3,4-seco-cycloartane ”

Olivia Jansen¹, A. Tchinda², A. Porcelius¹, M. Tits¹, L. Angenot¹, J-P. Nicolas³, J-B Nikiema⁴, M. Frédérick¹

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament (CIRM), Université de Liège, 1, Av. de l'Hôpital CHU-B36, B-4000 Liège, Belgium.

² Center for Studies on Medicinal Plants and Traditional Medicine, Institute of Medical Research and Medicinal Plants Studies (IMPM), PO Box 6163 Yaoundé, Cameroon

³ Association Jardins du Monde, 15, rue St Michel, 29190 Brasparts, France.

⁴ Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou, Burkina Faso

ABSTRACT :

Introduction: In the search for new antimalarial drugs, medicinal plants from traditional pharmacopeias are of particular interest to discover new antiplasmodial lead compounds as well as to consider the local valorization of standardized herbal medicines to treat malaria. *Gardenia sokotensis* is traditionally used in Burkina Faso to treat malaria and associated symptoms. The plant had already demonstrated promising *in vivo* and *in vitro* antiplasmodial activity but no active compound was identified up to now. The aim of this study was to further evaluate the antiplasmodial potential of *Gardenia sokotensis* and to proceed to a bioguided fractionation to isolate the active compounds.

Materials and methods: The antiplasmodial activity of 6 crude extracts obtained from *G. sokotensis* leaves was evaluated *in vitro* against *Plasmodium falciparum* (3D7) using the pLDH assay. Bioguided fractionation of a dichloromethane extract was performed using preparative HPLC and DCVC techniques to finally led to the isolation of 4 pure compounds. The isolated products were submitted to spectroscopic analysis (UV, MS, NMR) for identification. Their antiplasmodial and cytotoxic (WST-1 assay) properties were also evaluated in the aim to check their selectivity towards the parasite.

Results and discussion: Dichloromethane and ethylacetate extracts were the most active against *P. falciparum* (IC₅₀<15µg/ml) while aqueous extracts were found inactive (IC₅₀ > 50µg/ml). The bioguided fractionation showed that the antiplasmodial activity of *Gardenia sokotensis* cannot be attributed to one major single compound with a high activity but results from the additive/synergistic activity of many compounds in the plant. One of the 4 isolated compounds was identified as a new 3,4-seco-cycloartane triterpene. This compound, as well as the other pure compounds, exhibited antiplasmodial activity in a similar level to the initial dichloromethane extract, what can be considered as quite moderate for pure substances. A significant cytotoxicity was also observed for the extract and some of the isolated compounds. This study is the first report of the presence of cycloartane derivatives in *Gardenia sokotensis*.

Conclusion: *Gardenia sokotensis* confirmed its promising antiplasmodial activity, which was found to result from the combined activity of several products. However, active extracts as well as the pure compounds were also found cytotoxic and weakly (or not) selective. Regarding to the traditional use of the plant, more studies are needed to assess the clinical efficacy and the safe use of this plant to treat malaria by the local population.

Key words : *Gardenia*, antiplasmodial, Burkina Faso, cycloartane, Rubiaceae

5.3.1 INTRODUCTION

Malaria is a parasitic disease caused by *Plasmodium sp.* and transmitted by *Anopheles* mosquitoes. According to the World Malaria Report [WHO, 2011], 216 million episodes of malaria and 655 000 malaria deaths were estimated around the world in 2010. The majority of deaths occurred in the African region (91%) and approximately 86% of malaria deaths were children under 5 years. Although the estimated incidence of malaria has decreased by 17% globally between 2000 and 2010 while malaria specific mortality rates have declined by 25% into the same period, malaria remains a major public health problem in southern countries affected by this disease and still has a serious socio-economic impact. Moreover, a recent study claimed that malaria-related mortality reported by the WHO would be underestimated [Murray et al., 2012].

In the global effort to fight the disease, the World Health Organization (WHO) promotes ACT (artemisinin-based combination therapies) as the reference drugs for the treatment of uncomplicated *falciparum malaria* in order to contain the resistance risk [WHO, 2010a]. However, resistance of the parasite towards artemisinin-related drugs has been recently described in Asia [Egan, 2009; Dondorp, 2010; Phyo, 2012].

The vegetal kingdom remains a good source of pharmacologically active compounds and especially antiplasmodial agents as reviewed recently by several authors [Batista et al., 2009; Bero et al., 2009; Bero and Leclercq, 2011, Kaur et al., 2009; Nogueira and Lopez, 2011].

In the search for new antimalarial drugs, medicinal plants from traditional pharmacopeias are of particular interest to discover new antiplasmodial lead compounds as well as to consider the valorization of antimalarial standardized herbal medicines whose efficacy and safety have been demonstrated in laboratory and clinical investigations [Ginsburg and Deharo, 2011]. Indeed there is now evidence that some whole plant extracts can be more active than single compounds, as a result of synergy and positive interactions between different constituents in the extracts, compared to a single product and can constitute a "polytherapy" by itself [Rasoanaivo et al., 2011 ; Deharo and Ginsburg, 2011]. Better knowledge of plants traditionally used against malaria in the affected countries and regional valorization of traditional remedies in improved traditional medicines (ITM) could lead to effective, standardized, available and affordable therapeutics for the management of malaria by local populations, when modern

drugs are unavailable [Willcox et al., 2011]. At the other hand, the WHO encourages the study of plants from traditional pharmacopeias to fight some main diseases such as malaria [WHO, 2010b].

Gardenia sokotensis is a plant from the *Rubiaceae* family growing in West Africa. It is found as a shrub with an irregular repartition but it could be common in some areas [Arbonnier, 2002]. Called "Tang-ra-kweenga" in the local language (Mooré), the decoction of the leaves is traditionally used in Burkina Faso to treat malaria and associated symptoms as fevers, icterus and gastro intestinal disorders [Nacoulma, 2006; Arbonnier, 2002]. The plant is also known for its benefits to fortify weak children. The leaves of *G. sokotensis* had showed some *in vivo* antiplasmodial properties against *Plasmodium berghei* [Traore et al. 2006], especially for a dichloromethane/ethanol extract, while the aqueous extract was less active. The same authors detected the presence of triterpenes and flavonoids in the leaves but no compound was precisely identified. The plant seemed denied of any toxicity in mouse ($LD_{50} > 3000 \text{ mg/kg}$, p.o). Then, in a previous antiplasmodial screening [Jansen et al, 2010], the promising activity of the plant was also shown by our team *in vitro* against *P. falciparum* ($IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$ for the dichloromethane extract). In the same study, cytotoxic activity against human fibroblasts was also detected for the antiplasmodial extracts.

Three other *Gardenia* species have already shown antiplasmodial activity in the literature : *G. lutea* [El-Tahir et al., 1999 and Ahmed et al., 2010] and *G. urvillei* [Hnawia et al., 2011] were found to possess a strong *in vitro* activity against *P. falciparum*, while triterpenes were identified as the antiplasmodial constituents of *G. saxatilis* [Suksamrarn et al. in 2003].

The aim of the present study was to further evaluate the antiplasmodial potential of *G. sokotensis* and to perform a bio-guided fractionation to isolate and identify the active compound(s) from the plant. *In vitro* cytotoxic properties of active extract and pure compounds were also studied in order to check the selectivity of the plant and its constituents, and thereby to appreciate its safety of use.

5.3.2 MATERIALS AND METHODS

5.3.2.1 Plant material

Gardenia sokotensis leaves (400 g) were collected in Reo, province of Sanguié, Burkina Faso in September 2011. The sample was authenticated by one of us (OJ). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Laboratory of Pharmacognosy (University of Liege, Belgium) under the number 11BFOJ01. The plant material was washed and dried in a ventilated room (30°C) and then ground to a powder.

5.3.2.2 Preparation of crude extracts

Six crude extracts were prepared using different solvents: hexane, dichloromethane, ethylacetate, methanol, and cold and hot water. For each solvent, 5 g of dried plant powder were macerated with 50 ml of solvent, while being shaken for 30 minutes with a magnetic stirrer. This step was repeated twice. The preparations were filtered and evaporated under reduced pressure (or freeze-dried for the water extract). For the hot water extract, we prepared a decoction of 5 g dried plant powder in 150 ml distilled boiling water for 60 min in order to approximate the traditional preparation method. The preparation was then filtered and freeze-dried. Yields are given in **Table 5-1**.

5.3.2.3 *In vitro* antiplasmodial assays

Parasite culture

Plasmodium falciparum chloroquine-sensitive (3D7) strain, obtained from Prof Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France), was maintained in continuous culture as described previously [Frédérich et al., 2002].

Antiplasmodial assays

The *in vitro* antiplasmodial assay reproduces the erythrocytic development stage of the parasite and is based on the evaluation of the plasmodial lactate dehydrogenase (pLDH) activity [Makler et al., 1993]. The assays were performed as previously described [Kemongue et al., 2006; Jansen et al., 2012]. Briefly, *Plasmodium falciparum* culture was placed in contact with a set of eight two-fold

dilutions in the medium of each extract (or pure compound) on two columns of a 96-well microplate for 48 h (final DMSO concentration $\leq 1\%$). Parasite growth was estimated by colorimetric revelation, measuring the absorbance at 630 nm with a multiwell scanner. IC_{50} , concentration inhibiting 50% of the plasmodial growth, were calculated for each extract and isolated pure compounds. IC_{50} of artemisinin (positive control) was 6.2 ng/ml. Each sample was tested in duplicate in three independent assays ($n = 3$). In line with WHO guidelines and basic criteria for antiparasitic drug discovery [Pink et al., 2005; Fidock et al., 2004], the level of antiplasmodial effect of extracts is classified as a strong activity if IC_{50} values $< 5 \mu\text{g/ml}$ and as promising activity if $5 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$. The extract is considered as inactive when IC_{50} is $>50\mu\text{g/ml}$. A pure compound is defined as highly active when its $IC_{50} \leq 1 \mu\text{g/ml}$.

5.3.2.4 *In vitro* haemolysis assays

Haemolysis assays were conducted with the crude extracts, according to a previously described procedure [Robert et al., 2010]. Briefly, red blood cells suspensions (10% in PBS (v/v)) were incubated under agitation at room temperature for one hour with extract solutions (final extract concentration = 100 $\mu\text{g/ml}$ and DMSO $<1\%$). The mixtures were then centrifuged at room temperature for 5 min at $10,000 \times g$ and the absorbance (A) of the supernatants was measured at 550 nm with a microplate reader. The red blood cell lysis percentage (H) was determined as follows: $H = (A \text{ sample} - A \text{ PBS}) / (A \text{ Triton X-100 } 1\% - A \text{ PBS})$. The results were expressed as means \pm SD with $n = 3$.

5.3.2.5 *In vitro* cytotoxicity assays

Cells culture

Continuous culture of WI-38 normal human foetal lung fibroblasts was maintained in DMEM medium (Bio Whittaker) as described in a previous studies [Jansen et al., 2012].

Cytotoxicity assays and selectivity index

The cytotoxicity assays was performed as described previously [Jansen et al., 2012]. Briefly, 96-well tissue culture microplates (Micro Test-96, Falcon, Becton-Dickinson) were seeded with WI-38 cells. After 24 h incubation, cells were treated with six

dilutions of crude extracts or pure compounds in culture medium (final DMSO concentration $\leq 1\%$). After 48 h incubation, cell viability was determined using WST-1 (Roche Biomolecular) tetrazolium salt and reading absorbance at 450 nm with a scanning multiwell spectrophotometer after about a one hour wait. The absorbance directly correlates to the viable cell number. Cytotoxic IC_{50} were calculated. Each condition was reproduced in triplicate and each set of tests was performed twice.

The selectivity index (SI) value allows the evaluation of the selective activity of the extracts/pure compound against the parasite compared to its toxicity for human cells. The SI value is calculated as the ratio between cytotoxic IC_{50} values and antiplasmodial IC_{50} values.

5.3.2.6 Bioguided fractionation

Extraction

Gardenia sokotensis leaves powder (100g) was first percolated with 2.5 l of hexane to give 5,4g of extract (**GSH**), showing a resinous aspect and containing mostly fatty compounds. The remaining vegetal material was then percolated with 2.5 l of dichloromethane to obtain 5,6g of “defatted” dichloromethane extract from *G. sokotensis* (**GSD**).

TLC analysis

Extracts, fractions and pure compounds were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on Si_{60} silica gel plate (Merck) using dichloromethane-methanol (95:5 and 90:10) as the mobile phase. The plates were observed under UV light (254 and 366 nm) and then revealed by spraying of sulphuric vanillin reagent (2% in ethanol (w/v)) and heating at 105°C for 10 min for the analysis of terpenes.

Preparative HPLC

A first fractionation was performed using a normal phase preparative HPLC system: 1,0 g of the dichloromethane extract (**GSD**) was dissolved in 11 ml of dichloromethane and filtered (0.45 μ membrane). A Lichroprep Si_{60} column (2.5x25 cm; 12–15 μ , Merck packing system) was used as the stationary phase and the

mobile phase consisted of a gradient of methanol in dichloromethane (from 0% (0') to 5% (60') methanol with an increase of 1% methanol each 10 minutes) with a flow rate of 20 ml/min (Armen pump). Fractions of 10 ml were collected (Büchi fraction collector) and separation was monitored by TLC analysis. Fractions with the same TLC profiles were assembled to finally give 13 fractions, designated F1 to F13. The 13 fractions were evaluated for their antiplasmodial activity. F8 and F10 were selected to process further fractionation.

F10 (110 mg) was submitted to a dry column vacuum chromatography (DCVC) using a normal phase system including a LiChroprep Si 60 Merck column (2.0x7.5 cm; 15-25 μ m) as mobile phase and a gradient of acetone (A) in hexane (B) (from 30% A to 100% A). A total of 26 fractions of 10ml were collected and analyzed by TLC. The fractions with the same profile were assembled to give 5 fractions from F10 (F10.1 – F10.5). F10.4 was submitted to a second DCVC process, in reversed phase, using a LiChroprep RP-18 Merck column (2.0x7.0cm; 25-45 μ m) and a gradient of acetonitrile (A) in water (B) as mobile phase (from 60% A to 100% A). A total of 17 fractions of 10 ml were obtained and assembled according to their similar TLC profile to finally give 8 fractions (F10.4.1 – F10.4.8). F10.4.2 and F10.4.6 were found as pure compounds (= **compound 1** and **compound 2**, respectively).

F8 (26 mg) was also fractionated by DCVC, using the same reversed phase system as described above for F10.4 separation. The gradient for the mobile phase was from 70% to 100% acetonitrile in water. 24 fractions of 10 ml were collected and assembled according to their TLC profiles to finally give 8 fractions F8.1 – F8.8. F8.5 and F8.7 were found to be pure compounds and named **compound 3** and **compound 4**, respectively.

The complete purification process is summarized in **Figure 5-5**.

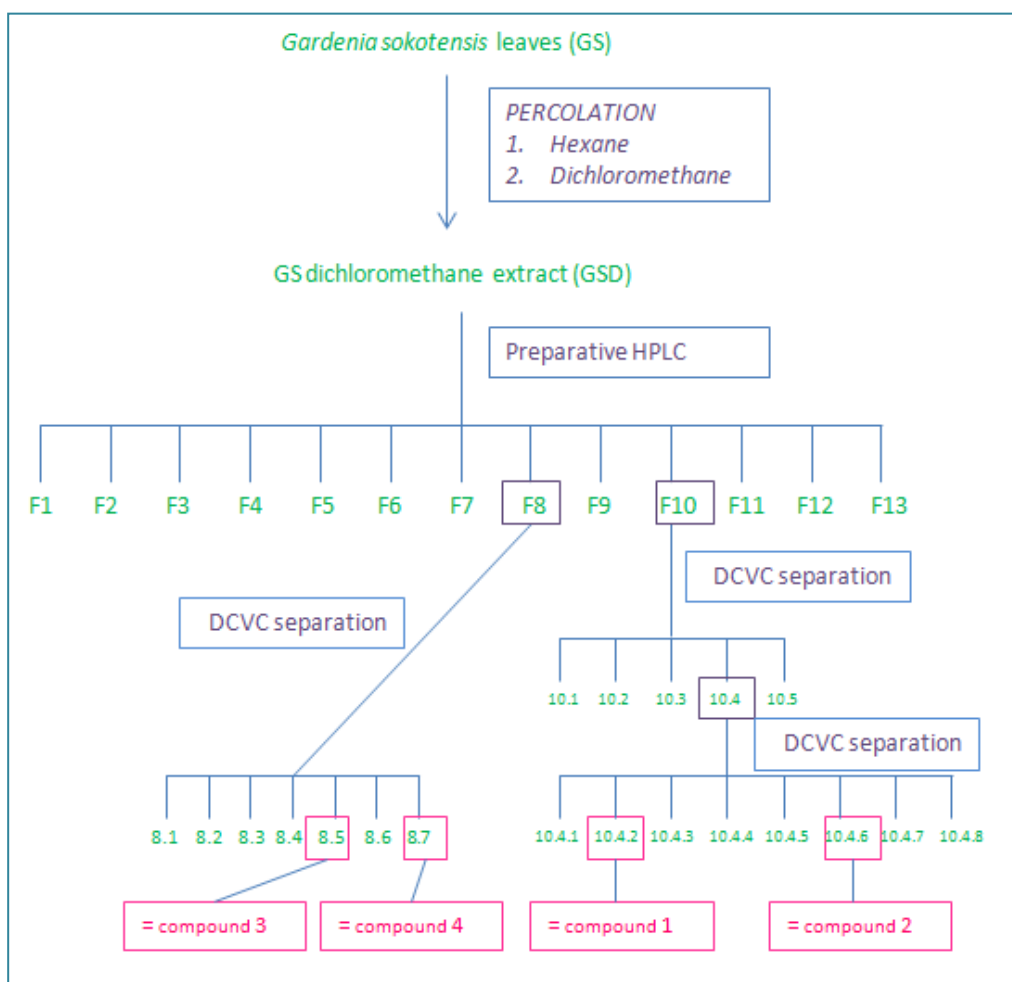
Spectroscopic analysis

The 4 purified compounds were submitted to various spectroscopic analysis, but only structure of **compound 1** has been elucidated. NMR spectra (1 H, 13C, COSY, HMBC, HSQC) were recorded in CDCl₃ with a Bruker Avance 500 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe and using TMS as the internal reference. Mass spectrometry (MS) was carried out using a micromass ESI-Q-TOF II instrument (Waters) using ESI-ionization in negative mode. The UV spectrum was obtained with a methanol solution using a Kontron Uvikon Spectrophotometer.

Biological assays

G. sokotensis extracts (**GSH** and **GSD**) as well as the preparative HPLC fractions and isolated **compounds 1-4** were tested against the 3D7 *P. falciparum* strain according to the protocol described above. The cytotoxic properties of **GSD** and **compounds 1-4** were also evaluated.

Figure 5-5: Bioguided fractionation : scheme of extraction



5.3.3 RESULTS

5.3.3.1 Antiplasmodial activity of crude extracts from *G. sokotensis*

Antiplasmodial IC₅₀ of the 6 crude extracts are given in **Table 5-1**. Dichloromethane and ethylacetate crude extracts were the most active against *P. falciparum* with IC₅₀ <15µg/ml while aqueous extracts did not show any significant antiplasmodial activity (IC₅₀ >50µg/ml).

Table 5-1 : Antiplasmodial activity of the crude extracts (*P. falciparum* 3D7) obtained from *G. sokotensis* leaves

	Yield (w/w)	IC ₅₀ ± σ (µg/ml) <i>P. falciparum</i> 3D7	Haemolysis (%)
Hexane	5.3 %	35.6 ± 5.0	< 1%
Dichloromethane	8.7 %	11.5 ± 1.9	<1%
Ethylacetate	9.7 %	13.8 ± 1.0	<1%
Methanol	21.0 %	25.4 ± 1.6	<1%
Water	22.5 %	>50	<1%
Water (decoction)	22.0 %	>50	<1%

The level of antiplasmodial activity is in accordance with the findings of our previous screening performed on a batch of *G. sokotensis* collected in July 2007 in Burkina Faso [Jansen et al., 2010].

No significant haemolysis was detected for any extracts and we can thereby state that toxic activity of *G. sokotensis* extracts against *Plasmodium* is not an indirect action towards the red blood cells but that the plant has a real effect against the parasite.

TLC profiles of the 6 crude extracts are shown in **Figure 5-6**.

One can note the presence, in the most active extracts, of at least 4 compounds giving red spots (R) in TLC with vanillin sulphuric terpenes reagent. One violet spot (V) also corresponding to (at least) one of the major terpenes was also detected in the same extracts as well as in hexane and methanol extracts. Highly apolar compounds (A) seem to be the major constituents of the moderately active hexane

extract. These resinous products are also present in smaller quantities in dichloromethane and ethylacetate extracts.

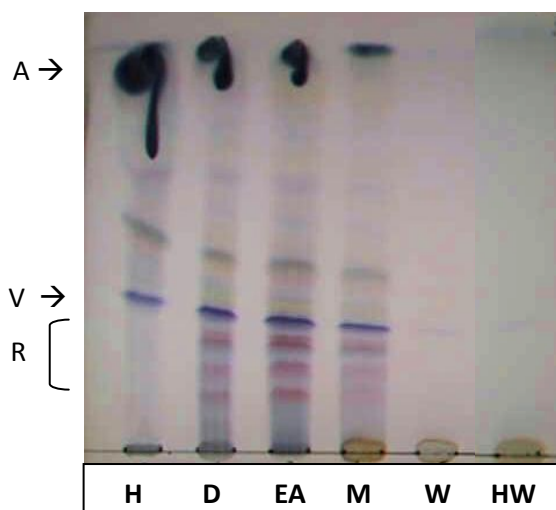


Figure 5-6: TLC profiles of *Gardenia sokotensis* crude extracts (terpenes)
(Hexane (H), Dichloromethane (D), Ethylacetate (EA), Methanol (M), Water (W), Water decoction (HW))

During our phytochemical investigations, we observed that the red TLC spots are not detected anymore when the analysis is carried out with a solution of extract prepared a few hours ago. To understand the conditions facilitating the phenomenon, we compared TLC profiles of 2 aliquots from the same dichloromethane extract solution, one was left exposed to natural light during a few hours and the other was left in the obscurity.

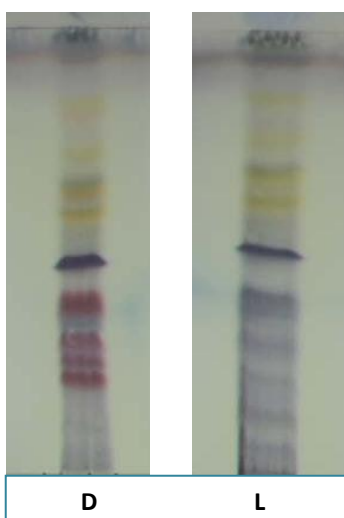


Figure 5-7: TLC profile of the same CH_2Cl_2 extract from *G. sokotensis* kept in the dark (D-left) and exposed to light (L-right) during 4 hours

The results (Fig. 5-7) clearly showed that some transformation of the compounds occurred when the extract solution was exposed to light. Compounds corresponding to these red bands are thus photosensitive products. The degradation seems to occur only in solution. These findings will be kept in mind for our further investigations on the plant, by protecting our samples from light.

To check whether this transformation can have an impact on the antiplasmodial activity, we voluntarily exposed to natural light (4h) a solution of the dichloromethane extract. The obtained “degraded extract” was submitted to the antiplasmodial assay. We however found no significant difference between the activity of the “original” and the “degraded” CH₂Cl₂ extracts (IC₅₀ = 12.8 µg/ml and 11.8 µg/ml, respectively). This indicates, either that products corresponding to “red bands” are not involved in the activity, either that the compounds resulting from their degradation are as active as the original products.

5.3.3.2 Bioguided fractionation and activity of pure compounds

As the hexane extract showed a low antiplasmodial activity in the first set of experiments, a dichloromethane extract (**GSD**) of *G. sokotensis* leaves, firstly defatted by hexane (**GSH**), has been used for the bio-guided fractionation in the aim to concentrate the active constituents. Yield was estimated to 5.4 % for **GSH** and 5.6 % for **GSD**. TLC profiles of both extracts are shown in Figure 5-8 and their antiplasmodial activities are given in table 5-2.

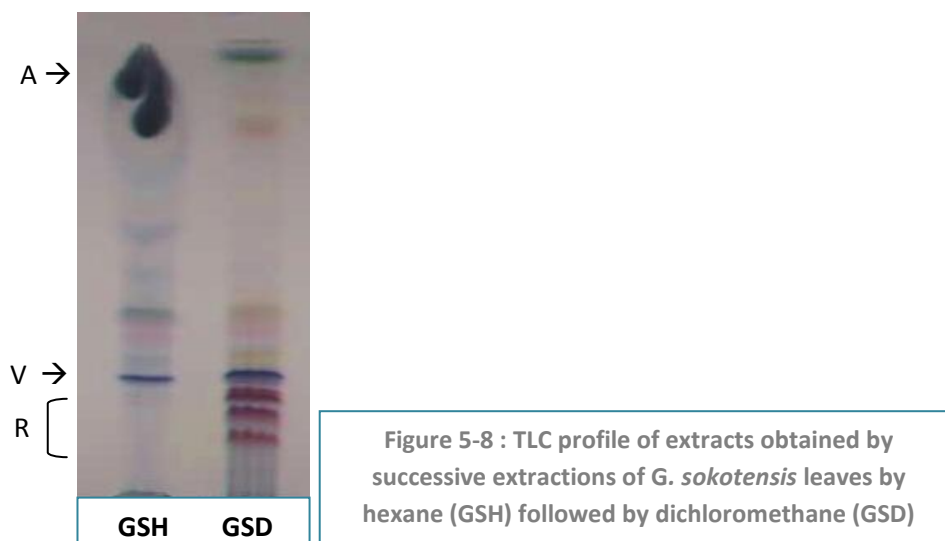


Figure 5-8 : TLC profile of extracts obtained by successive extractions of *G. sokotensis* leaves by hexane (GSH) followed by dichloromethane (GSD)

The preparative HPLC realized with the dichloromethane extract of *G. sokotensis* (**GSD**) gave 13 fractions. TLC profiles of fractions are shown in **figure 5-9** with correspondent antiplasmodial IC_{50} .

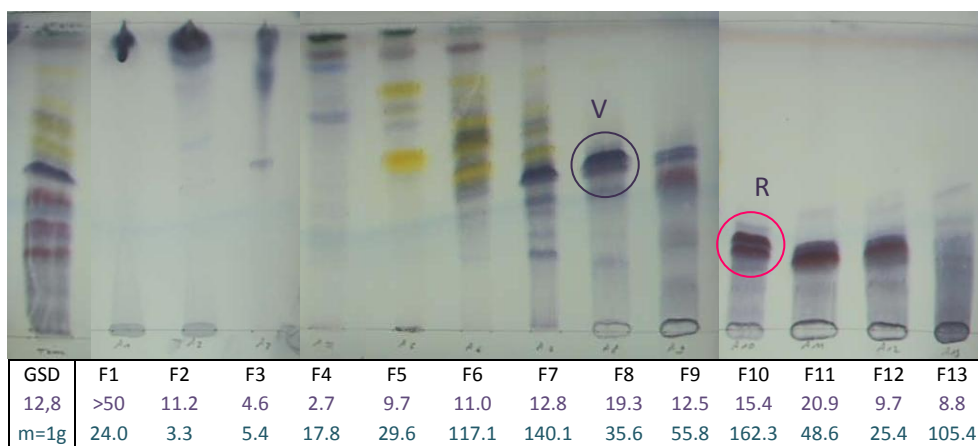


Figure 5-9: Bioguided fractionation : TLC profiles and antiplasmodial IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) of GSD extract and fractions (F1-F13) obtained from the preparative HPLC (yield are given in mg)

All fractions (except F1) were active against *P. falciparum* at the same level as the initial **GSD** extract. Only F3 and F4 were more active but obtained in very few quantities so that their quite higher activity is not sufficient to explain the activity of the whole extract. The low yield of F3 and F4 did not allow further purification of these fractions. At the other hand, the activity detected in several fractions with different TLC profiles showed that many compounds in the extract are involved in its overall antiplasmodial activity.

F10 was the most abundant fraction (160mg) and contains some major products of GSD extract, particularly some of the photosensitive terpenes giving red TLC spots, which thereby confirmed to be involved in the activity. F8 (35mg) contains other semi-purified major products of the extract, giving 2 close violet spots. These compounds are also present in F7 but in a less pure state. As indicated by the main presence of flavonoids (genines) in F5 and F6, such compounds could also be implicated in the overall activity of the extract.

Fractions F10 and F8 were submitted to DCVC separations and finally afforded 4 purified compounds named **compounds 1-4**. TLC profiles of the compounds are shown in **Figure 5-10**.

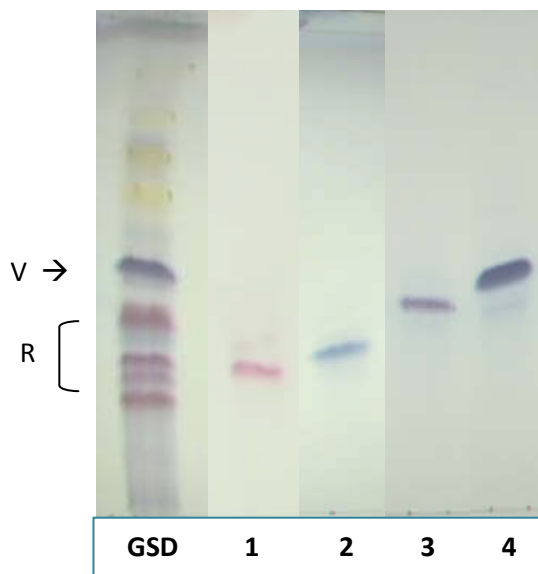


Figure 5-10: TLC of compounds isolated from *G. sokotensis*

Their antiplasmodial activities (*P.falciparum* 3D7) are given in **table 5-2**. The activity of all the compounds (except 4, a few less active) is again in the same range as the initial **GSD** extract. This activity can be considered as quite moderate for purified products.

Table 5-2 : Antiplasmodial and cytotoxic activity of extracts and pure compounds

	TLC Spot color (Rf)	IC ₅₀ 3D7 <i>P. falciparum</i> (µg/ml)	IC ₅₀ WI-38 cells (µg/ml)	SI
GS H	-	42.4 ± 0.3	ND	-
GS D	-	12.8 ± 3.3	10.7 ± 2.8	0.8
Compound 1	Red	14.9 ± 6.2	16.3 ± 0.3	1.1
Compound 2	Light blue	15.2 ± 4.2	>25	>1.6
Compound 3	Light violet	11.7 ± 4.6	>25	>2.1
Compound 4	Dark violet	26.7 ± 9.1	17.2 ± 1.8	0.6

Their cytotoxicity was also evaluated to check their selectivity towards the parasite. Cytotoxic IC_{50} values as well as selectivity index (SI) are given in **table 5-2**. The extract as well as the purified compounds also showed cytotoxic activity and were weakly or not selective.

Compound 1 has been identified from spectroscopic data (**Table 5-3**) and was found to be a new cycloartane triterpene, precisely a 3,4-seco-cycloartane (**Figure 5-11**).

This product had never been reported in the literature; however, very closely related compounds – cycloartane with ring-A being seco and ring-D with a methylfurane moiety in the side chain - have been isolated from *Gardenia lucida* [Kunert et al., 2009] and from *Gardenia obtusifolia* [Nuanyai, 2011a]. To our knowledge, such compounds are specific to this botanical genus.

Compound 1 can be defined as the 7-hydroxy-dikamaliartane C or 6-dehydroxy-dikamaliartane A or the 7-OH isomer of gardenoin G. The name of **sokotensine A** is proposed for the new **compound 1** isolated from *G. sokotensis*.

Other red bands in TLC analysis are probably close derivatives. We however cannot state about the chemical structure of the 3 non identified isolated terpenes. Triterpenes are suspected following results obtained in the MS analysis.

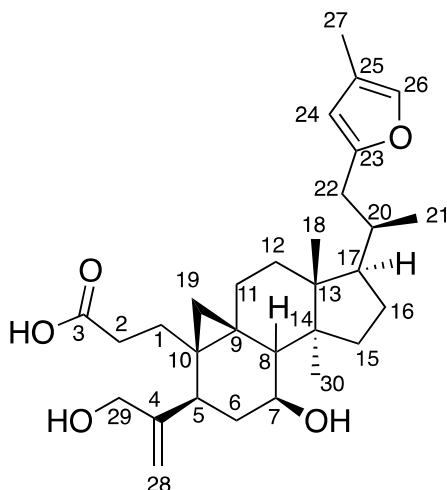


Figure 5-11 : Structure of compound 1 (sokotensine A)



Table 5-3: NMR data of compound 1 (sokotensine A) - Chemical shifts (δ) in ppm from TMS

Position	^1H	^{13}C	COSY	HMBC (C \rightarrow H)
1 (CH₂)	1.4	28.4	H1', H2, H2'	H19 H19', H2, H2'
1'	2.2		H1, H2, H2'	
2 (CH₂)	2.30	30.9	H1, H1', H2'	H1, H1'
2'	2.50		H1, H1', H2, H11'	
3 (C)	-	176.5	-	H2, H2', H1, H1'
4 (C)	-	151.5	-	H6, H29, H5, H28
5 (CH)	2.74	40.6	H6, H6'	H28, H28', H29, H6, H6', H19, H19'
6 (CH₂)	1.84	37.1	H5, H5', H7, H6'	H7, H5, H8
6'	1.22		H5, H5', H7, H6	
7 (CH)	3.58 ddd	69.6	H8, H6, H6'	H5, H6, H6', H8
8 (CH)	1.71 d	54.3	H7	H6', H7, H11, H30, H19, H19'
9 (C)	-	21.6	-	H11, H11', H8, H12, H19, H19'
10 (C)	-	28.1	-	H1, H1', H2, H2', H5, H6', H11', H8, H19, H19'
11 (CH₂)	1.4	27.2	H11', H12, H12'	H12, H12'
11'	1.93		H11, H12, H12', H2'	
12 (CH₂)	1.65 t	32	H11, H11'	H18, H11, H11'
12'	1.65 t			
13 (C)	-	45.6	-	H12, H12', H18, H30, H11, H11'
14 (C)	-	48.4	-	H7, H30, H8, H12
15 (CH₂)	1.53	37.95	H16, H16'	H30, H16, H16'
15'	1.61		H16, H16'	
16 (CH₂)	1.45	28.8	H16', H15, H15',	H15, H15', H17
16'	2.07		H16, H15, H15', H17	
17 (CH)	1.6	51.35	H16, H16', H20	H18, H21, H16, H22, H22', H12, H11
18 (CH₃)	1.02	17.3		H12, H17
19 (CH₂)	0.91 d	27.7	H19'	H1, H11, H11', H5, H8
19'	0.44 d		H19	
20 (CH)	1.75	36.2	H21, H22	H21, H17, H22, H22
21 (CH₃)	0.87	18.7	H20	H22, H22'
22 (CH₂)	2.24	35.0	H22', H20	H21, H17
22'	2.74		H22, H20	
23 (C)	-	155.3	-	H22, H26, H24
24 (CH)	5.85 s	109.0		H27, H22, H22', H26
25 (C)	-	120.4	-	H27, H26, H24
26 (CH)	7.06 s	137.4		H24, H27
27 (CH₃)	1.99	9.9		H24
28 (CH₂)	5.10 s	111.5	H29, H28'	H29, H5
28'	5.15 s		H29, H28	
29 (CH₂)	4.14 d	64.6	H28, H28'	H28, H5
29'	4.14 d			
30 (CH₃)	1.00	19.06		H15, H8

Figure 5-12: ^1H NMR spectrum of sokotensine A

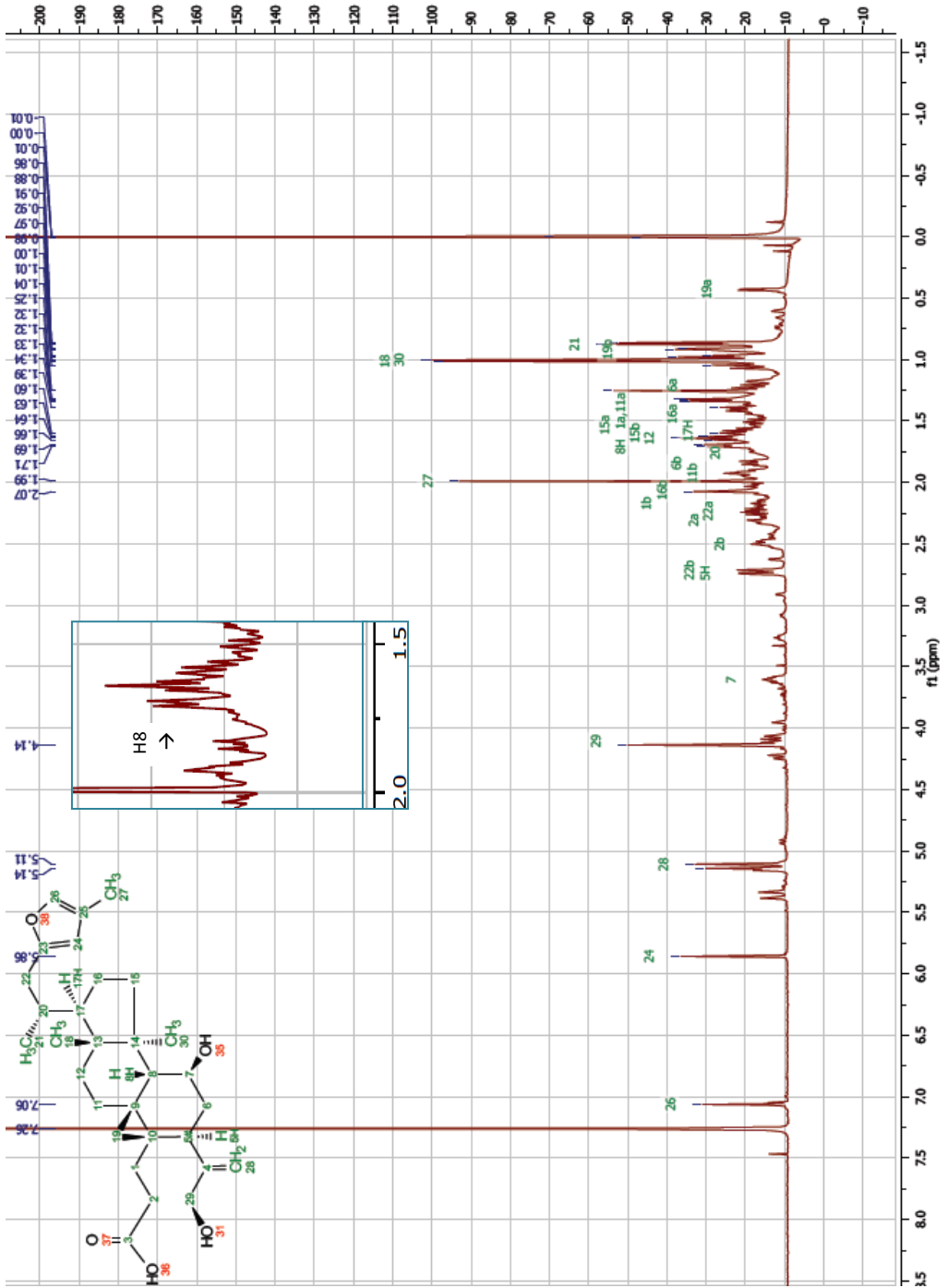
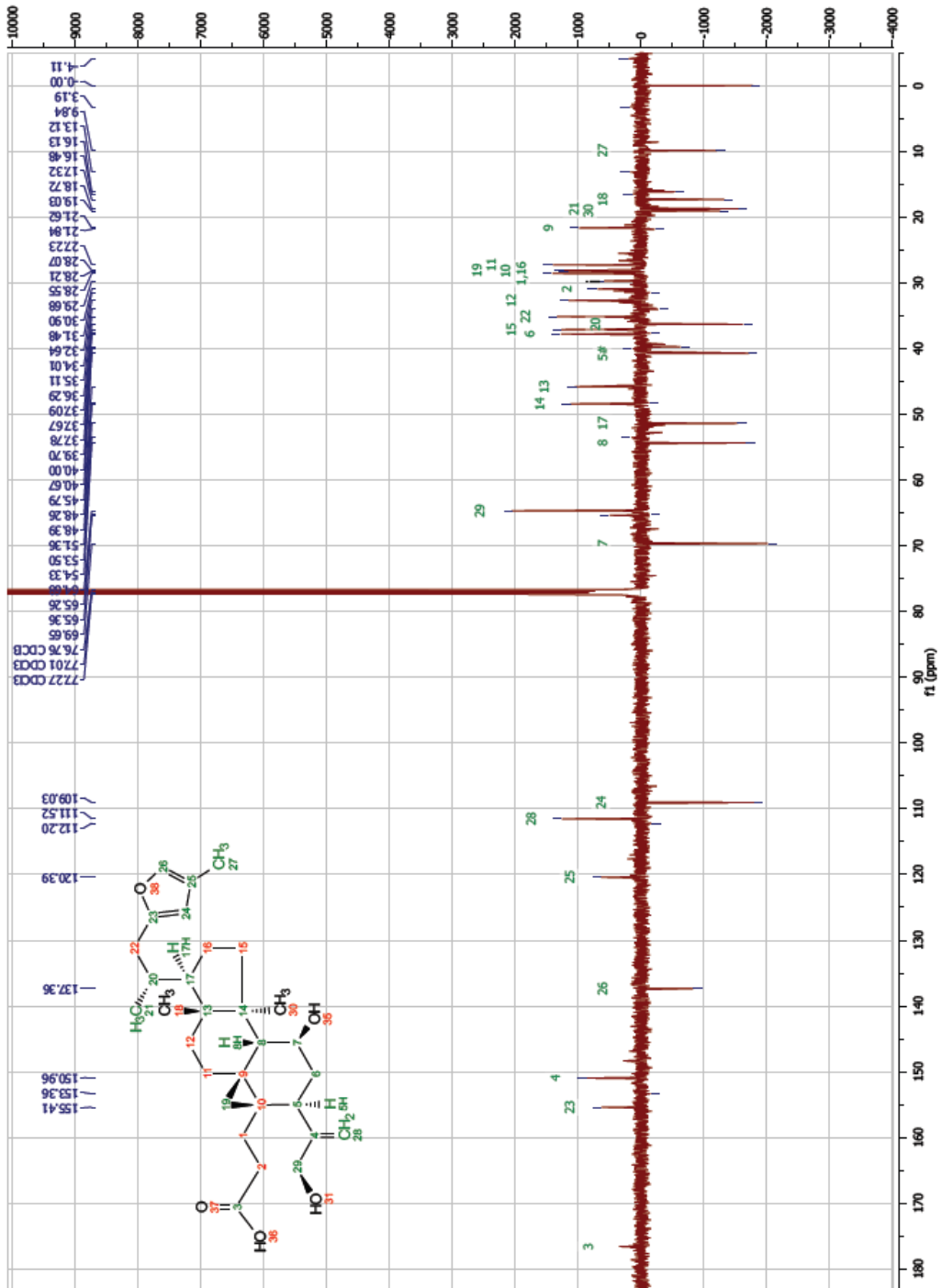


Figure 5-13: ^{13}C NMR spectrum of sokotensine A



The molecular formula of **compound 1** was established as $C_{30}H_{44}O_5$, using ESI-MS (negative mode) analysis ($[m/z]^- = 483.31 [M-H]^-$ and $967.63 [2M-H]^-$) and the UV-spectrum exhibited a maximum peak at $\lambda = 218\text{nm}$. **1** was suspected to be a **triterpene**. The ^{13}C -NMR and HSQC data showed 30 nonequivalent carbons including 4 methyls, 11 methylenes, 7 methines and 8 quaternary carbons (one carbonyl).

The ^1H -NMR spectrum displayed two doublets at $\delta(\text{H})$ 0.44 and 0.91, assigned to a CH_2 group and characteristic of the C-19 methylene protons of **cyclopropane** ring of cycloartane triterpenes; these data suggested that **compound 1** is a **cycloartane triterpenoid**.

Additionally, the NMR spectra indicated the presence of a 2,4-disubstituted **furan** ring (two singlets at $\delta(\text{H})$ 5.85 and 7.06 in ^1H spectrum and $\delta(\text{C})$ 109.0 CH, 120.4 qC, 137.4 CH, 155.3 qC) in side chain.

Complete resonance assignments led to the structure of **compound 1** as given.

Two singlets of a terminal alkene (C-28) at $\delta(\text{H})$ 5.10 and 5.15 were also observed. The HMBC correlations between H-28 and H-28' to C-5 eliminate any confusion in the attribution of C-5 and C-8 positions. C-3 was found to be oxidized to a carbonyl group, while the absence of HMBC correlation between H-29 and this CO group indicated a **seco-form of ring A** of the triterpene. C-4 was found to be substituted by $\text{CH}_2(28)$ and $\text{CH}_2\text{OH}(29)$.

The ^{13}C chemical-shift values of C-4 to C-17 were very similar compared to values observed for other seco-cycloartanes [Silva, 1997], indicating the same skeleton. The carbon signals due to C-20 to C-27 were also similar with those previously reported for the closest compounds with the methylfuran moiety [Kunert, 2009; Nuanyai, 2011a]. The overall relative configuration was deduced to be the same as previously described for seco-cycloartanes from other *Gardenia* species.

Further analysis of NMR spectra revealed that the structure of **1** was almost the same as dikamaliartane A, except for the presence of one more methylene group (δH 1.22 m, 1.84 m; δC 37.1) in place of the oxygenated methine at C-6 position. This was confirmed by the presence of a doublet signal for H-8, correlated to H-7 (integrated as single hydrogen).

5.3.4 DISCUSSION

This study is the first report of the presence of cycloartane triterpenes in *G. sokotensis* leaves and more widely the first report of an identified product from this plant. To our knowledge, (seco-)cycloartane compounds have been described in 7 other *Gardenia* species : *G. lucida* [Kunert, 2009 and Suryanarayana, 2012a,b], *G. sootepensis* [Silva et al., 1997; Nuanyai, 2009], *G. tubifera* [Reutrakul et al., 2004; Nuanyai, 2010], *G. obtusifolia* [Tuchinda et al., 2002; Nuanyai, 2011a], *G. thailandica* [Nuanyai, 2011b], *G. coronaria* [Silva et al., 1997] and *G. aubryi* [Grougnet, 2006].

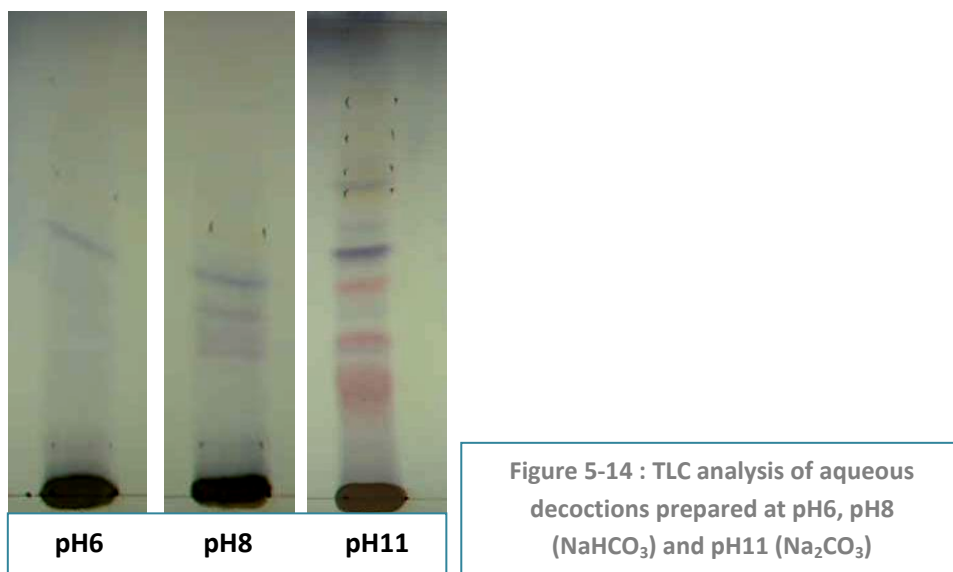
A few cycloartanes (not from *Gardenia* sp.) have already shown antiplasmodial activity in the literature [Chung et al., 2009; Bickii et al., 2007]. However the present study is the first report of antiplasmodial activity for 3,4-seco-cycloartane triterpenes.

At the other hand, some cycloartanes were already known to possess some pharmacological activities. Recent studies about dikamaliartane A, corresponding to 6-OH-sokotensine A, revealed its *in vitro* cytotoxicity (IC₅₀~30µg/ml) on human cancer cells. A therapeutic dose of 50mg/kg showed a significant anticancer activity in mouse [Patwari et al., 2012], while a dose of 30mg/kg was also found to be anticonvulsivant and to have a depressant activity on the central nervous system [Patwari et al., 2011]. The LD₅₀ was determined to 500mg/kg (mice).

Other related (seco-)cycloartanes isolated from *Gardenia* sp. have shown cytotoxic activity [Silva et al., 1997; Reutrakul, 2004; Nuanyai et al., 2009 and 2010, Tuchinda et al., 2002].

Regarding to the traditional use of *G. sokotensis*, the aqueous decoction of leaves failed to show any significant *in vitro* activity against *P. falciparum* in the present study and Traoré et al. (2006) also reported that aqueous extract was weakly active *in vivo*. However both studies detected promising antiplasmodial activity for organic extracts. These data suggest that the leaves of *G. sokotensis* contains antiplasmodial compounds which are very slightly soluble in water and could not then clearly prove the activity of traditional preparations from the plant. The active cycloartane identified in our study is indeed not very soluble in water. Its structure however shows a carboxylic acid group and thereby it can certainly be extracted in basified water.

In traditional medicine, it is usual that some ingredients as lemon juice or ashes are added to the preparation of plant remedies. The additional ingredients may modify the pH of the decoction and allow the extraction of lipophilic compounds presenting an acido-basic function, as it is the case for sokotensine A. However, we do not have precise information related to some ingredients added to traditional preparation of *Gardenia sokotensis* Hutch.



TLC analysis (Figure 5-14) confirmed that compounds corresponding to sokotensine A and other red bands can be (partly) extracted when water was basified to pH 11 (but only weakly at pH8). These findings showed that the other red TLC-spots also present a –COOH moiety and are probably closely related cycloartane triterpenes.

To check whether the extraction of these “red bands” in pH11 water can have an impact on the antiplasmodial activity, we submitted the pH11 water extract to the antiplasmodial assay. We however found no significant activity ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$) as for the pH6 water extract. The moderate activity of extracted compounds is thus not enough to get the water extract active. At the other hand, traditional preparations are often not filtered and the non extracted products are also consumed by the patient. However before to consider the valorization of this plant containing many antiplasmodial compounds acting in synergy, the clinical efficacy of standardized preparations has to be assessed.

Concerning the instability of the red TLC spots - corresponding to **sokotensine A** and presumably related seco-cycloartanes – when the solution is exposed to natural light, we found a report of the auto-oxidation of related compounds (but without the furane-ring) in chloroform solution left under natural illumination [Sy et al., 1999].

5.3.5 CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This study confirmed the promising antiplasmodial properties of *Gardenia sokotensis* leaves and demonstrated that several products are involved in the overall activity of the plant against *P. falciparum*, the causal agent of the disease. However, active extracts as well as the tested pure compounds were also cytotoxic and weakly (or not) selective. This study allowed the isolation of a new moderately 3,4-seco-cycloartane from the plant and constituted the first report of the presence of such tritrepene in *G. sokotensis*.

Sokotensine A may not be the best new lead compound to develop as an antimalarial drug because of its quite moderate antiplasmodial activity, lack of selectivity as well as its instability.

Regarding to the traditional use of *G. sokotensis*, further studies are needed to state about the clinical efficacy and the safety of use of traditional preparations obtained from this plant – widely used and reported as non toxic - to treat malaria by the local population. Genotoxic activity of plant extracts should also be checked before considering the valorization of *G. sokotensis*. Further phytochemical studies have also to be carried out in order to identify other active terpenes and flavonoids and to standardize plant samples in some of the active and/or toxic constituents.

Acknowledgments: The authors wish to thank the local team of “Jardins du monde” in Burkina Faso for their kind help in the collect of the vegetal samples and field data. Drs Bero J. and Henriët M-F. (Faculty of Pharmacy, UCL, Belgium) as well as Dr J. Widart and Mr Van Heugen JC (Department of Pharmacy, ULg) for their expertise in mass spectrometry. The authors gratefully thank the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS, grant 3.4533.10).

5.4 *Gardenia sokotensis* : Discussion, conclusion et perspectives

Au cours de nos travaux, différents extraits de feuilles de *Gardenia sokotensis*, utilisées traditionnellement contre le paludisme au Burkina Faso, ont montré une bonne activité *in vitro* sur *P. falciparum*. Lors du fractionnement bioguidé, nous avons constaté que l'activité de la plante n'est pas le fait d'un principe actif en particulier mais est liée à la présence de nombreuses substances antiplasmodiales se répartissant dans les différentes fractions. Quatre terpènes ont été isolés, dont un identifié comme un nouveau composé, appelé sokotensine A. Ce triterpène de type 3,4-seco-cycloartane a montré une activité antiplasmodiale modérée, tout comme les autres composés isolés mais non identifiés. Les flavonoïdes pourraient également être impliqués dans l'activité générale des extraits de *G. sokotensis*, vu leur présence majoritaire dans les fractions F5 et F6.

Nos résultats confirment la présence de composés antiplasmodiaux dans la plante, par ailleurs déjà montrée active *in vivo* [Traoré, 2006]. Cependant, l'usage traditionnel de la plante n'est pas si évident à valider car les extraits aqueux se sont montrés inactifs et les composés identifiés comme principes actifs se sont révélés peu solubles dans l'eau et donc peu extractibles dans les formes traditionnelles de préparation. L'extraction des PA dans le décocté peut toutefois être améliorée si l'eau est alcalinisée à pH 10-11. Nous n'avons cependant pas relevé de données relatives à l'ajout d'ingrédients ¹- capables de modifier le pH des préparations traditionnelles pour cette plante en particulier.

Malheureusement, tant les extraits actifs que les composés isolés ont montré des propriétés cytotoxiques et pas (ou peu) de sélectivité pour le parasite lors de nos investigations.

Bien que la plante soit largement utilisée en médecine traditionnelle (notamment comme fortifiant chez les enfants) et connue pour être non toxique [Traoré et al., 2006], il nous paraît actuellement prématuré d'encourager la valorisation de *G. sokotensis*. Des données supplémentaires quant à l'efficacité clinique réelle du

¹ Au Burkina Faso, une préparation appelée « potasse » par la population, et correspondant à l'eau de lavage de cendres de tiges de mil ou d'autres bois, est fréquemment utilisée pour la préparation de sauces alimentaires, afin d'en supprimer le goût aigre. Cette « potasse » possède des propriétés alcalines et peut être utilisée sous forme liquide ou sous forme solide après évaporation de l'eau ; elle est plus ou moins concentrée selon sa préparation [Bessot, 2008]. Son usage en cuisine est fréquent mais elle peut également entrer dans la préparation des remèdes traditionnels.

décocté (alcalinisé ?) ainsi qu'à la toxicité potentielle des extraits et composés isolés sont nécessaires – notamment des tests de génotoxicité - afin de statuer sur la sécurité d'usage de la plante en question. Par principe de précaution, celle-ci devrait en tous cas être évitée chez la femme enceinte, compte tenu des propriétés cytotoxiques décelées.

L'étude de l'activité antiplasmodiale *in vivo* sur *P. berghei* des extraits - dont une décoction « alcalinisée », permettant une meilleure extraction des acides triterpéniques et des flavonoïdes - pourrait être envisagée et serait à mettre en relation avec celle de Traoré en 2006.

L'étude phytochimique de la plante pourrait par ailleurs être poursuivie par l'identification d'autres terpènes et flavonoïdes vraisemblablement impliqués dans l'activité antiplasmodiale globale ; ces substances pourraient constituer des marqueurs de qualité des échantillons en cas de valorisation (actuellement hypothétique) de la plante sous forme d'un MTA.

Concernant la sokotensine A, son instabilité chimique ajoutée à son manque de sélectivité et à son activité relativement modérée, ne font malheureusement pas de ce produit un bon « lead compound » antipaludique. L'activité antiplasmodiale *in vivo* de la sokotensine A ainsi que son mécanisme d'action mériteraient toutefois d'être étudiés. De plus, l'étude du mécanisme de dégradation de ce composé ainsi que l'identification et l'évaluation de l'activité des produits finaux de dégradation pourraient constituer une perspective supplémentaire de nos travaux consacrés à *G. sokotensis*.

5.5 Bibliographie (5)

Ahmed E.M., Nour B.Y.M, Mohammed Y.G., Khalid H.S. Antiplasmodial Activity of Some Medicinal Plants Used in Sudanese Folk-medicine, *Environmental Health Insights*, 2010. 4:1-6.

Arbonnier Michel, (2002) Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, 2^e édition CIRAD, MNHN, ISBN CIRAD : 2-87614-509-X

Batista R, Silva Ade J Jr, de Oliveira AB: Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* 2009, 14:3037–3072.

Bergonzi M.C., Righeschi C., Isacchi B., Bilia A.R. Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhizi) by HPLC-DAD-ESI-MS, *Food Chemistry*, 2012. 134: 1199-1204.

Bero J, Frédéric M, Quetin-Leclercq J: Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol* 2009, 61:1401–1433.

Bero J, Quetin-Leclercq J: Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria. *Planta Med* 2011, 77:631–640.

Bessot L., Etude de plantes médicinales traditionnellement utilisées dans le soin du paludisme au Burkina Faso. Thèse d'état de docteur en pharmacie. Université Louis Pasteur-Strasbourg, 2008.

Bickii, J.; Tchouya, GRF; Tchouankeu, JC; Tsamo, E. : The antiplasmodial agents of the stem bark of *Entandrophragma angolense* (Meliaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2007, 4(2): 135-139.

Chung, LM; Kim, MY; Park, SD; Park, WH; Moon, HI : *In vitro* evaluation of the antiplasmodial activity of *Dendropanax morbifera* against chloroquine-sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Phytotherapy Research*, 2009. 23(11): 1634-1637.

Deharo E, Ginsburg H: Analysis of additivity and synergism in the antiplasmodial effect of purified compounds from plant extracts. *Malar J* 2011, 10(Suppl 1):S5.

El-Tahir A., Satti G.M.H., Khalid S.A. Antiplasmodial Activity of Selected Sudanese Medicinal Plants with Emphasis on *Acacia nilotica*, *Phytotherapy Research*, 1999. 13: 474-478.

Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NPJ, Socheat D, von Seidlein L: Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* 2010, 8:272–280.

Egan TJ: Artemisinin-resistant *P. falciparum*: can the genie be put back in the bottle? *Future Microbiol* 2009, 4:637–639.

Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S: Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:509–520.

Frédérich M, Jacquier MJ, Thepenier P, De Mol P, Tits M, Philippe G, Delaude C, Angenot L, Zeches-Hanrot M: Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *J Nat Prod* 2002, 65:1381–1386.

Ginsburg H, Deharo E: A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malar J* 2011, 10(Suppl. 1):S1.

Grougnet R., Magiatis P., Mitaku S., Loizou S., Moutsatsou P., Terzis A., Cabalion P., Tillequin F., Michel S. seco-Cycloartane Triterpenes from *Gardenia aubryi*, *Journal of Natural Products*, 2006. 69: 1711-1714.

Guinko Sita, *Connaissance des arbres et arbustes du Burkina Faso par les langues vernaculaires*, Université de Ouagadougou, 1988

Hnawia E., Hassani L., Deharo E., Maurel S., Waikedre J., Cabalion P., Bourdy G., Valentin A., Jullian V., Fogliani B. Antiplasmodial activity of New Caledonia and Vanuatu traditional medicines, *Pharmaceutical Biology*, 2011. 49 (4): 369-376.

Jansen O., Frédéric M., Tits M., Angenot L., Cousineau S., Bessot L., Crunet C., Nicolas J.-P. (2008) Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso : sélection de 13 espèces à potentialités antiplasmodiales méconnues, *Ethnopharmacologia*, 41, 74-81.

Jansen O., Angenot L., Tits M., Nicolas J.-P., De Mol P., Nikiéma J.-B., Frédéric M. (2010) Evaluation of 13 selected medicinal plants from Burkina Faso for their antiplasmodial properties, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 143-150.

Jansen O., Tits M., Angenot L., Nicolas J.-P., De Mol P., Nikiéma J.-B., Frédéric M. (2012) Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound, *Malaria Journal*, 11:289.

JDM (2006) *Association Jardins du monde : données récoltées par Lise Bessot et Céline Crunet au cours d'enquêtes ethnobotaniques menées dans le cadre des activités de l'association au Burkina Faso (Boulkiemdé et Sanguié) en 2006.*

Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R: Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem* 2009, 17:3229–3256.

Kenmogne M, Prost E, Harakat D, Jacquier MJ, Frédérick M, Sondengam LB, Zeches M, Waffo-Teguo P: Five labdane diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiacum*. *Phytochem* 2006, 67:433–443.

Kunert O., Sreekanth G., Sreedhar Babu G., Adavi Rao B.V., Radhakishan M., Ravi Kumar B., Saf R., Appa Rao A.V.N., Schühly W. Cycloartane Triterpènes from Dikamali, the Gum Resin of *Gardenia gummifera* and *Gardenia lucida*, *Chemistry and Biodiversity*, 2009. 6:1185-1192.

Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ: Parasite lactate-dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug-sensitivity. *AmJTrop Med Hyg* 1993, 48:739–741.

Murray, C.J.L., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A.D. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012; 379: 413–31

Nacoulma Odile (1996) Thèse Docteur ès Sciences Naturelles : Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles au Burkina Faso, Cas du plateau central, Univ. OUAGA

Nogueira CR, Lopes LMX: Antiplasmodial Natural Products. *Molecules* 2011,16:2146–2190.

Nuanyai T., Sappapan R., Teerawatananond T., Muangsin N., Pudhom K. Cytotoxic 3,4-*seco*-Cycloartane Triterpenes from *Gardenia sootepensis*, *Journal of Natural Products*, 2009. 72:1161-1164.

Nuanyai T., Chokpaiboon S., Vilaivan T., Pudhom K. Cytotoxic 3,4-*seco*-Cycloartane Triterpenes from the Exudate of *Gardenia tubifera*, *Journal of Natural Products*, 2010. 73: 51-54.

Nuanyai T., Sappapan R., Vilaivan T., Pudhom K. Gardenoids E-H, Cycloartane Triterpenes from the Apical Buds of *Gardenia obtusifolia*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2011. 59 (3): 385-387.

Nuanyai T., Sappapan R., Vilaivan T., Pudhom K. Cycloartane triterpènes from the exudate of *Gardenia thailandica*, *Phytochemistry Letters*, 2011. 4: 26-29.

Patwari, G.S, Reddy, A.R.N, Rao, A.V.N., Reddy, Y.N : Pharmacological screening of dikamaliartane-A, a Cycloartane isolated from gum resin, dikamali *international journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 2011, 2(4).

Patwari, G.S, Harikiran L, Appa Rao AVN, Reddy Y.N.: Evaluation of anti-cancer activity of dikamaliartane-A, a cycloartane isolated from dikamali, a gum resin, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 4(4)

Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Moo CI, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ, Anderson TJC, Nosten F: Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet* 2012, 379 (9830) :1960-1966

Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M: Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4:727–740.

Reutrakul, V., Krachangchaeng, C., Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Jaipetch, T., Yoosook, C., Kasisit, J., Sophasan, S., Sujarit, K., Santisuk, T. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents from leaves and twigs of *Gardenia tubifera* *Tetrahedron* 2004. 60(7):1517-1523.

Robert S, Baccelli C, Devel P, Dogné JM, Quetin-Leclercq J: Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. *J Ethnopharmacol* 2010, 128:641–648.

Rasoanaivo P, Wright C, Willcox M, Gilbert B: Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J* 2011, 10(Suppl 1):S4.

Silva, G.L., Gil, R.R., Cui, B., Chai, H., Santisuk, T., Srisook, E., Reutrakul, V., Tuchinda, P., Sophasan, S., Sujarit, S. : Novel cytotoxic ring-A seco-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron*, 1997. 53(2): 529-538.

Suryanarayana L., Mounica P., Prabhakar A.S., Sreekanth G., Adavi Rao B.V., Ravi Kumar B., Appa Rao A.V.N. Differentiating the Gum Resins of Two Closely Related Indian *Gardenia* Species, *G. gummifera* and *G. lucida*, and Establishing the Source of “Dikamali” by TLC, *Journal of Planar Chromatography*, 2012. 25(4):363-367.

Suryanarayana L., Bharathi A., Yan-Hong W., Chidananda Swamy R., Sreekanth G., Adavi Rao B.V., Prabhakar Achanta S., Ravi Kumar B., Ikhlas A.K., Appa Rao A.V.N. Differentiating the Gum Resins of Two Closely Related Indian *Gardenia* Species, *G. gummifera* and *G. lucida*, and Establishing the Source of Dikamali Gum Resin Using High-Performance Thin-Layer Chromatography and Ultra-Performance Liquid Chromatography-UV/MS, *Journal of AOAC International*, 2012. 95 (1): 67-73.

Suksamrarn A., Tanachatchairatana T., Kanokmedhakul S. : Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. 88: 275-277.

Sy L.-K., Brown G.D.: Novel seco-Cycloartanes from *Kadsura coccinea* and the Assisted Autoxidation of a Tri-Substituted Alkene, *Tetrahedron*, 1999. 55:119-132.

Traoré M., Guiguemdé A., Yago I., Nikiéma J.-B., Tinto H., Dakuyo Z.-P., Ouédraogo J.-B., Guissou I.-P., Guiguemdé T.-R. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants,

Cochlospermum tinctorium A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2006. 3: 34-41.

Tuchinda, P; Pompimon, W.; Reutrakul, V.; Pohmakotr, M., Yoosook, C., Kongyai, N., Sophasan, S., Sujarit, K.; Upathum, S. E.; Santisuk, T. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents of *Gardenia obtusifolia* and their modified compounds. Tetrahedron, 2002. 58(40):8073-8086.

WHO: Guidelines for the treatment of malaria, 2010a. World Health Organization, Geneva, Switzerland

WHO: Guidelines on registration of traditional medicines in the WHO African region, 2010^b WHO Regional Office for Africa; Brazzaville.

WHO, World Malaria report 2011, World Health Organization, Geneva, Switzerland

Willcox M, Graz B, Falquet J, Diakite C, Giani S, Diallo D: A “reverse pharmacology” approach for developing an antimalarial phytomedicine. Malar J 2011, 10(suppl1):S8.

6 DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que l'on puisse le prévenir et le traiter, le paludisme reste un problème majeur de santé publique dans les pays du Sud les plus touchés. Cette maladie parasitaire est en effet associée à une mortalité élevée et à un ralentissement important du développement socio-économique des pays concernés, particulièrement en Afrique.

Pour lutter contre cette maladie, en plus de la mise en place de mesures de prévention et d'un diagnostic rapide, la disponibilité de traitements efficaces est essentielle afin de réduire la mortalité. Les résistances du parasite aux antipaludiques modernes largement utilisés, dont celles détectées récemment pour l'artémisinine, constituent une menace majeure pour le contrôle de la maladie et rendent plus que jamais nécessaire la recherche de nouveaux médicaments actifs sur *P. falciparum*.

Parmi les stratégies pour la mise au point de nouveaux traitements, l'étude phytochimique et pharmacologique des ressources végétales a permis le développement, à partir de substances naturelles, de nombreux médicaments utilisés en médecine moderne, dont les principaux antipaludiques utilisés à l'heure actuelle.

La majorité des habitants des régions rurales du Sud n'a cependant pas accès à ces traitements modernes et recourt principalement aux plantes médicinales locales pour se soigner. Les savoirs et pratiques liés à l'utilisation des plantes des pharmacopées locales, se basant sur les connaissances accumulées et transmises de génération en génération, constituent un véritable patrimoine thérapeutique et culturel qu'il est important de valoriser, au profit des populations.

Ce travail s'inscrit dans la double optique de **participation à la lutte contre la malaria** et de **contribution à la valorisation des médecines et pharmacopées traditionnelles africaines**.

En outre, le développement de phytomédicaments (MTA) standardisés et scientifiquement démontrés actifs et sûrs, contribuerait à répondre à la fois au problème de l'émergence de souches résistantes du *Plasmodium* et à celui d'accessibilité aux médicaments modernes pour les populations touchées par le paludisme. En effet, des études ont montré que l'association de plusieurs composés au sein de certains extraits de plantes présente certains avantages par rapport à un PA utilisé en monothérapie dans le traitement du paludisme [Rasoanaivo, 2011]. Les différents constituants de l'extrait agissent en synergie par différents mécanismes d'interactions positives et diminuent notamment le risque d'apparition de résistance, comme c'est le cas pour les traitements modernes dans lesquels il est maintenant

également recommandé d'associer plusieurs PA pour la même raison. Ces faits encouragent à considérer la valorisation de plantes médicinales pour la lutte contre le paludisme, notamment quand les médicaments modernes ne sont pas accessibles.

La démarche ethnopharmacologique constitue une approche de choix aussi bien pour la découverte de nouveaux agents antiplasmodiaux que pour la valorisation des plantes issues des pharmacopées traditionnelles. Elle permet de valider l'activité des remèdes traditionnels d'origine naturelle, d'assurer leur qualité, de les améliorer, d'en isoler de nouvelles molécules et ce, tout en respectant le savoir des populations et les espèces végétales dans leur environnement. Dans sa dimension appliquée, elle permet de répondre à la double difficulté que sont les phénomènes de résistances du *Plasmodium* vis-à-vis des monothérapies disponibles et l'accès aux thérapies modernes par les populations locales défavorisées. L'interdisciplinarité de l'approche ethnopharmacologique, impliquant diverses compétences, requiert des collaborations efficaces entre différents laboratoires et acteurs de terrain afin de mener à bien cette démarche, dont le succès dépendra notamment de la qualité de ces collaborations.

Signalons également, qu'à côté de la méthodologie ethnopharmacologique « classique », telle que présentée dans ce travail (1. enquêtes, 2. travail de laboratoire phytochimique, pharmacologique et toxicologique, 3. étude clinique éventuelle) s'est développée une nouvelle approche, la « pharmacologie inverse » [Willcox, 2011]. Celle-ci fait également appel à un travail interdisciplinaire basé sur une approche ethnopharmacologique mais les étapes de travail sont réalisées dans un ordre différent. Cette méthodologie s'attache à évaluer prioritairement l'efficacité clinique des remèdes traditionnels (évidence ethnomédicale). Ces études cliniques peuvent être considérées comme éthiquement acceptables si elles sont menées dans le cadre de la pratique traditionnelle réelle. Cette approche présente l'avantage de mener plus rapidement et à moindre coût à la valorisation de phytomédicaments [Graz, 2007]. *Argemone mexicana*, valorisée dans un MTA au Mali (Sumafoura), en est certainement le meilleur exemple [Willcox, 2007 ; Graz, 2010].

L'isolement de nouveaux « lead compounds » antiplasmodiaux, notamment à travers l'étude phytochimique des plantes en laboratoire, reste cependant nécessaire d'une part, pour renforcer l'arsenal thérapeutique et, d'autre part, car ils peuvent mener à la découverte de nouvelles cibles d'action sur le *Plasmodium*.

Par ailleurs, l'étude de la composition chimique des plantes médicinales entrant dans la composition des MTA s'avère également utile pour la standardisation de ceux-ci en principes actifs et/ou traceurs.

La démarche ethnopharmacologique entreprise dans ce travail s'est intéressée aux plantes du Burkina Faso. Son objectif principal était d'évaluer les potentialités antiplasmodiales de végétaux issus de la flore burkinabè et connus pour leur utilisation traditionnelle pour le traitement du paludisme et des fièvres, en vue d'en isoler de nouveaux agents antiplasmodiaux et d'évaluer la possibilité de valoriser ces plantes dans des MTA.

L'équipe de l'association Jardins du monde a joué le rôle d'interface pour les échanges d'informations avec les populations, d'une part à propos de l'usage des plantes dans la prise en charge traditionnelle du paludisme, et, d'autre part, quant au retour sur le terrain des données obtenues lors des travaux en laboratoire.

Les investigations menées dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter une réponse à différentes questions :

- Quelles sont les plantes traditionnellement utilisées dans la prise en charge du paludisme au Burkina Faso ?

Les travaux ethnobotaniques entrepris dans le cadre de ce travail ont permis de répertorier 72 espèces végétales utilisées dans le traitement traditionnel du paludisme au Burkina Faso. Cette liste de plantes résulte de la combinaison de données issues des enquêtes de terrain avec l'équipe de JDM et de la compilation des informations provenant de nombreux travaux locaux sur le sujet. Elle couvre un terrain assez large mais n'a cependant pas la prétention d'être exhaustive. D'autres travaux sont d'ailleurs venus la compléter depuis lors [Traore, 2009 ; Nadembenga, 2011].

Cette première étape du travail contribue au recensement des espèces médicinales au Burkina Faso, dont certaines sont en voie de disparition. Les données recueillies peuvent indirectement participer à la protection de la biodiversité par la mise en évidence des espèces végétales d'intérêt.

Des recherches bibliographiques sur les espèces recensées ont mené à la sélection de 13 espèces à étudier en laboratoire pour leurs propriétés antiplasmodiales.

- Quelles sont les plantes présentant une réelle activité sur *P. falciparum* ?

Un criblage antiplasmodial *in vitro* de différents extraits réalisés à partir des échantillons végétaux sélectionnés a permis de mettre en évidence une activité significative ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$) pour 8 espèces végétales parmi les 13 sélectionnées, dont 5 montrées pour la première fois actives. L'activité détectée démontre la présence de composés actifs contre le *Plasmodium* dans la plante et permet de valider, au moins en partie, l'usage traditionnel de ces plantes contre le paludisme. Trois espèces se sont

montrées particulièrement prometteuses ($IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$); il s'agit de *Dicoma tomentosa*, *Gardenia sokotensis* et *Psorospermum senegalense*.

Les 2 premières ont été sélectionnées pour une étude approfondie de leurs propriétés antiplasmodiales par fractionnement bioguidé, en vue d'en isoler leurs principes actifs. Des tests préliminaires de toxicité ont également été réalisés avec ces 2 plantes sélectionnées.

- Quels sont les principes actifs responsables de l'activité des 2 plantes soumises au fractionnement bioguidé ?

Dicoma tomentosa Cass. paraissait d'emblée la plus intéressante à étudier pour ses potentialités antiplasmodiales car elle s'est montrée la plus active lors du screening et son extrait aqueux, proche de la forme traditionnelle de préparation, était également actif. De plus, elle n'avait jamais été évaluée pour aucune propriété biologique/pharmacologique avant nos travaux. Le fractionnement bioguidé a permis d'isoler le principe actif largement majoritaire de la plante : l'urospermal A-15-O-acetate, une lactone sesquiterpénique de type mélampolide, déjà décrite dans cette espèce [Bolmnhann, 1982] mais dont les propriétés antiplasmodiales n'avaient jamais été mises en évidence. L'UA15OA a montré une activité antiplasmodiale prometteuse ($< 1 \mu\text{g/ml}$). Malheureusement, il s'est également avéré être le composé cytotoxique majoritaire de la plante et ne présente, tout comme les extraits, qu'une sélectivité modérée ($IS = 3$) vis-à-vis du *Plasmodium*.

De plus, la génotoxicité détectée, aussi bien avec les extraits qu'avec le PA, fait craindre une toxicité humaine, en particulier en cas d'usage à long terme (ce qui est cependant rarement le cas pour le paludisme). Le potentiel génotoxique de la plante mériterait d'être confirmé par d'autres modèles de tests, afin de prendre une position définitive quant à l'utilisation de *Dicoma tomentosa*. En l'état actuel de nos connaissances, et malgré une activité très prometteuse sur *P. falciparum*, nous conseillerions plutôt d'éviter son usage, qui doit de toute façon être proscrit chez la femme enceinte.

Par ailleurs, l'UA15OA ayant montré des potentialités cytotoxiques prometteuses sur diverses lignées de cellules cancéreuses (dont certaines résistantes à l'apoptose), l'étude de ses potentialités antitumorales pourrait constituer une perspective complémentaire intéressante dans le cadre de nos travaux sur *D. tomentosa*.

Contrairement à *D. tomentosa*, les potentialités antiplasmodiales de ***Gardenia sokotensis*** Hutch. avaient déjà été mises en évidence *in vivo* [Traoré, 2006] mais aucun principe actif n'avait été caractérisé. Le fractionnement bioguidé mené lors de ce travail a montré que l'activité antiplasmodiale de la plante ne peut pas être attribuée à

un produit majoritaire mais résulte de l'activité combinée de nombreux composés se répartissant dans les différentes fractions. Parmi ceux-ci, 4 substances de nature terpénique ont été purifiées. L'une d'entre elles a été identifiée comme un nouveau triterpène de type 3,4-seco-cycloartane, présentant un noyau méthylfurane sur une chaîne latérale. Nommé sokotensine A, ce triterpène, tout comme les 3 autres composés isolés, a montré un niveau d'activité antiplasmodiale proche de celui de l'extrait de départ ($IC_{50} \sim 12 \mu\text{g/ml}$), soit une activité plutôt modérée pour des produits purs. Ces derniers, ainsi que les extraits testés, n'ont par ailleurs montré que peu ou pas de sélectivité lors de tests de cytotoxicité sur cellules humaines. La signification clinique de cette cytotoxicité serait à évaluer car la plante était connue pour être non toxique [Traoré, 2006]. L'activité modérée de la sokotensine A, son manque de sélectivité et son instabilité en solution ne font malheureusement pas de ce produit un bon « lead compound » antipaludique. Concernant l'utilisation de la plante, des études complémentaires relatives à l'évaluation de la toxicité des extraits de *G. sokotensis* seraient nécessaires afin de statuer sur sa sécurité d'usage. En fonction des résultats obtenus, une étude clinique pourrait également être envisagée. L'étude phytochimique de la plante pourrait également être poursuivie par l'isolement d'autres composés participant à l'activité antiplasmodiale et susceptibles de servir de marqueurs de qualité.

En conclusion, ces travaux, s'inscrivant dans un effort global pour une meilleure connaissance des potentialités antipaludiques des plantes issues des pharmacopées traditionnelles africaines, traduisent le potentiel médicinal de certaines espèces de la flore burkinabè pour lutter contre le paludisme.

Les résultats obtenus démontrent aussi l'importance d'évaluer la toxicité (en plus de l'activité) des végétaux, lors de l'étude de leurs propriétés pharmacologiques en vue de leur valorisation. En effet, si l'utilisation traditionnelle de la plante garantit, en principe, l'absence de toxicité aiguë (moyennant le respect de la partie utilisée, du mode de préparation, de la voie d'administration et de la posologie), la notion de toxicité chronique est nettement moins évidente à maîtriser dans la pratique traditionnelle, et ces données sont souvent manquantes dans la littérature. La signification clinique des phénomènes de toxicité observés *in vitro* devrait également être clarifiée.

D'autre part, la mise au point d'une formulation adéquate et la standardisation du MTA sont également nécessaires afin de garantir son efficacité et sa qualité, et assurer ainsi sa sécurité d'usage. Cela passe notamment par l'étude phytochimique des drogues

végétales entrant dans la composition des remèdes issus des pharmacopées traditionnelles et par l'évaluation clinique des MTA.

Nos travaux soulignent également la nécessité d'une meilleure information des populations quant aux plantes possédant une réelle efficacité ainsi qu'à la toxicité potentielle de certaines d'entre elles, dont l'usage devrait être évité.

Le développement d'une pharmacopée africaine, à l'instar de la pharmacopée européenne, reprenant des normes de qualité pour les drogues végétales, et des monographies du HMPC, principalement axées sur l'usage des plantes, serait particulièrement souhaitable afin d'améliorer la qualité de la médecine traditionnelle.

Enfin, la valorisation des plantes médicinales locales doit se faire à travers le respect de l'environnement. Si le potentiel médicinal des plantes représente un argument pour la sauvegarde des espèces en voie de disparition, il convient de rester attentif au risque de surexploitation des ressources en cas de mise au point d'un MTA (surtout s'il s'agit de racines). Une mise en culture est certainement préférable et permet de plus une certaine standardisation des conditions de production des matières premières entrant dans sa composition.

Des efforts pour une meilleure connaissance des plantes médicinales sont réalisés au niveau des politiques nationales et régionales africaines, ainsi que par différents acteurs de terrain, ONG, centres de recherches et laboratoires du Sud et du Nord, impliqués dans des projets de recherche et de développement. Une optimisation des collaborations permettrait certainement une valorisation plus rapide des résultats des recherches sur les plantes issues des pharmacopées traditionnelles, au profit des populations touchées par le paludisme.

Bibliographie (6)

Bohlmann F, Singh P, Jakupovic J: Naturally occurring terpene derivatives. Part 428. Germacranolides from *Dicoma tomentosa*. *Phytochem* 1982, 21:2122–2124.

Graz, B., Elisabethsky, E., Falquet, J., Beyond the myth of expensive clinical study. Assesment of traditional medicines. *J of ethnopharmacology* 2007, 113(3), 382-386

Graz, B., Willcox, M.L., Diakite, C., Falquet, J., Dackuo, F., Sidibe, O., Giani, S., Diallo, D. : *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications., *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, 104 (1), p33-41.

Nadembega P, Boussim JI, Nikiema JB, Poli F, Antognoni F Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study. *J Ethnopharmacol.* 2011 133(2):378-95.

Rasoanaivo P, Wright C, Willcox M, Gilbert B: Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J* 2011, 10 Suppl 1:S4.

Traore A, Derme A I, Sanon S, Gansane A, Ouattara Y, Nebie, I, Sirima S. : Connaissances ethnobotaniques et pratiques phytothérapeutiques des tradipraticiens de santé de la Comoé pour le traitement du paludisme : processus d'une recherche scientifique de nouveaux antipaludiques au Burkina Faso. *Ethnopharmacologia* 2009, 43, 35-46

Traoré M., Guiguemdé A., Yago I., Nikiéma J.-B., Tinto H., Dakuyo Z.-P., Ouédraogo J.-B., Guissou I.-P., Guiguemdé T.-R. Investigation of antiplasmodial compounds from two plants, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Gardenia sokotensis* Hutch, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2006. 3: 34-41.

Willcox, M. L ., Graz, B., Falquet, J., Sidibé, O., Forster, M., Diallo, D. : *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria., *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, 101 (12), p.1190-1198.

Willcox M, Graz B, Falquet J, Diakite C, Giani S, Diallo D: A “reverse pharmacology” approach for developing an antimalarial phytomedicine. *Malar J* 2011, 10(suppl1):S8.

7 ANNEXES

7.1 Production scientifique supplémentaire

7.2 Charte éthique de Jardins du monde

7.3 Comparaison par CCM de *Psorospermum senegalense* et *P. guineense*

7.4 Screening phytochimique : Mode opératoire

7.5 Spectres RMN de l'UA150A

7.6 Spectres RMN de la sokotensine A

7.1 Production scientifique supplémentaire



In vitro antiparasitodal activity of ethnobotanically selected plants from Burkina Faso



Olivia Jansen^a, L. Angenot^a, M. Tits^a, J-P. Nicolas^b, P. De Mol^a, P-Y. Sacré^a, M.C. Jonville^a, M. Frédérick^a

^a Laboratory of Pharmacognosy, CIRIM, University of Liège, Bat. B36, Av. de l'hôpital 1, 4000 Liège, Belgium

^b Association Jardins du Monde, 15, rue St Michel, 29190 Brasparts, France

>> INTRODUCTION :

Ethnopharmacological surveys conducted in Burkina Faso allowed us to identify 72 plant species used in traditional medicine to cure symptoms relevant to malaria. From these 72 species, we chose to study 13 plants for their antiparasitodal properties. Selection was mainly based on our ethnopharmacological data and on the lack of scientific validation for antiparasitodal activity of indexed plants (and isolated compounds). Chemotaxonomic links with species from the same genus or family reported to exhibit antiparasitodal properties and possibility of local valorization of active plants in "improved traditional medicines" (ITMs) were also considered. The *in vitro* antiparasitodal activity of methanolic and dichloromethane crude extracts obtained from 17 samples collected in Burkina Faso was evaluated on the *Plasmodium falciparum* 3D7 chloroquino-sensitive strain using colorimetric method [1].



Burkina Faso : collecting place (Boukhiemdé, Sanguié and Comoé Provinces)
1. *W. indica* 2. *D. tomentosa* 3. *V. paradoxa*
4. *G. sokotensis* 5. *J. gossypifolia*



Information about selected plants

Species	Family	Sample	Place of collect (* = Herbalist)	Traditional use (in the field of malaria)	Previous report of antiparasitodal activity
<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	FABACEAE	Leaves Twigs	Koudougou Koudougou	Malaria (Leafy stems decoction)	No report for <i>B. rufescens</i> but well for other <i>Bauhinia</i> sp. [2, 3]
<i>Bergia suffruticosa</i> Fenzl.	ELATINACEAE	Whole plant	Koudougou*	Child Malaria - Tonic (Whole plant decoction)	No report
<i>Boswellia dalzielii</i> Hutch	BURSERACEAE	Leaves	Kassou	Malaria - Fever (Leaves and barks decoction)	No report
<i>Crossopteryx febrifuga</i> Benth	RUBIACEAE	Leaves	Banfora	Malaria - Fever - Icterus (Leafy stems decoction - sometimes in mixture)	<i>In vitro</i> activity of leaves alkaloid extract (<i>P. falciparum</i>) [4] and <i>in vivo</i> activity of EIOH stem bark extract (<i>P. berghei</i>) [5]
<i>Dicoma tomentosa</i> Cass	ASTERACEAE	Whole plant	Banfora*	Child malaria with spleen inflammation (Whole plant decoction)	No report
<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze	ACANTHACEAE	Aerial parts	Koudougou*	Child Malaria (Aerial parts decoction)	No report
<i>Ficus thonningii</i> Blume	MORACEAE	Leaves	Godin	Malaria (pernicious access) - Fever (Leaves decoction)	No report for <i>F. thonningii</i> but well for other <i>Ficus</i> sp. [6, 4]
<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch	RUBIACEAE	Leaves	Godin	Fever - Malaria with gastrointestinal disorder (Leaves decoction - often in mixture)	<i>In vivo</i> activity of DCM:EIOH (7:3) extract (<i>P. berghei</i>) [7]
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	EUPHORBIACEAE	Leaves	Bonyolo	Malaria - Fever - Anemia (Leaves decoction)	<i>In vitro</i> activity of hot water extract (<i>P. falciparum</i>) [8]
<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) N. Hallé Syn: <i>Hippocratea africana</i> Loes ex Engl.	CELASTRACEAE	Leaves	Banfora	Fever - Child malaria with spleen inflammation (Leaves decoction)	<i>In vivo</i> activity of EIOH roots extract (<i>P. berghei</i>) [9]
<i>Psorospermum senegalense</i> Spach Syn: <i>Vismia guineensis</i> Choisy	CLUSIACEAE	Leaves	Banfora	Malaria (Leaves decoction - sometimes in mixture - bark and root are toxic for kidney)	<i>In vitro</i> promising activity of vismione H isolated from <i>V. guineensis</i> [10]
<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn. Syn: <i>Butyrospermum paradoxum</i> Hepper	SAPOTACEAE	Bark Bark (2) Leaves Roots	Godin Réo Réo Réo	Malaria - Fever - Icterus (Leaves decoction or infusion)	No report
<i>Waltheria indica</i> L.	STERCULIACEAE	Aerial parts	Réo	Malaria (Aerial parts decoction)	<i>In vitro</i> inactivity of water and DCM: MeOH (1:1) extracts [11]

Antiparasitodal results <i>P. falciparum</i> (3D7)	Dichloromethane (DCM) extract			Methanolic (MeOH) extract		
	IC 50 ± σ (µg/ml)	n	Yield (%)	IC 50 ± σ (µg/ml)	n	Yield (%)
<i>Bauhinia rufescens</i> leaves	52.96 ± 7.43	3	2.24 %	> 100	2	24.20 %
<i>Bauhinia rufescens</i> twigs	> 100	2	0.70 %	> 100	2	7.10 %
<i>Bergia suffruticosa</i> whole plant	19.53 ± 2.50	3	1.24 %	> 100	2	12.68 %
<i>Boswellia dalzielii</i> leaves	41.01 ± 11.30	3	4.65 %	18.85 ± 1.93	3	24.71 %
<i>Crossopteryx febrifuga</i> leaves	56.86 ± 5.15	3	4.02 %	> 100	2	29.99 %
<i>Dicoma tomentosa</i> whole plant	7.90 ± 0.26	3	3.85 %	7.04 ± 1.15	3	4.09 %
<i>Dyschoriste perrottetii</i> aerial parts	> 100	2	4.75 %	> 100	2	7.28 %
<i>Ficus thonningii</i> leaves	58.74 ± 9.65	3	1.83 %	> 100	2	10.55 %
<i>Gardenia sokotensis</i> leaves	14.01 ± 3.60	3	9.11 %	27.62 ± 8.83	4	17.94 %
<i>Jatropha gossypifolia</i> leaves	35.66 ± 2.86	3	2.77 %	87.65 ± 7.84	3	8.84 %
<i>Loeseneriella africana</i> leaves	> 100	2	2.91 %	> 100	2	13.15 %
<i>Psorospermum senegalense</i> leaves	10.03 ± 2.00	3	2.79 %	80.46 ± 13.61	3	22.28 %
<i>Vitellaria paradoxa</i> bark 1	43.94 ± 13.44	4	3.71 %	78.11 ± 12.25	3	17.14 %
<i>Vitellaria paradoxa</i> bark 2	81.24 ± 10.19	3	4.13 %	> 100	2	19.09 %
<i>Vitellaria paradoxa</i> leaves	55.45 ± 12.60	3	5.36 %	> 100	2	22.63 %
<i>Waltheria indica</i> aerial parts	33.73 ± 13.44	3	1.33 %	57.21 ± 11.64	2	10.47 %
<i>Waltheria indica</i> roots	29.71 ± 6.23	3	0.61 %	62.09 ± 14.80	2	15.27 %

>> ANTIPLASMODIAL ACTIVITY (IC 50):

- ✦ IC 50 ≤ 15 µg/ml : promising activity
- ✦ 15 µg/ml < IC 50 ≤ 50 µg/ml : moderate activity
- ✦ IC 50 > 50 µg/ml : inactivity



IC 50 is the concentration of drug needed to obtain 50% inhibition of parasite growth

>> RESULTS :

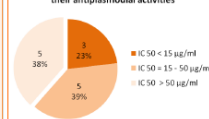
Eight of the 13 selected plant species exhibit promising to moderate antiparasitodal activity thus confirming the traditional use of these plants for malaria symptoms management.

The best results were obtained with extracts from *Dicoma tomentosa* whole plant, *Psorospermum senegalense* leaves and *Gardenia sokotensis* leaves which display promising antiparasitodal activity with IC 50 ranging from 7 to 14 µg/ml.

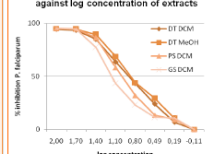
Among them, *Gardenia sokotensis* has been reported to exhibit *in vivo* antiparasitodal activity [7] and Vismione H isolated from *Vismia guineensis* (syn. *P. senegalense*) have shown *in vitro* antiparasitodal properties [10].

However, this work constitutes the first report of the antiparasitodal activity against *P. falciparum* for crude extracts obtained from *Dicoma tomentosa*, *Boswellia dalzielii*, *Bergia suffruticosa*, *Waltheria indica* and *Vitellaria paradoxa*.

Classification of studied species according to their antiparasitodal activities



Inhibition curves of *P. falciparum* growth against log concentration of extracts



>> CONCLUSION:

Dicoma tomentosa, *Psorospermum senegalense* and *Gardenia sokotensis* showed promising antiparasitodal activity in this preliminary screening. They are good candidates for further investigations in the fields of new antimalarial drugs discovery and traditional medicine valorization.

Acknowledgements: The authors wish to thank Profs. NIKIEMA J-B., NACOUUMA O., MILLOGO J., GUINKO S. as well as Drs DAKUYO Z. and OLIVIER M. for their help and precious advices in the realization of this work. This research was supported by the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS - grant N. 3452005). M.F. is a research associate from the FNRS.

Corresponding author : Olivia Jansen - tel : +32 4 366 43 42 - e-mail : ojansen@ulg.ac.be

References:

- Kermogne, M. et al. (2006) *Phytochemistry*, 67(5) : 433-438
- Munoz, V. et al. (2000) *Journal of Ethnopharmacology*, 69 (2), 127-137
- Kittakoop, P. et al. (2000) *Phytochemistry*, 55 (4), 349-352.
- Sanon S. et al. (2003) *Journal of Ethnopharmacology*, 86 (2-3):143-7
- Elufioye T. O. et al. (2004) *Journal of Ethnopharmacology*, 93, (2-3), 167-171
- Zhang HJ et al. (2002) *Planta Medica* 68(12) : 1086-91
- Traoré, M. et al. (2006) *African J. of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 3(4) : 34-41
- Gbeassor M. et al. (1989) *Journal of Ethnopharmacology* 25(1):115-8
- Okokon, J. E. et al. (2006) *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100(7), 585-590.
- Guido F. et al. (1989) *Parasitology Research*, 85 : 582-588
- Clarkson C. et al. (2004) *Journal of Ethnopharmacology* 92: 177-191,

Is Artemisinin the Only Antiplasmodial Compound in the *Artemisia annua* Tea Infusion? An *in Vitro* Study

Julia Mouton¹, Olivia Jansen², Michel Frédérick², Frank van der Kooy³

¹ Natural Products Laboratory, Institute of Biology, Leiden University, Leiden, the Netherlands

² Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Drug Research Center (CIRM), Université de Liège, Belgium

³ Centre for Complementary Medicine Research, University of Western Sydney, Penrith, Australia

Abstract

In our ongoing investigation into *Artemisia annua* for the treatment of malaria, we decided to study the possibility that synergism might enhance the efficacy of artemisinin. Our main objective was to test tea infusions and nonpolar extracts prepared from different *A. annua* varieties against *Plasmodium falciparum* *in vitro* in order to determine if synergism will increase the effectiveness of artemisinin in the samples as compared to pure artemisinin. We found that the IC₅₀ of artemisinin in the tea and nonpolar extracts was not significantly different to the IC₅₀ of pure artemisinin. We could show that the year and country of harvest or storage conditions did not have any influence on the activity and that it narrowly followed the concentration of artemisinin in all the extracts. In conclusion, based on these *in vitro* results, artemisinin seems to be the only active antiplasmodial compound in *A. annua*.

Key words

Artemisia annua L. · Asteraceae · artemisinin · tea infusion · *Plasmodium falciparum*

Artemisia annua L. (Asteraceae) contains the well-known antimalarial compound artemisinin (ART). The maceration of *A. annua* fresh plant material was used in China almost two thousand years before the isolation and identification of ART in the early 1970s, to treat fevers or chills [1]. It is of great importance to note that no resistance against ART has been reported in China despite its use over a very long period of time. Despite the commercialization of ART-based drugs and the use of ART combination therapies (ACTs), local populations of the most affected countries continue to drink tea infusions made from *A. annua* to treat malaria but also for the treatment of other diseases such as HIV [2]. The reason for this can be found in the social sciences – economics and trust. It is inexpensive and in a form that most third world country communities rely on. It is however claimed that synergy between ART and other components in the tea infusion will enhance the activity of ART and make the tea infusion more active than pure ART alone. If true, this could scientifically justify the traditional use. Some studies have already shown that other compounds can improve the antimalarial activity of ART [3] or exhibit some antimalarial activity alone [4].

Our study flows from the recently published WHO position statement on the effectiveness of non-pharmaceutical forms of *A. annua* against malaria. This statement contains three claims

upon which the recommendation of the WHO is based that *A. annua* in any herbal formulation should not be used to treat malaria. In short the three claims are:

1. The content of ART is variable and overall too low in *A. annua*.
2. Patients are therefore underdosed which could lead to resistance.
3. Recrudescence is unacceptably high and indicates that potential synergism between ART and other compounds are negligibly low.

The final conclusion drawn from these claims is: "Extensive fundamental and clinical research would be required to demonstrate that non-pharmaceutical forms of *A. annua*, including tea bag, are safe and effective to treat malaria and that their dissemination would not promote the development of ART-resistant parasites" [5].

Our main objective in this study was to test the tea infusions prepared from different *A. annua* varieties against *Plasmodium falciparum* *in vitro* in order to determine if synergism will increase the effectiveness of ART in the tea infusions as compared to pure ART. Additionally, we also tested nonpolar extracts from *A. annua*. To determine if synergism plays a significant role, we prepared tea infusions and chloroform extracts from 16 plants of *A. annua* and two plants of *Artemisia afra* Jacq. Ex Willd. (Asteraceae) (► Table 1) and tested their *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum* (3D7). The inclusion of *A. afra* can be considered as a negative control because this plant does not contain ART but possesses other similar chemical constituents [6, 7], and it is being used in the treatment of malaria [8]. ► Table 2 shows the IC₅₀ of the tea infusions and chloroform extracts, the concentration of ART in each sample, and the calculated IC₅₀ of ART in each sample. From ► Table 2, it can be seen that the *A. annua* tea samples and chloroform extracts with the lowest content of ART (samples 10, 11, and 12) are the least active against *P. falciparum* (IC₅₀ > 1.5 µg/mL for the teas and IC₅₀ > 0.500 µg/mL for the chloroform extracts). The *A. afra* teas were inactive at the highest concentration tested (IC₅₀ > 25 µg/mL), whereas the *A. annua* teas had an average IC₅₀ of 0.75 µg/mL. In these samples, the IC₅₀ of the calculated ART varies between 2.52 ng/mL and 6.61 ng/mL with an average of 4.97 ng/mL. This value is close to that found for pure ART (5.48 ng/mL). Taking into account the inherent variability of the bioassay and sample preparation, there appears to be no significant difference between the IC₅₀ of pure ART and ART in the tea infusion except for sample 1 (IC₅₀ = 2.52 ng/mL). However, the IC₅₀ of pure ART varies between 3.27 ng/mL and 6.11 ng/mL from one test series to another. Based on this variation, we can conclude that the IC₅₀ of ART in the tea infusions is similar to that of pure ART.

The *A. annua* chloroform extracts had an average IC₅₀ of 0.18 µg/mL, and the calculated ART in these samples had an average IC₅₀ of 5.27 ng/mL. The chloroform extracts therefore follow the same trend as was observed for the tea infusions, in that ART appears to be the only active compound. The *A. afra* chloroform extracts had an average IC₅₀ of 11.02 µg/mL. Despite the fact that this plant does not contain ART, its chloroform extract does however show some antiplasmodial activity albeit in an order of magnitude lower than *A. annua*. This data confirms those previously described [7] and suggests that other compounds in *A. afra* also exhibit some *in vitro* antiplasmodial activity. According to these observations, it can be concluded that the *A. afra* tea is not active against *P. falciparum* *in vitro* and the *in vitro* activity of ART in the *A. annua* tea seems not to be improved by other compounds.

Table 1 Origin of *A. annua* and *A. afra** plant material used in this study.

Sample	Country of cultivation	Harvest period	Plant parts (dried)	Origin of seeds (breeding program)
1	South Africa	1999	leaves/flowers	Anamed
2	South Africa	2002	leaves/flowers	Anamed
3	South Africa	2006	leaves	Anamed
4	Tanzania	2006	leaves	Anamed
5	Cameroon	2007	leaves	Anamed
6	Germany	2007	leaves	Anamed
7	Mozambique	2007	leaves	Anamed
8	Germany	2009	leaves	Anamed
9	Germany	2010	leaves	Anamed
10	Belgium	2009	leaves	Téi vum Séi
11	Luxembourg	2011	leaves	Téi vum Séi
12	Luxembourg	2011	leaves/flowers	Téi vum Séi
13	Burundi	2010	leaves	Anamed
14*	Uganda	2009	leaves	Collected
15	Burundi	2010	leaves	Anamed
16	Cameroon	2009	leaves	CIPCRE
17	Congo	2010	leaves	Anamed
18*	South Africa	2011	leaves	Botanical garden, Univ. of Pretoria

Table 2 IC₅₀ values of the extracts and ART in the different *A. annua* and *A. afra*† teas and chloroform extracts. Pure ART had an average IC₅₀ of 5.48 ± 1.54 ng/mL.

Sample	Tea infusions			Chloroform extracts		
	Sample IC ₅₀ (µg/mL)	ART IC ₅₀ (ng/mL)	[ART] (µg/mL)	Sample IC ₅₀ (µg/mL)	ART IC ₅₀ (ng/mL)	[ART] (µg/mL)
1	0.53 ± 0.09	2.52 ± 0.32*	13.42	0.10 ± 0.01	5.74 ± 0.28	152.7
2	0.80 ± 0.03	5.11 ± 0.45	17.93	0.21 ± 0.01	6.80 ± 0.18	118.9
3	0.30 ± 0.01	4.74 ± 0.23	71.59	0.06 ± 0.00	7.93 ± 0.29*	356.2
4	0.53 ± 0.04	5.02 ± 0.25	38.39	0.13 ± 0.00	4.12 ± 0.03	179.6
5	0.36 ± 0.06	4.26 ± 1.01	48.78	0.06 ± 0.00	5.45 ± 0.06	234.5
6	0.38 ± 0.01	4.94 ± 0.36	64.31	0.03 ± 0.00	3.30 ± 0.29	320.7
7	0.55 ± 0.03	4.19 ± 0.20	32.15	0.10 ± 0.02	5.13 ± 0.76	177.2
8	0.32 ± 0.05	5.23 ± 0.26	58.24	0.05 ± 0.00	6.45 ± 0.37	417.4
9	0.39 ± 0.00	4.67 ± 0.30	44.82	0.06 ± 0.00	7.09 ± 0.30	263.1
10	2.69 ± 0.10	6.61 ± 2.64	8.44	0.79 ± 0.05	6.18 ± 0.41	21.18
11	2.32 ± 0.28	5.41 ± 0.41	8.36	0.52 ± 0.04	5.18 ± 0.38	22.82
12	1.70 ± 0.34	5.27 ± 0.46	11.14	0.50 ± 0.02	3.26 ± 0.10*	29.11
13	0.36 ± 0.01	4.85 ± 0.31	58.29	0.05 ± 0.00	3.55 ± 0.15	284.2
14†	> 25.00	nd	nd	11.66 ± 0.31	nd	nd
15	0.27 ± 0.00	5.20 ± 0.37	87.02	0.06 ± 0.01	4.62 ± 0.40	417.6
16	0.25 ± 0.00	6.15 ± 0.12	117.2	0.05 ± 0.00	4.07 ± 0.19	550.3
17	0.27 ± 0.04	5.30 ± 0.03	64.09	0.06 ± 0.00	5.44 ± 0.04	336.7
18†	> 25.00	nd	nd	10.37 ± 1.01	nd	nd

nd = not detected; * Denotes a significant difference (p < 0.005) with the IC₅₀ value of pure ART

We do however need to be very careful in interpreting these findings. This analysis excluded the possibility that there are any obvious or easy to find compounds with direct activity against a specific life cycle phase of *P. falciparum*. There are however numerous points to consider, for example:

1. Due to the availability of *A. annua* we used relatively old plant material (> 1 year) as opposed to the recommendation that fresh plant material should be used. Antiplasmodial compounds such as pyrethrins [9] which are known to be present in *A. annua* [10] and are known to be photosensitive would be degraded in the material that we used. Upon testing all the samples for the presence of these compounds, we could not detect any (data not shown).
2. Our bioassay targets the erythrocyte phase of the parasite, hence any potentially active compounds against other phases of the life cycle will not be detected.

3. The analysis does not take into account that the tea infusion may contain "prodrugs" – compounds that become active only after metabolization.

In conclusion we investigated the claim that synergism enhances the activity of *Artemisia* tea. Our results indicate that in the bioassay used, ART appears to be the only antiplasmodial compound in the tea and the chloroform extracts. Very recently, two other studies were published reporting on the activity of the *A. annua* tea infusion against *P. falciparum*. In the first one [11], they found that the tea infusions were up to three times more active compared to ART alone against chloroquine-sensitive (D10) and -resistant (W2) strains, while in the second one [12], they found that no synergism occurred and that the infusion was equally active to ART alone against field isolates of *P. falciparum* (chloroquine-resistant). Our study confirms the finding in [12] and expands on it by the inclusion of 16 different *A. annua* samples and testing of

their tea infusions and nonpolar extracts against chloroquine-sensitive strains of *P. falciparum*. Although all three studies ([11, 12], current study) show similarities (tea infusions being tested) and differences (different *P. falciparum* strains used, different quantification techniques used to quantify ART in tea infusions), the overall results are remarkably similar with one study leaning towards synergism [11], while the other two ([12], current study) lean towards the tea infusion having no or little synergistic effect. However, before we can claim that there is (no) synergism occurring in the tea infusion, we have to test the above-mentioned points, and particularly, *in vivo* assays have to be conducted.

Materials and Methods

Table 1 gives the origin of all the plant material used in this study. All plant material obtained from Anamed was identified by Dr. Hans-Martin Hirt (Anamed International). Samples 10–12 were developed by a commercial gardening center in Luxemburg, Têi vum Séi, and was certified by the Ministry of Agriculture of Luxemburg. Sample 16 was certified by CIPCRE as *A. annua*. *A. afra* (sample 14) was collected in Uganda in 2009, and sample 18 in the Botanical garden of the University of Pretoria, South Africa in 2011.

The tea samples were prepared according to the method previously described [13]. The chloroform extracts were prepared by extracting 200 mg of dried plant material with 5 mL of chloroform. These samples were sonicated for 30 min, filtered and transferred into HPLC vials (duplicate). The chloroform was evaporated under nitrogen gas. All dried extracts were weighed, and one sample of each duplicate was evaluated for the antiplasmodial activity testing. The duplicate samples were kept for ART quantification which took place on the same day as the antiplasmodial testing.

The ART concentration was determined as previously described using HPLC-ELSD analysis [14]. The antiplasmodial bioassays were performed on the erythrocyte phase of the parasite *Plasmodium falciparum* 3D7 (chloroquine-sensitive strain) as previously described [7]. Pure ART (Sigma-Aldrich, 98% purity, cat. nm. 361593–100MG) was used as a positive control. The medium containing parasitized red blood cells was used as a positive growth control and the medium alone as a negative growth control. The samples were dissolved in DMSO (for the chloroform extracts) or in 10% ethanol (for the tea infusions) in order to obtain a stock concentration of 5 mg/mL. References and samples were then diluted with medium in a series of twofold dilutions (tea) or fourfold dilutions (chloroform extract).

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (grant 3.4533.10).

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- De Ridder S, Van der Kooy F, Verpoorte R. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 302–314
- Lubbe A, Seibert I, Klimkait T, Van der Kooy F. Ethnopharmacology in overdrive: the remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. *J Ethnopharmacol* 2012; 141: 854–859
- Elford BC, Roberts MF, Phillipson JD, Wilson RJ. Potentiation of the anti-malarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 434–436
- Liu K, Yang SL, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Rep* 1992; 11: 637–640
- WHO Report, 2012. WHO position statement on effectiveness of non-pharmaceutical forms of *Artemisia annua* L. against malaria. Available at http://www.who.int/malaria/position_statement_herbal_remedy_artemisia_annua_1.pdf; Assessed November 19, 2012
- Van der Kooy F, Verpoorte R, Meyer JJM. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. *S Afr J Bot* 2008; 74: 186–189
- Liu NQ, Cao M, Frédéric M, Choi YH, Verpoorte R, Van der Kooy F. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 230–235
- Liu NQ, Van der Kooy F, Verpoorte R. *Artemisia afra*: A potential flagship for African medicinal plants? *S Afr J Bot* 2008; 75: 185–195
- Hata Y, Zimmermann S, Quitschau M, Kaiser M, Hamburger M, Adams M. Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of pyrethrins and pyrethroids. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 9172–9176
- Singh A, Sarin R. Pyrethrins from *in vivo* and *in vitro* cultures of *Artemisia annua*. *Indian J Environ Sci* 2011; 15: 35–37
- De Donno A, Grassi T, Idolo A, Guido M, Papadia P, Caccioppola A, Villanova L, Merendino A, Bagordo F, Fanizzi FP. First-time comparison of the *in vitro* antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 696–700
- Rocha e Silva LF, Melillo de Magalhães P, Costa MRF, das Graças Costa Alecrim M, Chaves FCM, de Freitas Hidalgo A, Pohlit AM, Vieira PPR. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* Welch field isolates to infusions prepared from *Artemisia annua* L. cultivated in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107: 859–866
- Van der Kooy F, Verpoorte R. The content of artemisinin in the *Artemisia annua* tea infusion. *Planta Med* 2011; 77: 1754–1756
- Liu NQ, Choi YH, Verpoorte R, Van der Kooy F. Comparative quantitative analysis of artemisinin by chromatography and qNMR. *Phytochem Anal* 2010; 21: 451–456

received November 21, 2012

revised January 29, 2013

accepted February 8, 2013

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328324>

Published online

Planta Med

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ·

ISSN 0032-0943

Correspondence

Dr. Frank van der Kooy

Centre for Complementary Medicine Research

University of Western Sydney

Locked Bag 1797

Penrith

NSW 2751

Australia

Phone: + 61 2 46203136

Fax: + 61 2 46203291

f.vanderkooy@uws.edu.au



Antisickling properties of divanilloylquinic acids isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae)

B. Ouattara^{a,c,1}, O. Jansen^{b,*,1}, L. Angenot^b, I.P. Guissou^a,
M. Frédérick^b, P. Fondu^d, M. Tits^b

^aInstitut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Département Médecine Pharmacopée Traditionnelle, Pharmacie 03 BP 7192 Ouagadougou 03, Burkina Faso

^bUniversité de Liège, Laboratoire de Pharmacognosie, Centre Interfacultaire de Recherche sur le Médicament (CIRM), CHU, Tour 4, B 36, Avenue de l'Hôpital 1, B-4000 Liège, Belgium

^cUniversité Libre de Bruxelles, Institut de Pharmacie, B-1050 Bruxelles, Belgium

^dUniversité Libre de Bruxelles, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Universitaire Brugman, B-1050 Bruxelles, Belgium

Abstract

Fagara zanthoxyloides Lam. (syn. *Zanthoxylum zanthoxyloides*) (Rutaceae) is the most cited *Fagara* species for the treatment and the prevention of sickle cell disease crisis. Sickle cell anemia (SCA) is a public health problem in many countries particularly in Africa. The present study was designed to evaluate the antisickling properties of three isomeric divanilloylquinic acids (3,4-O-divanilloylquinic acid or burkinabin A; 3,5-O-divanilloylquinic acid or burkinabin B and 4,5-O-divanilloylquinic acid or burkinabin C) identified previously by LC/MS/NMR analysis in the root bark of *F. zanthoxyloides* [Ouattara et al., 2004. LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. Phytochemistry 65, 1145–1151].

The three isomers showed interesting antisickling properties which increased from burkinabins A to C.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Sickle cell disease; *Fagara zanthoxyloides*; Rutaceae; Divanilloylquinic acids; Burkinabins A, B, C

Introduction

The root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae) (syn. *Zanthoxylum zanthoxyloides*) is widely used in folk medicine for its antisickling properties in Burkina Faso and other West African countries (Ouattara et al., 1992; Adjanooun et al., 1986, 1989; Bossokpi, 2003). Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease, the symptoms of which result from an ultimate aggregation of hemoglobins (Hb) in the Hb SS

erythrocytes due to lowered oxygen tension, resulting in the characteristic distorted sickled shapes (Adesanya and Sofowora, 1983). Many publications have already described the effects of this *Fagara* species on drepanocytic erythrocytes (Sofowora and Isaacs, 1971; Sofowora et al., 1975; Adesanya and Sofowora, 1983; Elujoba et al., 1989). In those previous works, the active compounds have been identified as benzoic acid derivatives and mainly protocatechuic acid, p-OH-benzoic acid, vanillic acid, syringic acid and ferulic acid. In our precedent study (Ouattara et al., 2004) we did not find those compounds in considerable amounts in the samples collected in Burkina Faso. They mainly contained vanillic acid derivatives. The most active

*Corresponding author. Tel.: +324 366 43 40; fax: +324 366 43 32.

E-mail address: ojansen@ulg.ac.be (O. Jansen).

¹These authors contributed equally to this work.

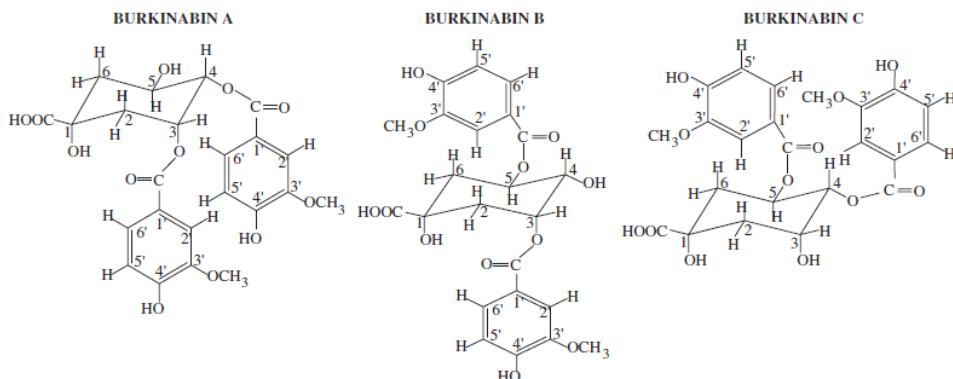


Fig. 1. Structure of burkinabins A, B, C.

antiskicking fraction contained especially three new isomeric divanilloylquinic acids called burkinabins A, B and C (Fig. 1).

Materials and methods

Plant materials

The root barks of *Fagora zanthoxyloides* Lam. (syn. *Zanthoxylum zanthoxyloides*) were collected in Burkina Faso (30 km in the South of Bobo Dioulasso) by one of us (B.O.). They were authenticated by the Botany Department Staff of the “Institut de Recherche en Sciences de la Santé” (IRSS) of Burkina Faso and voucher specimens No. 2001/0504 were deposited in the Herbarium of the IRSS and in the Laboratory of Pharmacognosy of the University of Liège (Belgium). The root barks were washed, chopped into small pieces, dried under a ventilated entrance hall and then powdered.

Extraction and isolation

A quantity of powdered root barks (500 g) was macerated with 1000 ml of ethanol/water (50:50) and then percolated with 4000 ml of the same solvent at room temperature. The extract was concentrated under reduced pressure until 1000 ml. This aqueous suspension was basified to pH 8 with Na₂CO₃ and repeatedly extracted with diethyl ether. The aqueous solution was then acidified with 4% acetic acid. The resulting acidic (pH 3) solution was repeatedly extracted with ethyl acetate. This last organic extract solution was dried over Na₂SO₄ and then the organic solvent removed off. This ethyl acetate extract (1.82 g) containing burkinabins A–C was stocked at 4 °C.

Preparation of the sample for preparative HPLC

Ethyl acetate extract of 515 mg was dissolved in 3 ml of methanol to which 6 ml of 0.05% TFA was added which caused partial precipitation of the extract. The sample was centrifuged and filtered before injection.

Chromatographic separation

A preparative HPLC system including a column Lichrospher 25 × 200 mm filled with a stationary phase 100 RP-18; an Armen pump instrument model AP-100 and a collector of fractions L-5200 Hitachi was used. As mobile phase, a binary gradient with two solvents (A = 0.05% of TFA in water and B = acetonitrile) was used (0 min 100% A and 30 min 60% A). The flow rate was set to 30 ml min⁻¹.

Collection of the fractions

The chromatographic fractions were collected for 30 min and 90 tubes were obtained, each containing 10 ml of solution.

Isolation and structure confirmation

Burkinabins A, B and C were collected at 17, 19 and 20 min. of retention time, respectively. After verification by HPLC analysis that the separation of the three isomers was efficient, the fractions containing the separated burkinabins A, B and C were extracted three times with ethyl acetate and this last solvent was evaporated under reduced pressure.

The identification of each constituent was confirmed by spectroscopic method (UV, MS and NMR) as described by Ouattara et al. (2004).

From 515 mg of ethyl acetate extract, 19.6, 10.0 and 39.2 mg of burkinabins A, B and C were isolated, respectively. Total burkinabins (A, B and C) represent 13.4% (w/w) of ethyl acetate extract.

Antisickling assays

Patient selection

For the antisickling test, patients with severe SCA were followed at the “Hôpital Universitaire Brugmann” Brussels (Belgium). The protocol of the study was approved by the Hospital Ethic Committee. Oral informed consent was obtained from patients and their legal guardians.

Blood collection and erythrocytes preparation

Blood samples (5 ml), taken by venipuncture in EDTA-rinsed Vacutainer tubes (Beckton–Dickinson), were centrifuged for 15 min at 250g to discard the plasma and buffy coat. Red cells were washed three times in twice their volume of a non-deoxygenated phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) by successive centrifugations and supernatant aspirations. After washing, the packed erythrocytes were suspended in twice their volume of PBS (Fall et al., 1998, 1999).

Drugs and control solutions

Sodium cromoglycate was used as control (Fall et al., 1998). The strong antisickling effects of sodium cromoglycate were confirmed in patients with sickle cell disease (Toppet et al., 2000).

Appropriate amounts of cromoglycate Na and burkinabins were obtained by dissolving each drug in PBS (Table 2).

Deoxygenating device

The apparatus included a gas-containing tank (5% CO₂ in N₂) connected with a flexible duct to a 50 ml glass flask half-filled with water and a 10 ml glass tube connected to the flask with a ground-glass joint. The lower parts of both flask and tube were immersed in a thermostatic bath maintained at 37 °C. The pressure and flow-controlled gas were pre-humidified by bubbling into the 50 ml flask. For the test with drugs or extract, 100 µl of drug or extract solutions were added to 50 µl of PBS and 50 µl of erythrocyte suspension. For PBS test, 50 µl of erythrocyte suspension was added to 150 µl of PBS. They were incubated in a sealed vial for 60 min at 37 °C; the suspension was then transferred into the tube and the humidified gas was bubbled into the preparation for 30 min at a constant flow rate of 3 ml min⁻¹ (Fall et al., 1998).

Sickle cells imaging and counting

After the deoxygenating period, one drop of the suspension was deposited on a microscope slide and, within 15 s, the wet preparation was protected against re-oxygenation with a cover slip sealed with a varnish before further examination. Images were taken at five different areas (left, centre, right, top and bottom) using a video-camera connected to a microscope and a computer running with an image editing software (Fall et al., 1998, 1999).

Results and discussion

The preparative HPLC method allowed separation and isolation of the three isomeric compounds. Each burkinabin was then tested for antisickling properties.

Results are presented in Table 1 for ethyl acetate extract and in Table 2 for isolated burkinabins. Cromoglycate was used as reference drug (Table 2).

Fig. 2 shows the log curves of drug concentration versus percentage of sickle cell for burkinabins and cromoglycate.

Our results confirm the interest of *F. zanthoxyloides* in sickle cell disease management and the presumed role played by burkinabins A, B and C in the antisickling activity of crude extract as described by Ouattara et al. (2004).

Indeed, if cromoglycate had higher activity at low concentration, 0.5 µmol ml⁻¹, burkinabins, especially burkinabin C, the most abundant burkinabin in the plant, had the same range of activity as cromoglycate taken as reference. It is the first report of the antisickling properties of these divanilloylquinic acid derivatives.

According to Elujoba and Sofowora (1977), antisickling compounds in *Fagara* species need a single benzene ring, a carboxylic acid and an electron rich grouping in the benzoic acid series. Our study agrees with these data but showed that compounds with two aromatic rings are also active.

Nevertheless, other compounds in the plant could also participate in the antisickling activity. Especially, previous studies attributed antisickling properties to other phenolic acid compounds as reviewed by Adesina (2005)

Table 1. Antisickling properties of ethyl acetate extract^a.

Conc. (mg ml ⁻¹)	% Sickle cells ethyl acetate extract
0	66.6 ± 0.8
0.125	41.0 ± 1.3
0.25	26.3 ± 1.0
0.5	20.1 ± 0.8
1	14.7 ± 1.1
2	13.1 ± 1.1

^aData from Ouattara et al. (2004).

Table 2. Antisickling properties of burkinabins A–C^a.

Conc. (μmol ml ⁻¹)	Conc. (mg ml ⁻¹) cromoglycate (MW = 512)	Conc. (mg ml ⁻¹) burkinabins (MW = 492)	% Sickle cells			
			Burkinabin A	Burkinabin B	Burkinabin C	Cromoglycate
0	0	0	66.4 ± 1.2	67.3 ± 2.5	65.5 ± 1.4	67.1 ± 0.9
0.125	0.064	0.061	62.2 ± 1.9	59.9 ± 3.1	40.9 ± 1.8	35.4 ± 1.3
0.25	0.128	0.123	40.9 ± 2.6	36.0 ± 1.2	28.2 ± 2.8	27.9 ± 0.9
0.5	0.256	0.245	35.7 ± 1.4	31.2 ± 1.6	20.8 ± 1.3	20.5 ± 1.5
1	0.512	0.491	28.1 ± 2.0	22.3 ± 2.0	14.6 ± 1.1	18.8 ± 1.2
2	1.024	0.982	19.0 ± 1.1	16.7 ± 1.4	12.5 ± 1.0	17.3 ± 0.8
4	2.048	1.964	15.3 ± 1.0	14.3 ± 0.9	11.4 ± 0.8	16.0 ± 0.7

^aEach value represents the percentage of sickle cells on the microscope slide (SD (n = 5)).

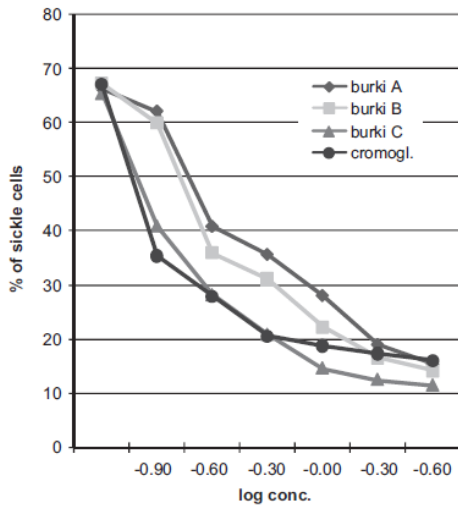


Fig. 2. Evolution of erythrocyte sickling percentage after treatment with burkinabins at increasing concentrations.

but these compounds were only found in minute amount in our sample.

On the other hand, hesperidin, isolated from a Malian specimen of *F. zanthoxyloides* also containing burkinabins (Queiroz et al., 2006), was also identified in our sample by HPLC analysis but not isolated. This compound certainly played a role in the antisickling activity of the extract, as described for other flavonoids by Cesquini et al. (2003).

Finally, minor peaks observed in our HPLC analysis (corresponding notably to other vanillic acid derivatives, probably monomers) have still to be isolated, identified and tested for their antisickling activity. One of these peaks could also be zanthoxylol, a phenolic compound previously identified by Eshiett and Taylor (1968) and

which is present only in the *F. zanthoxyloides* species from *Fagara* genus (Elujoba and Nagels, 1985). This compound and especially its synthetic derivative DBA (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-butyric acid) have been shown to have potent antisickling and desickling activities (Ekong et al., 1975).

The multiplicity of phenolic compounds isolated from *F. zanthoxyloides* and the fact that many of them exhibit antisickling properties comparable to the total extract activity, highly suggest that synergies exist between different aromatic compounds concerning the antisickling activity.

Recent studies have demonstrated that an aqueous extract of *Zanthoxylum macrophylla* (syn. of *Fagara zanthoxyloides* according to the authors) stabilizes the red cell membrane (Elekwa et al., 2005a). The same aqueous extract also activates the red cells membrane-bound enzymes Na⁺, K⁺-ATPase and Ca⁺⁺-ATPase, which are involved in the sickling process (Elekwa et al., 2005b). It would be interesting to evaluate if the activity of burkinabins and not yet identified derivatives is mediated by these mechanisms.

Moreover, it is important to report that burkinabins are also present in the decoction which is the form used in traditional practices. The absence of toxicity of the aqueous extract of *F. zanthoxyloides* was clearly shown by different authors (Bossokpi, 2003).

All these findings support the traditional use of *F. zanthoxyloides* and would encourage the development of “improved traditional medicines” containing this plant in sickle cell disease management. Analytical requirements for commercial samples of *Fagara zanthoxyloides* to be used in producing antisickling preparations need to give some indications about acid contents (in the antisickling fraction) particularly their amount and identity.

Chemical complexity and promising antisickling properties of *Fagara zanthoxyloides* and its isolated compounds warrant our further studies about this African plant.

Acknowledgements

The authors wish to warmly thank professors M. Hanocq, A. Mões, K. Amighi, J. Dubois and V. Henschel from ULB and Mr. J-N Wauters and Miss B. Gavage from ULG for their active participation in the realization of this project. Research was financed by the “Conseil Interuniversitaire de la Communauté Française de Belgique” (CIUF) through the “Coopération Universitaire au Développement” (CUD) in the framework of the PIC project established by Prof. Hanocq (ULB, Institut de Pharmacie) and entitled “Recherche et développement de phytomédicaments pour les maladies prioritaires issus de la pharmacopée traditionnelle au Burkina Faso” (2000–2005). M.F. is a Research Associate from the Belgian national fund for Scientific Research (FNRS).

References

- Adesanya, S.A., Sofowora, A., 1983. Biological standardisation of *Zanthoxylum* roots for antisickling activity. *Planta Medica* 48, 27–33.
- Adesina, S.K., 2005. The Nigerian *Zanthoxylum*; chemical and biological value. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2 (3), 282–284.
- Adjanohoun, E., Alyi, A.M., Aké Assi, L., Baniakina, J., Chibon, P., Cusset, G., Doulou, V., Enzanza, A., Eymé, J., Gondoté, E., Kéita, A., Mbemba, C., Mollet, J., et al., 1986. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. ACCT éd., Paris, p. 327, ISBN:92-9028-096.4.
- Adjanohoun, E., Alyi, A.M., Aké Assi, L., Baniakina, J., Chibon, P., Cusset, G., Doulou, V., Enzanza, A., Eymé, J., Gondoté, E., Kéita, A., Mbemba, C., Mollet, J., et al., 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Bénin. ACCT éd., Paris, p. 481, ISBN:92-9028-152.9.
- Bossokpi, I., 2003. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae), Pharmacy Thesis, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, University of Bamako, Mali.
- Cesquini, M., Torsoni, M.A., Stoppa, G.R., Ogo, S.H., 2003. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57 (3–4), 124–129.
- Ekong, D.E.U., Okogun, J.I., Enyenihi, V.U., Balogh-Nair, V., Nakanishi, K., Natta, C., 1975. New antisickling agent 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1 benzopyran-6-butyrac acid. *Nature* 258, 243–247.
- Elekwa, I., Monanu, M.O., Anosike, E.O., 2005a. Effects of aqueous extracts of *Zanthoxylum macrophylla* roots on membrane stability of human erythrocytes of different genotypes. *Biokemistri* 17 (1), 7–12.
- Elekwa, I., Monanu, M.O., Anosike, E.O., 2005b. *In vitro* effects of aqueous extracts of *Zanthoxylum macrophylla* roots on adenosine triphosphatases from human erythrocytes of different genotypes. *Biokemistri* 17 (1), 7–12.
- Elujoba, A.A., Nagels, L., 1985. Chromatographic isolation and estimation of zanthoxylol: an antisickling agent from the roots of *Zanthoxylum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 3 (5), 447–451.
- Elujoba, A.A., Sofowora, E.A., 1977. Detection and estimation of total acid in the antisickling fraction of *Fagara* species. *Planta Medica* 32, 54–59.
- Elujoba, A.A., Nagels, L., Sofowora, A., Van Dongen, W., 1989. Chromatographic analysis of antisickling compounds in *Zanthoxylum* species. *International Journal of Pharmaceutics* 53 (3), R1–R3.
- Eshiett, I.T., Taylor, D.A.H., 1968. Isolation and structure elucidation of some derivatives of dimethylallylcoumarin, chromone, quinoline, and phenol from *Fagara species*, and from *Cedrelopsis grevei*. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* 5, 481–484.
- Fall, A.B., Toppet, M., Ferster, A., Fondou, P., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., 1998. *In vitro* antisickling activity of cromolyn sodium. *British Journal of Haematology* 103, 957–959.
- Fall, A.B., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., Lo, I., Toppet, M., Ferster, A., Fondou, P., 1999. *In vitro* antisickling activity of a rearranged limonoid isolated from *Khaya senegalensis*. *Planta Medica* 65, 209–212.
- Ouattara, A., Guissou, I.P., Sawadogo, A., Sawadogo, M., 1992. Etude comparée du traitement de la crise drépanocytaire par une présentation galénique moderne de deux plantes médicinales (*Fagara xanthoxyloides* Lam et *Calotropis procera* Ait) et un médicament usuel de référence (dihydroergotoxine) chez les enfants de 5 à 15 ans à l'hôpital de Ouagadougou. *Pharmacien d'Afrique* 68, 19–27.
- Ouattara, B., Angenot, L., Guissou, I.P., Fondou, P., Dubois, J., Frédéric, M., Jansen, O., Van Heugen, J.C., Wauters, J.N., Tits, M., 2004. LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. *Phytochemistry* 65, 1145–1151.
- Queiroz, E.F., Hay, A.E., Chaiib, F., van Diemen, D., Diallo, D., Hostettmann, K., 2006. New and bioactive aromatic compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica* 72, 746–750.
- Sofowora, E.A., Isaacs, W.A., 1971. Reversal of sickling and crenation in erythrocytes by the root extract of *Fagara zanthoxyloides*. *Lloydia* 34, 383–385.
- Sofowora, E.A., Isaac-Sodeye, W.A., Ogunkoya, L.O., 1975. Isolation and characterisation of an antisickling agent from *Fagara zanthoxyloides* root. *Lloydia* 38, 169–171.
- Toppet, M., Fall, A.B.K., Ferster, A., Fondou, P., Mélot, C., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., 2000. Antisickling activity of sodium cromoglycate in sickle-cell disease. *The Lancet* 356, 309–312.



**ASSOCIATION
JARDINS DU MONDE**
www.jardinsdumonde.org

Par cette charte, Jardins du Monde s'engage aux modalités suivantes :

Article 1 : s'inscrire dans le cadre de la déclaration universelle des droits de l'homme des Nations-unies (1948) qui stipule que : « Toute personne a droit à un niveau de vie suffisant pour assurer sa santé, son bien-être et ceux de sa famille, notamment pour l'alimentation, l'habillement, le logement, les soins médicaux ainsi que pour les services sociaux nécessaires. » (art. 25) ;

Article 2 : s'inscrire dans les préoccupations de l'OMS en terme de médecine traditionnelle qui « vise[nt] à promouvoir les soins de santé primaires pour permettre l'accès de tous à un niveau de santé acceptable » (déclaration d'Alma Ata, 1978). Jardins du Monde poursuit les objectifs de l'OMS, exprimés dans sa stratégie pour la médecine traditionnelle :

« ² intégrer la MTR/MCP [*médecine traditionnelle / médecine complémentaire et parallèle*] aux systèmes de soins de santé nationaux, de manière appropriée, en développant et en mettant en oeuvre des politiques et programmes nationaux de MTR/MCP

² promouvoir la sécurité, l'efficacité et la qualité de la MTR/MCP en étendant la base des connaissances sur la MTR/MCP et en fournissant des conseils sur la réglementation et les normes d'assurance qualité

² accroître la disponibilité et l'abordabilité de la MTR/MCP, de manière appropriée, en mettant l'accent sur l'accès pour les populations pauvres

² promouvoir un usage thérapeutique correct de la MTR/MCP appropriée par les prestataires et les consommateurs » ;

Article 3 : reconnaître l'inaliénabilité du vivant et des savoirs populaires s'y attachant ainsi que la propriété universelle des résultats scientifiques des recherches engagées ;

Et respecter les conventions sur la biodiversité, la propriété intellectuelle et les conventions internationales, contribuant à la sauvegarde du patrimoine et des ressources naturelles et culturelles.

Jardins du Monde intervient en s'accordant avec les principes suivants :

« *Reconnaissant* que la faune et la flore sauvages constituent de par leur beauté et leur variété un élément irremplaçable des systèmes naturels, qui doit être protégé par les générations présentes et futures;

Conscients de la valeur toujours croissante, du point de vue esthétique, scientifique, culturel, récréatif, et économique, de la faune et de la flore sauvages;

Reconnaissant que les peuples et les Etats sont et devraient être les meilleurs protecteurs de leur faune et de leur flore sauvages;

CHAPITRE 7 - ANNEXES

Reconnaissant en outre que la coopération internationale est essentielle à la protection de certaines espèces de la faune et de la flore sauvages contre une surexploitation par suite du commerce international;

Convaincus que des mesures doivent être prises d'urgence à cet effet » (CITES, 1973)

« La faune et la flore sauvages constituent un patrimoine naturel d'intérêt majeur qui doit être préservé et transmis aux générations futures. » (Convention de Berne, 1979)

Les objectifs de la convention sur la diversité biologique sont « la conservation de la diversité biologique, l'utilisation durable de ses éléments et le partage juste et équitable des avantages découlant de l'exploitation des ressources génétiques, notamment grâce à un accès satisfaisant aux ressources génétiques et à un transfert approprié des techniques pertinentes, compte tenu de tous les droits sur ces ressources et aux techniques, et grâce à un financement adéquat. » (Convention de Rio, 1992) ;

Article 4 : respecter les peuples et leur diversité culturelle en particulier dans les domaines de la conception de la santé et de la maladie ;

Article 5 : affirmer que ses actions en matière de santé n'entrent pas dans un cadre mercantile ;

Article 6 : intégrer et développer les notions liées au développement durable dans l'étude, la gestion et la production de phytomédicaments ;

Article 7 : viser l'autonomie alimentaire, sanitaire et thérapeutique des populations ;

Article 8 : collaborer avec des communautés, collectivités, organisations publiques, personnes privées oeuvrant à l'intérêt général ;

Article 9 : échanger et partager équitablement les informations à caractère scientifique avec les partenaires sur le terrain, sous forme de publication ;

Et restituer aux populations locales le résultat du travail réalisé selon la démarche de l'ethnopharmacologie dans un but de la ré-appropriation de ces savoirs ;

Article 10 : se conformer aux critères scientifiques d'élaboration de phytomédicaments ;

Article 11 : oeuvrer dans le cadre de la solidarité entre les peuples ;

Article 12 : témoigner et informer de la réalité sanitaire de ses partenaires sur le terrain ;

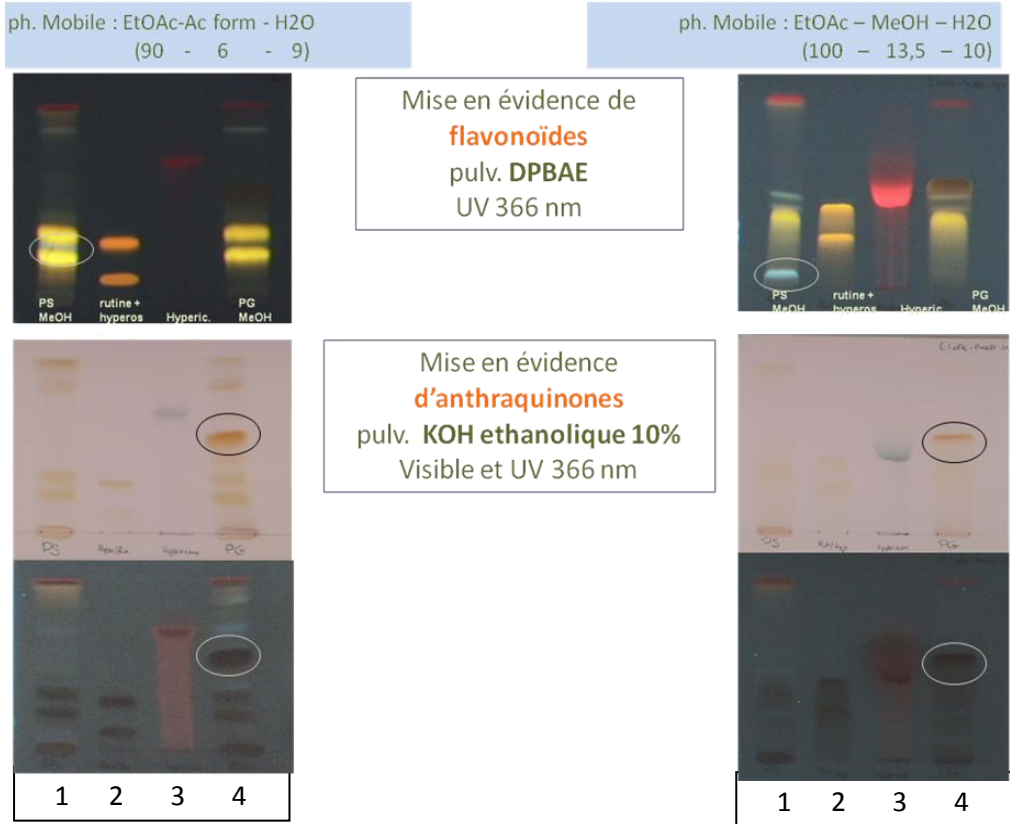
Article 13 : être une association laïque et indépendante de toute obédience politique ;

Article 14 : collaborer, sans discrimination d'aucune sorte, avec des communautés qui s'engagent à respecter cette charte.

Charte adoptée et votée à l'unanimité par l'Assemblée Générale Ordinaire de l'association réunie le 17 mars 2007 à Brasparts (29)

7.3 Comparaison par CCM de *Psorospermum senegalense* (PS) et *Psorospermum guineense* (PG)

phase stationnaire : plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck)



1. *Psorospermum senegalense* (PS) : extrait MeOH

2. Témoins : rutine + hypéroside

3. Témoin : Hypéricine

4. *Psorospermum guineense* (PG) : extrait MeOH

7.4 Screening phytochimique : Mode opératoire

Alcaloïdes

Test général en milieu acide

0,3 g de poudre de drogue est introduit dans un erlenmeyer et additionné de 3 ml d'acide chlorhydrique dilué à 5%. On bouche et on laisse sous agitation pendant 30 minutes. On filtre et on recueille le filtrat. Sur 1 ml de filtrat introduit dans un tube à essai, on ajoute 5 gouttes de **réactif de Mayer**. La présence d'alcaloïdes se marque par l'apparition d'un **précipité** ou **trouble blanc**.

Chromatographie sur couche mince (Si test général positif)

1 g de poudre de drogue est macéré avec environ 1 ml d'ammoniaque à 10% dans un erlenmeyer, 5 ml d'acétate d'éthyle (ou méthanol pour extraire les quaternaires) sont ajoutés et on laisse sous agitation pendant 30 minutes. 20 µl et 50 µl du filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM.

Phase mobile : Dichlorométhane-méthanol-ammoniaque 25% (8:2:0,5)

Témoin : quinine 5 mg/ml dépôt : 10 µl

Le chromatogramme, une fois développé, est observé sous UV à 254 et 366 nm puis est pulvérisé à l'aide du **réactif de Dragendorff** et observé en lumière visible. La présence d'alcaloïdes se marque par la présence de **spots** allant du **jaune-orange** au **jaune-brun**.

Flavonoïdes et acides phénols

1 g de drogue pulvérisé est extrait sous agitation par 5 ml de méthanol durant 10 minutes. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM. **Attention cette solution est réutilisée pour le test des iridoïdes, des anthraquinones et des saponines !!!**

Phase mobile : acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique glacial-eau (100:11:11:26)

Témoin : rutine et acide caféique 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Le chromatogramme, une fois développé, est observé sous UV à 254 et 366 nm puis est pulvérisé à l'aide du **réactif DPBAE/PEG** et observé sous UV à 366 nm.

La présence de **flavonoïdes** se marque par la présence de **spots fluorescents de couleurs diverses (jaune-orange-vert)** variant en fonction de la structure des composés mis en évidence. Les **fluorescences bleues** sont souvent dues à des **acides phénols**.

Iridoïdes

On utilise la solution préparée au test des flavonoïdes.

Dépôts de 20 et 50 µl.

Phase mobile : acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:13,5:10)

Témoin : loganoside 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Révélation : acide sulfurique à 5% dans l'éthanol. Chauffage 10 minutes à 100°C.

Les **iridoïdes vrais** donnent des **colorations**. Les **autres terpènes** se colorent en **noir**.

Anthraquinones (hétérosides anthracéniques)

Réaction de coloration

On ajoute à 100 mg de drogue pulvérisée 50 ml d'eau et 2 ml d'HCl concentré. On chauffe au bain-marie 15 minutes. Refroidir et agiter avec 40 ml d'éther. Séparer la couche étherée, la sécher sur sulfate sodique anhydre et l'évaporer à siccité. Au résidu, ajouter 5 ml d'ammoniaque diluée R1 (100 g/ litre ; 41 g d'ammoniaque concentrée portée à 100 ml avec de l'eau). En cas de réaction positive, il se développe une **coloration jaune** ou **orangée**. Chauffer au bain-marie pendant 2 minutes. Il se développe une **coloration violet-rouge**.

Chromatographie sur couche mince (si test de coloration positif)

On utilise la solution préparée lors du test des flavonoïdes. Dépôts de 20 et 50 µl.

Phase mobile : acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:13,5:10)

Témoin : franguloside ou autre O-hétéroside 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Révélation : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Pulvérisation de KOH éthanolique à 10%.

Les **anthraquinones** sont colorées en **rouge** et donnent une **fluorescence rouge** à 366 nm. Les **anthrones** (aloïne) donnent une couleur **jaune**.

Terpènes

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation par 10 ml de dichlorométhane durant 15 minutes sous reflux (au bain-marie). Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est dissous dans 0,5 ml de toluène. Dépôt de 20 µl. **Témoin** : thymol 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Phase mobile : toluène-acétate d'éthyle (93:7)

Révélation : Vanilline sulfurique. Chauffage 10 minutes à 100°C.

Les terpènes donnent **diverses couleurs** avec ce réactif.

Coumarines

On utilise la solution préparée au test des terpènes. Dépôt de 20 µl.

Phase mobile : toluène-éther (1:1, saturé avec du HAc 10%). Mélanger 10 ml de toluène, 10 ml d'éther et 10 ml d'acide acétique à 10% dans une ampoule à décanter. La phase inférieure est éliminée, la phase supérieure est utilisée comme phase mobile.

Témoin : scopolétine 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Révélation : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Pulvérisation de KOH éthanolique à 10%. Les coumarines donnent une **fluorescence bleue**.

Saponines

Test général

Introduisez 0,5 g de poudre dans une fiole conique de 200 ml renfermant 50 ml d'eau bouillante. Maintenez une ébullition modérée durant 30 minutes (reflux). Filtrez. Dans 2 tubes à essai de 16 mm de diamètre et de 16 cm de haut, mesurez 1 et 10 ml de décocté et ajuster à 10 ml avec de l'eau distillée. Agitez pendant 15 secondes en bouchant le tube,

laissez reposer 15 minutes, puis mesurez la hauteur de mousse. La présence de saponosides se marque par une **hauteur de mousse supérieure à 1 cm dans un des tubes**. Cette solution sera réutilisée pour le test des tanins et des anthocyanes.

Chromatographie sur couche mince (si test indice de mousse positif)

Réduisez 3-4 ml de solution méthanolique obtenue lors du test des flavonoïdes et acides phénols à 0,5 ml, mélangez ce ml avec 1 ml d'eau distillée et extrayez par 3 ml de n-butanol saturé d'eau. Utilisez cette solution pour la CCM. Dépôts de 20 et 100 µl.

Phase mobile : Dichlorométhane-acide acétique glacial-méthanol-eau (64:32:12:8)

Témoin : aescine 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 20 µl

Révélation : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Vanilline sulfurique. Chauffage 10 minutes à 100°C.

Les saponines donnent **diverses couleurs** (bleu, bleu-violet, rouge) avec ce réactif.

Stéroïdes et triterpénoïdes (y compris les saponosides et les cardénolides)

Nous effectuons cette recherche à partir d'une teinture au 1/10^{ème} de la drogue dans l'éthanol à 70°. Ajouter à 10 ml de teinture, 10 ml d'eau et 2 ml d'acétate de plomb à 10%. Laisser reposer 15 minutes, filtrer, ajouter 2 ml de solution aqueuse de phosphate disodique à 10% ; repos 15 minutes ; filtrer et recueillir le filtrat dans une ampoule à décanter ; extraire la solution à 3 reprises par 5 ml de dichlorométhane. Les solutions CH₂Cl₂ sont filtrées sur sulfate sodique anhydre. Le filtrat est divisé en 3 fractions qui sont évaporées à siccité.

- a. Le résidu est solubilisé dans quelques gouttes d'acide acétique et additionné de 3 ml d'un mélange anhydre acétique-acide sulfurique concentré 50:1. Une coloration violette à bleue ou verte indique une réaction positive. **Bleu-vert** : *génine stéroïdique* ; **rose à rouge** : *génine triterpénique* (réaction de LIEBERMANN).
- b. Réaction de KEDDE pour les cardénolides : on ajoute au résidu 2 gouttes d'une solution alcoolique d'acide dinitrobenzoïque à 3% et 2 gouttes de NaOH N. Une **coloration rouge pourpre** indique une réaction positive.
- c. La troisième fraction est conservée pour la CCM qui n'est réalisée que si la réaction b. est positive. Dépôt de 100 µl.

Phase mobile : acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:13,5:10).

Témoin : digitoxine ou digoxine 5 mg/ml (méthanol) dépôt : 10 µl

Révélation : Deux plaques différentes !!!

1. Pulvérisation du réactif de Kedde. La plaque est ensuite observée dans le visible (**colorations fugaces rose-bleu-violet**). Les bufadiénolides ne réagissent pas.
2. Vanilline sulfurique. Chauffage 10 minutes à 100°C. **Colorations bleues**.

Tanins galliques ou catéchiques

- a) À 2 ml de la solution obtenue au test général des saponines, on ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1% : obtention d'une **coloration bleue foncée, noire ou verte** si tanins

- b) À 30 ml de la solution obtenue au test général des saponines, ajouter 15 ml du **réactif de STIASNY** (formol 30%-HCl concentré 2:1). Un chauffage au bain-marie à 90°C provoque la précipitation quantitative des *tanins catéchiques* (**précipité rose**). Après filtration, le filtrat saturé d'acétate sodique est additionné de quelques gouttes de **chlorure ferrique à 1%** (présence de *tanins galliques* si l'on obtient une **teinte bleue ou noire**).

Anthocyanes

Dans un ballon de 100 ml, porter à ébullition pendant 30 minutes (à reflux) 0,5 g de drogue dans 25 ml de méthanol. Après refroidissement, filtrer. Dans un tube à essai, reprendre 3 ml du filtrat et ajouter quelques gouttes d'*HCl dilué*. Leur présence confère au décocté une **coloration rouge** qui vire au **bleu violacé-verdâtre** lors de l'ajout de quelques gouttes d'*ammoniaque dilué*.

Réactifs de caractérisation et de pulvérisation

Réactif de Mayer

Dissoudre 1,35 g de HgCl₂ dans 50 ml d'eau, ajouter 5 g de KI et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Réactif de Kedde

Préparer une solution éthanolique à 3% d'acide 3,5-dinitrobenzoïque. Mélanger 5 ml de cette solution avec 5 ml de NaOH 5M.

Vanilline sulfurique

On prépare 100 ml d'une solution de vanilline à 1% (m/v) dans l'éthanol. On ajoute à cette solution 2 ml d'acide sulfurique concentré (goutte à goutte). Après pulvérisation, la plaque CCM est chauffée 10 minutes à 100°C.

Réactif de Dragendorff

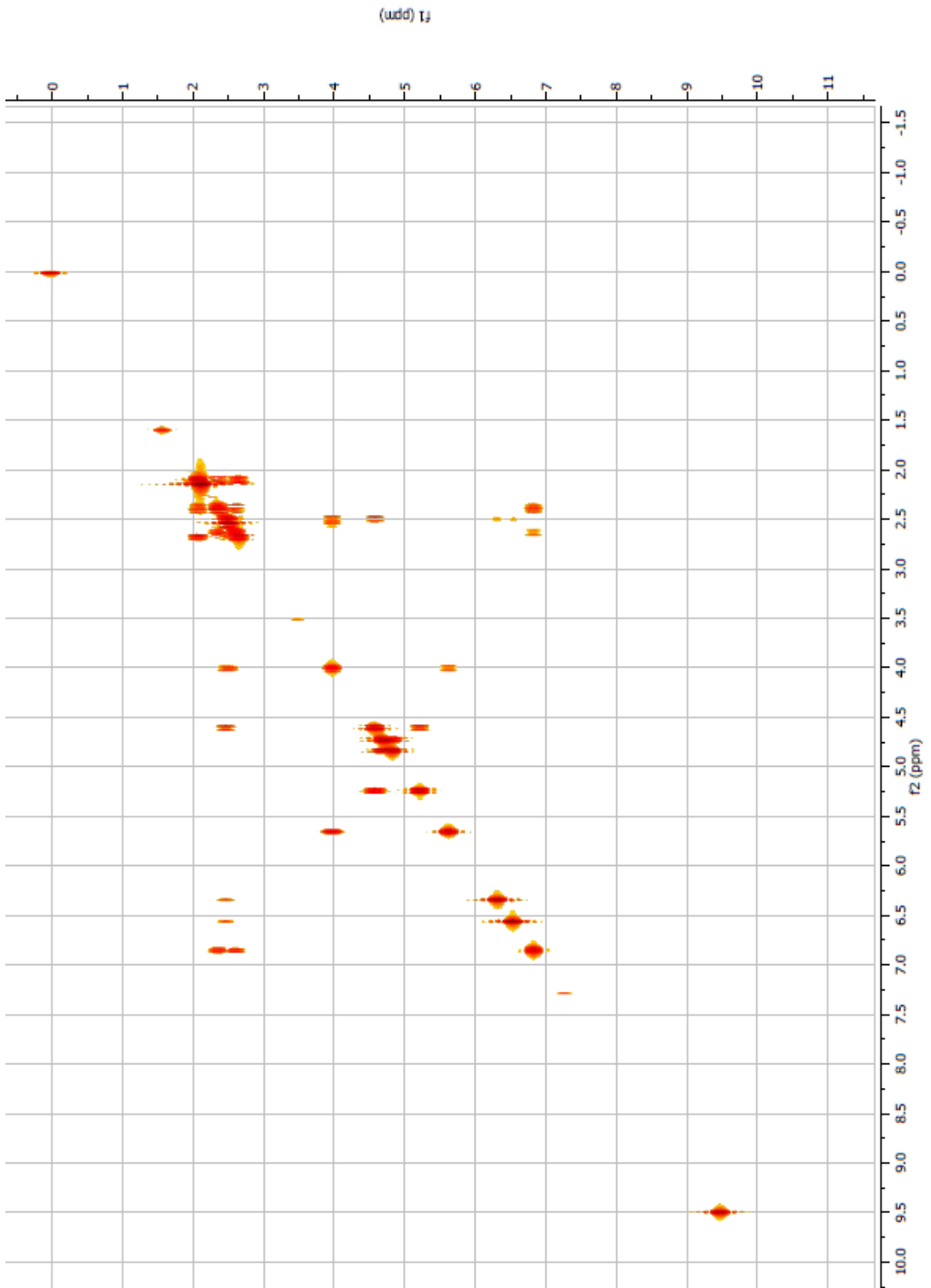
1,7 g de sous-nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique (+) sont agités dans 40 ml d'eau. On ajoute à la suspension 40 ml d'une solution à 40% (m/v) d'iodure de potassium, on mélange durant une heure et on filtre. Cette solution stock peut être conservée plusieurs mois à l'abri de la lumière. Le réactif de pulvérisation est préparé extemporanément en mélangeant 5 ml de la solution stock et 15 ml d'eau. Ce réactif colore en orangé les alcaloïdes.

DPBAE/PEG 400

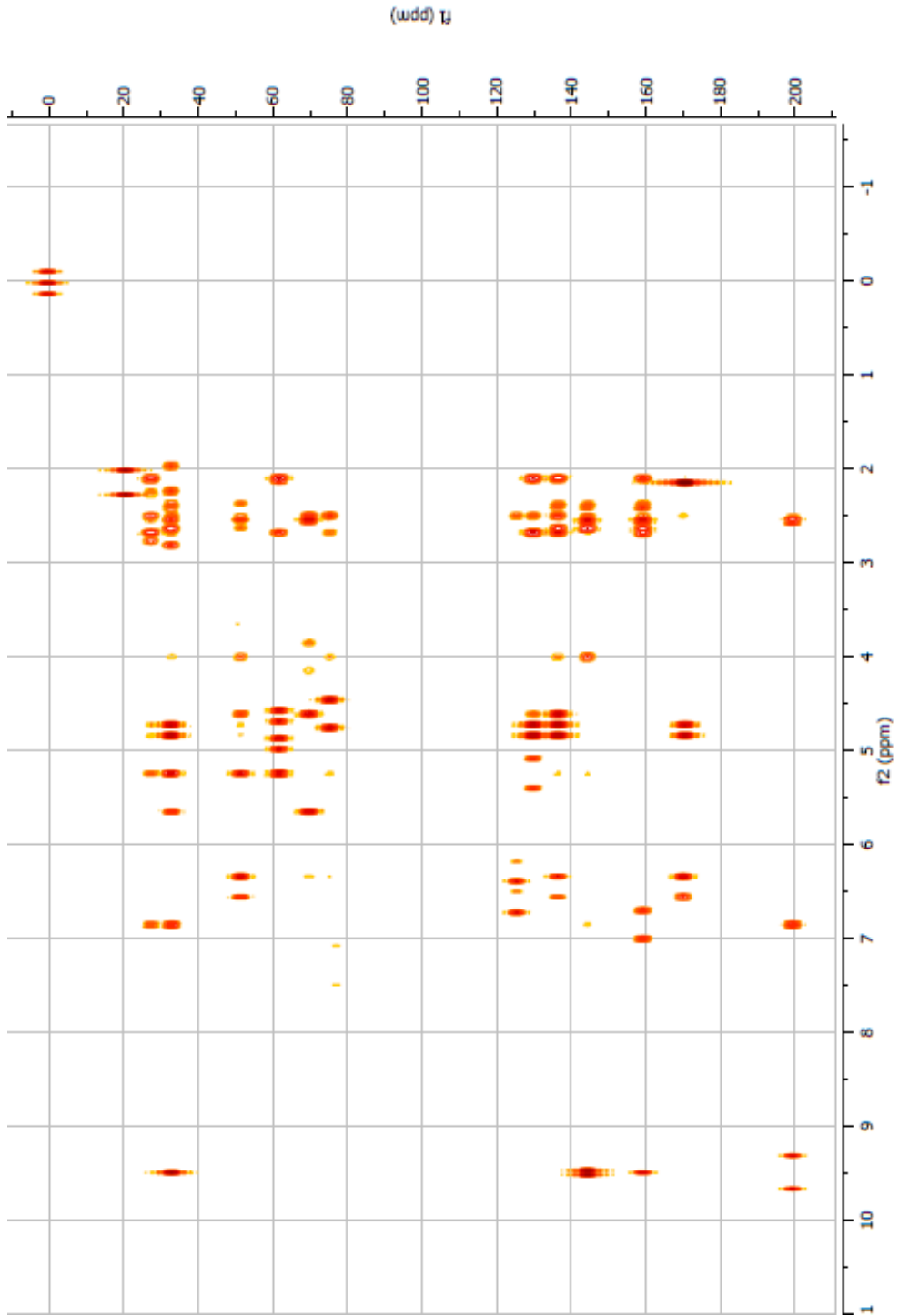
Il s'agit d'un mélange (1:1) d'une solution de diphénylborate d'aminoéthanol à 10 g/L dans le MeOH et d'une solution de macrogol 400R à 50 g/L dans le MeOH.

7.5 Spectres RMN 2D de l'UA150A

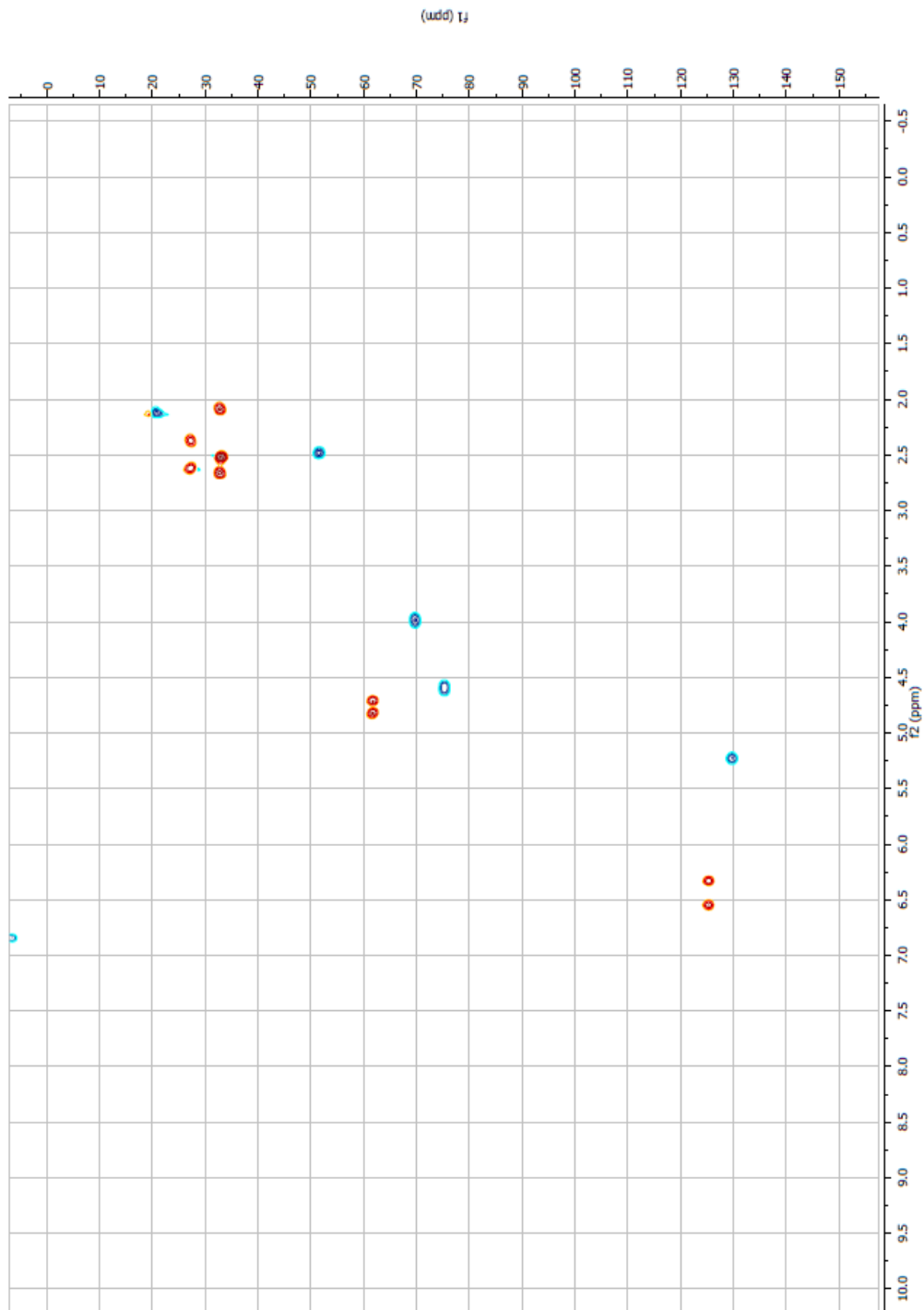
COSY



HMBC

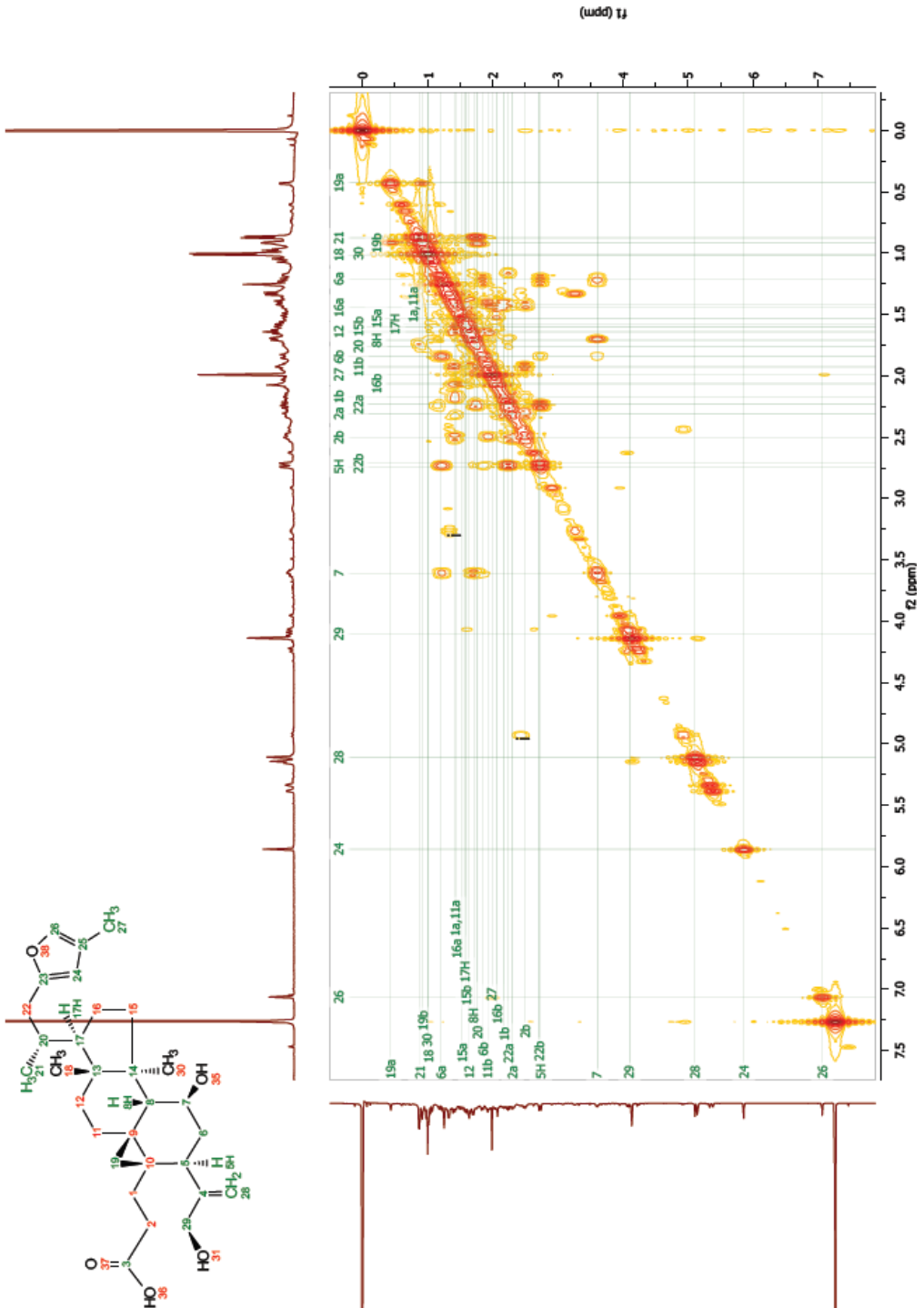


HSQC

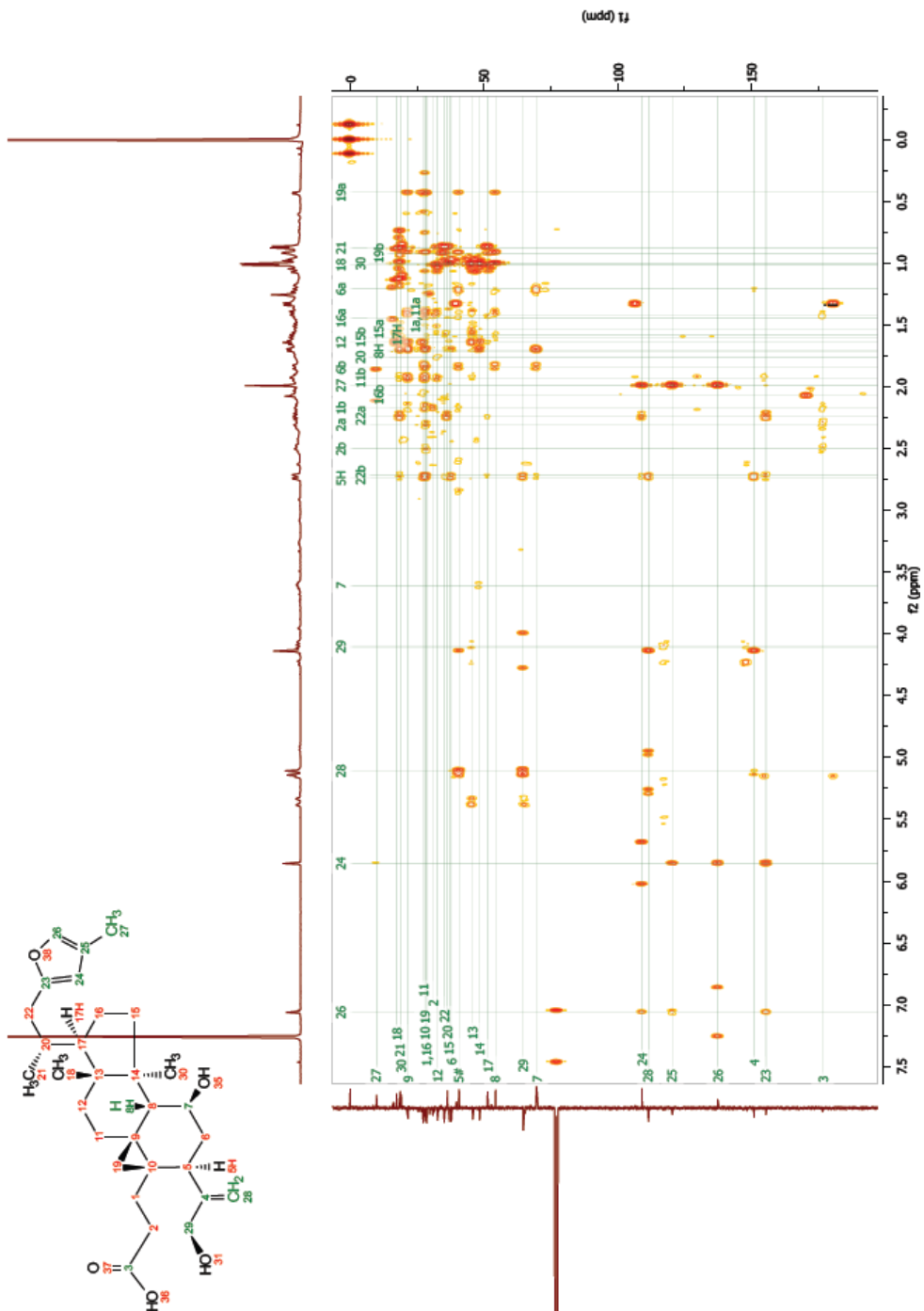


7.6 Spectres RMN de la sokotensine A

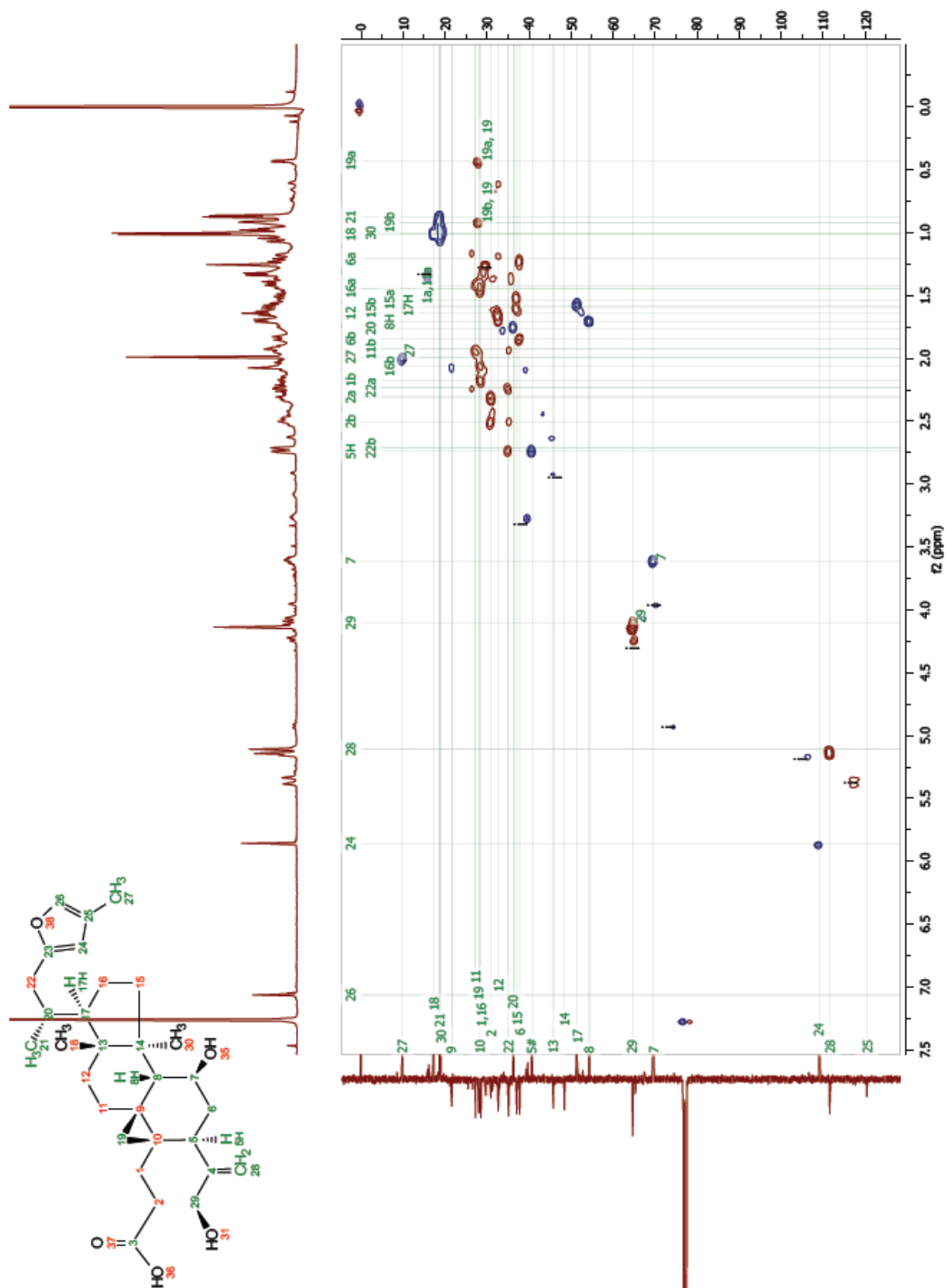
COSY



HMBC



HSQC



The aim of this work was to evaluate the antiplasmodial properties of medicinal plants from Burkina Faso through an ethnopharmacological approach, in view to isolate new antiplasmodial compounds and to consider the local valorization of active plants.

Ethnobotanical field studies allowed us to list 72 vegetal species used in traditional medicine in Burkina Faso to treat malaria. Thirteen plants were selected for laboratory investigations of their antiplasmodial activity.

Plant extracts were prepared using different solvents (dichloromethane, methanol, water) and tested *in vitro* against *Plasmodium falciparum*, using the pLDH assay. This screening highlighted the significant antiplasmodial activity of 8 species ($IC_{50} < 50\mu\text{g/ml}$) and 3 of them displayed a good activity ($IC_{50} < 15\mu\text{g/ml}$). This confirms the presence of antiplasmodial compounds in these plants and thereby validates their traditional use. This work is the first report of antiplasmodial properties for five of them. We selected *Dicoma tomentosa* and *Gardenia sokotensis* for a bioguided fractionation in order to isolate their active constituents. Complementary toxicity tests were performed to evaluate the safety of use of these plants, which seem promising regarding their activity against the parasite.

The study of *Dicoma tomentosa* Cass. led to the isolation of its major active compound, a melampolide-type sesquiterpene lactone, urospermal A-15-O-acetate (UA15OA). This compound showed very promising activity against *P. falciparum* ($IC_{50} < 1\mu\text{g/ml}$). However the antiplasmodial extracts, as well as UA15OA, displayed only a moderate selectivity in cytotoxicity assay ($IS \sim 3$). A genotoxic activity was also detected (micronucleus assay) for extracts and the pure compound. These findings point towards potential toxicity in chronic use for humans and therefore underline the need for caution regarding to the traditional use of this plant, despite its real antiplasmodial potential. On the other hand, the cytotoxic activity detected with UA15OA towards different cancer cell lines encourages us to further investigate its antitumoral potential, which represents an additional outcome from our studies about *D. tomentosa*.

The study of *Gardenia sokotensis* Hutch. showed that the activity of the dichloromethane extract cannot be attributed to a major active compound, but results from the combined action of many compounds in the plant. Four terpenes were isolated and one of them was identified as a new 3,4-seco-cycloartane triterpene, named sokotensine A. All purified compounds displayed the same level of activity as the whole extract against *P. falciparum* ($IC_{50} \sim 12\mu\text{g/ml}$) and no (or low) selectivity in cytotoxicity assays. The potential toxicity of *G. sokotensis* as well as its clinical efficacy should be further investigated to determine the relevance of its use in traditional medicine in malaria treatment.

Keywords: Malaria, ethnopharmacology, Burkina Faso, *Dicoma tomentosa*, sesquiterpene lactone, *Gardenia sokotensis*, cycloartane

