



Recherche et valorisation des plantes antipaludéennes

UBO – Brest

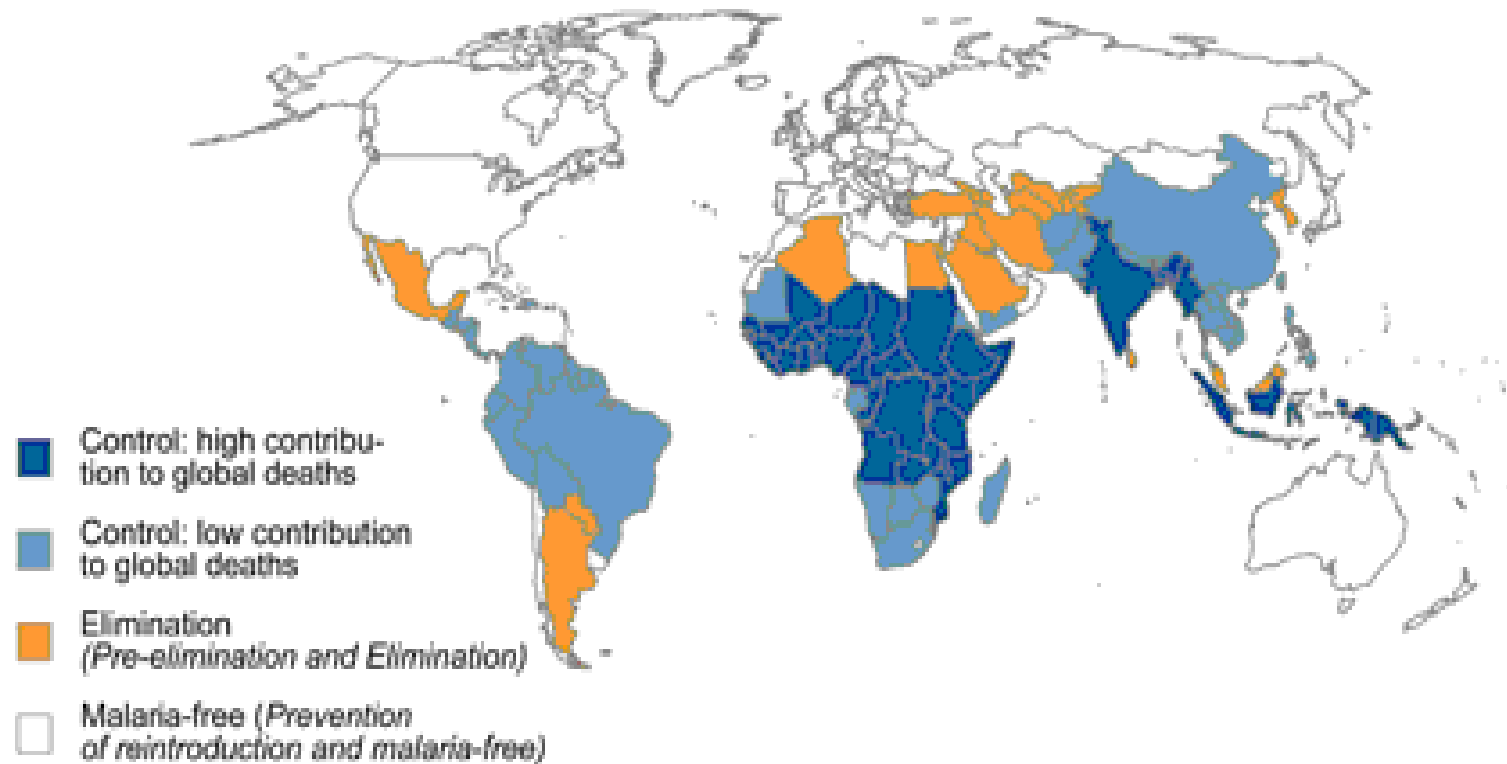
Jean-Pierre Nicolas - 2013

Le paludisme en croissance constante :

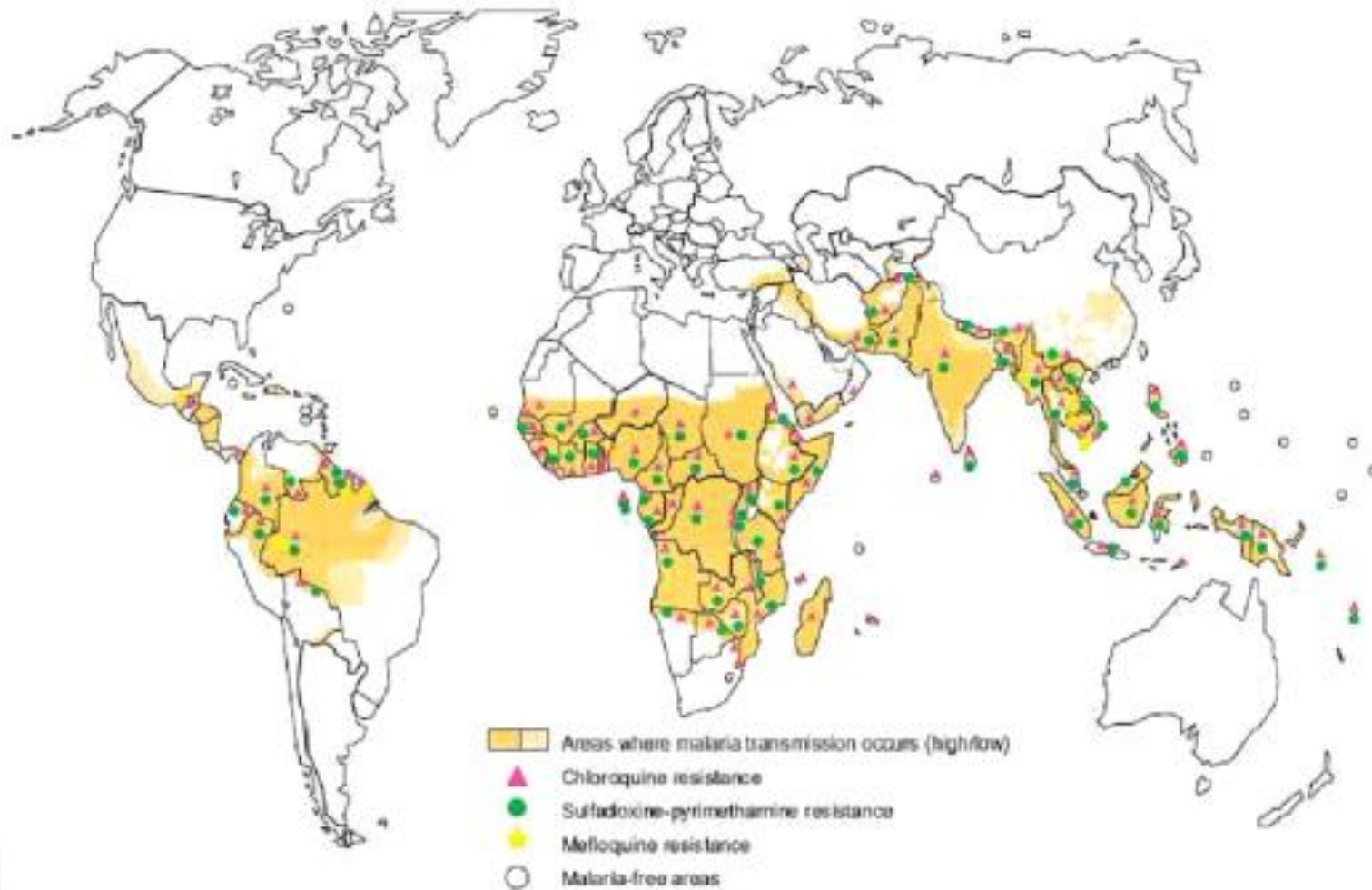
- Paludisme (1 million de morts par an dont 90 % en Afrique – 20 % de décès chez les enfants de moins de 5 ans)
- Impact économique et social majeur.



Répartition du paludisme dans le monde [OMS, 2008]



Les zones de résistances au *P. falciparum* dans le monde



LE PALUDISME

Maladie parasitaire causée par un protozoaire (*Plasmodium spp.*)

et transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique (Anophèle femelle)

4 espèces de Plasmodium :

- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium falciparum* , responsable de la malaria pernicieuse (malaria cérébrale = neuropaludisme)



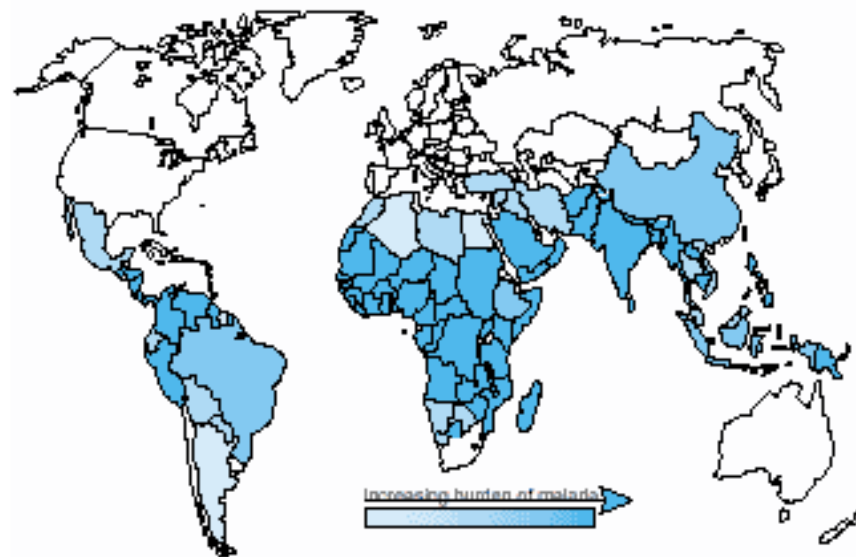
EPIDEMIOLOGIE du PALUDISME

- **300 – 500 millions de cas cliniques/an**
- **1 – 2 millions de décès/an (Enfants < 5ans)**
- **> 90% des cas en Afrique**
- **Développement de la résistance aux antipaludiques**

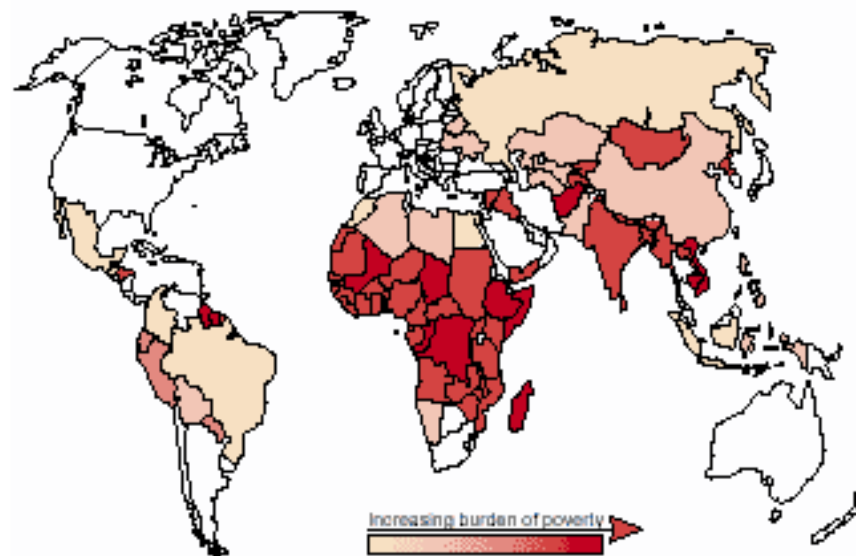


**Une relation
entre
PALUDISME et
PAUVRETE**

Estimate of world malaria burden



Estimate of world poverty



Source: RBM data/J. Sachs 1998

LE TRAITEMENT du PALUDISME

Il dépend de plusieurs facteurs :

- de l'espèce du parasite en cause
- de la gravité de l'infection
- du profil de résistance aux médicaments antipaludéens

Exemple de médicaments :

- quinine : **Quinimax[®]**
- proguanil : **Paludrine[®]**
- halofantrine : **Halfan[®]**
- **chloroquine** : **Nivaquine[®]**
- **méfloquine** : **Lariam[®]**
- **artémisinine et dérivés**

LE TRAITEMENT du PALUDISME

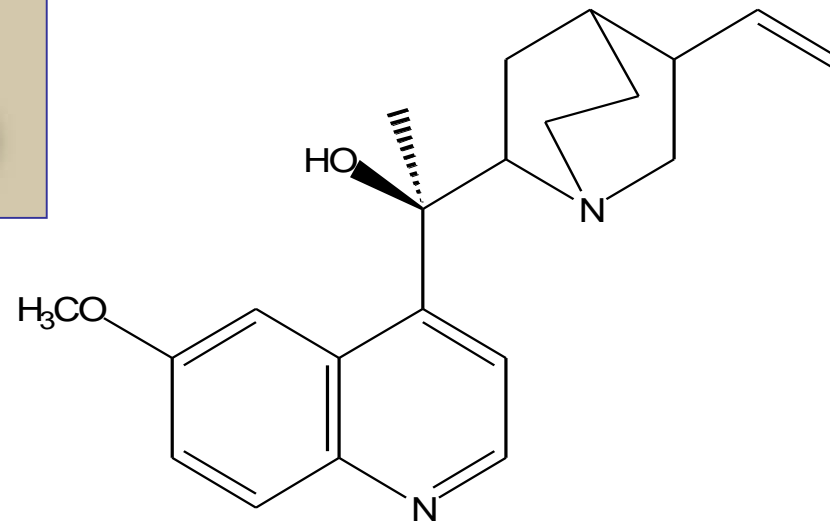
En cas d'échec thérapeutique ou selon le profil de résistance aux médicaments antipaludiques :

- Sulfadoxine-Pyriméthamine : **Fansidar[®]**
- Atovaquone-Proguanil : **Malarone[®]**
- Arthémether-luméfantrine : **Coartem[®]**

La chloroquine reste le médicament le plus utilisé, à cause de son bas prix

Médecine traditionnelle et biodiversité végétale : Source d'antipaludéens (1)

- **XVII^es Quinquina (*Cinchona* spp.)**
médecine traditionnelle péruvienne



Quinine

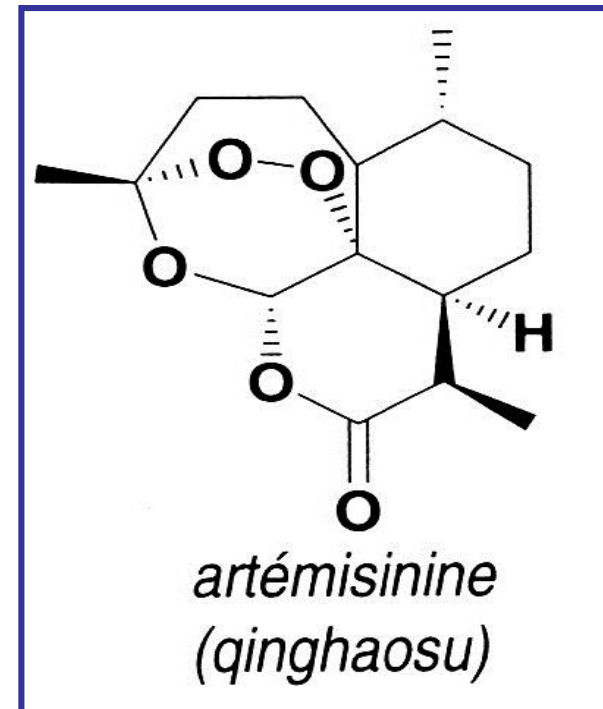
- Unique remède antimalarique jusqu'en 1920
- > 1930: apparition résistances
- Synthèse dérivés

Médecine traditionnelle et biodiversité végétale : Source d'antipaludéens (2)

■ XX^{es} : Armoise chinoise



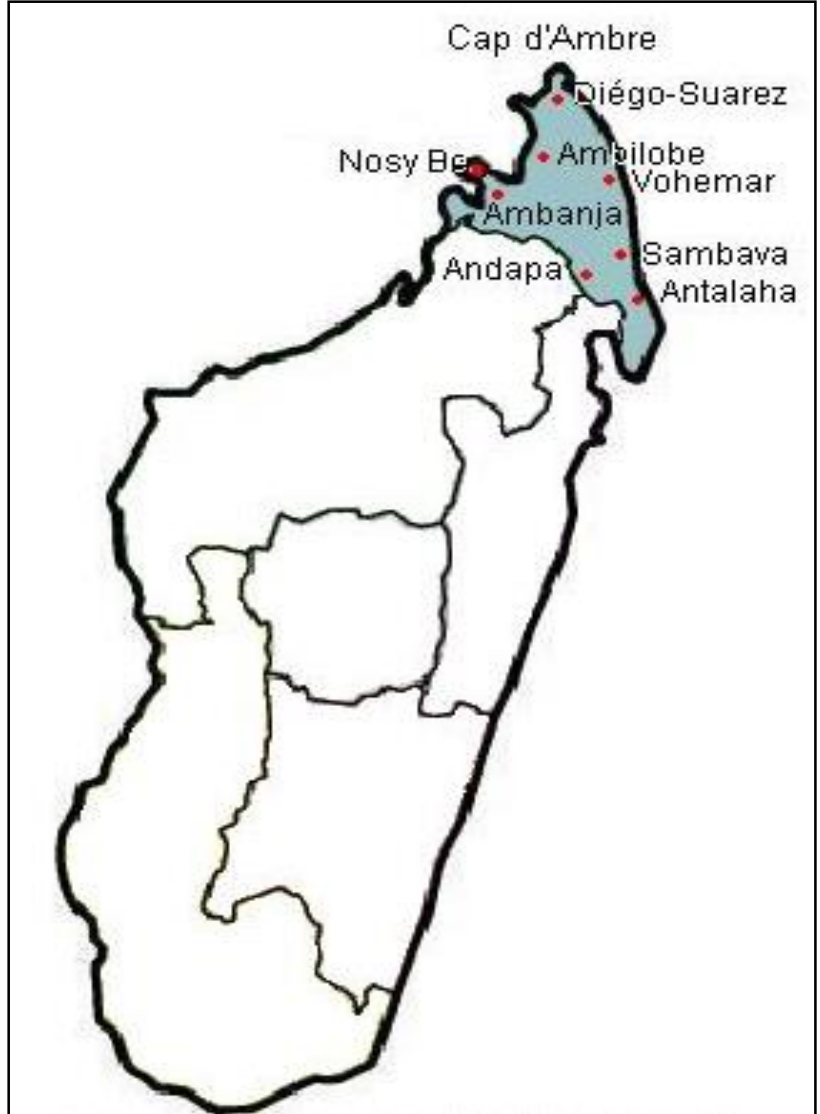
Artemisia annua



antipaludéen actif sur les 3 espèces de Plasmodium, y compris sur les souches chloroquino-résistantes

Exemple à Madagascar

Madagascar : région DIANA



Honduras

Départements de Choluteca et El Valle
Partenaires : Pastorale de la Santé, Evêché de Choluteca et
Danli



Problématique d'*Artemisia annua*

- ✦ Plante chinoise
- ✦ Culture délicate
- ✦ Variation du taux d'artémisinine
- ✦ Stockage délicat
- ✦ Extraction rapide
- ✦ Coût de production important

Études ethnobotaniques sur les plantes à activités antipaludéennes.

Audrey Pujol



Neurolaena lobata

(plante anti-leishmaniose et
antipaludéenne)

Mise en culture – Pedro Joaquin



Paludisme

Quassia amara – le retour !



Similikalactone D



Université Louis Pasteur -Strasbourg I
Université de Liège
U.F.R. Sciences pharmaceutiques



Etude de plantes médicinales traditionnellement utilisées dans le soin du paludisme au Burkina Faso

Lise Bessot
Olivia Jansen

Avant propos

- **Problèmes d'accès aux médicaments essentiels**
- **Ressources des flores et des pharmacopées locales**
- **Recherches ethnopharmacologiques**



**Thérapies traditionnelles sûres et efficaces :
stratégie de développement sanitaire
de ces populations**



Le paludisme, un véritable enjeu de santé dans le monde

Bilan sanitaire:

- 40 % de la population mondiale exposée
- entre 350 et 500 millions de personnes atteintes chaque année soit 5,6 à 8 % de la population mondiale
- Entre 1 à 3 millions de morts par an
- District sanitaire de Réo, Burkina Faso (2005):
 - principale cause d'hospitalisation,
 - 56 % de l'ensemble des décès tout âge confondu,
 - 68 % des décès des moins de 5 ans.

Le paludisme, un véritable enjeu de santé dans le monde

Impact économique et social :

- Famille africaine: 1/4 du revenu consacré à la prévention et au traitement du paludisme
- Continent africain: 12 milliards de dollars de pertes annuelles
- Vie scolaire perturbée, absentéisme au travail



Véritable frein au développement

Problématiques de la prise en charge du paludisme au Burkina Faso

- **Le Burkina Faso**

- **Problématiques:**

- coût financier

- Coartem^R: 5 330 FCFA
 - Artésunate+amodiaquine: 2 000 FCFA
- revenu annuel/habitant=220 dollars en 2002, soit 115 800 FCA

- accessibilité géographique

- facteur d'ordre culturel

Investigation des plantes à visée antipaludéennes

- **Les enquêtes ethnobotaniques**

Entretiens collectifs



Deux entrées:

- **Le paludisme: Quelles plantes utilisez-vous dans le soin du paludisme?**
- **La plante: A quoi sert cette plante?**

↪ **18 espèces citées dans le soin du paludisme et sélectionnées
pour cette étude**

Espèces communément utilisées dans le soin du paludisme

	Nom scientifique	FAMILLE	Nom français	Nom lyélé	Nom mooré
1	<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Neem* ***/Margousier***	<i>nim</i>	<i>nim</i>
2	<i>Balanites aegyptiaca</i>	Balanitaceae	Dattier du désert* ***/ Myrobolan d'Egypte* ***/	<i>shiam</i>	<i>kielga/kyegelega</i>
3	<i>Bauhinia rufescens</i>	Fabaceae	Bauhinia*	<i>dwamalou</i>	<i>koden taabré/tipoèga</i>
4	<i>Bombax costatum</i>	Bombacaceae	Faux-kapokier***/ kapokier rouge* ***/	<i>efoân</i>	<i>voaaka</i>
5	<i>Capparis sepiaria</i>	Capparaceae	Câprier***	<i>niaboh</i>	<i>silkoré/kal-yanga/sil-koatga</i>
6	<i>Cenchrus biflorus</i>	Poaceae		<i>Swélé</i>	
7	<i>Chrysanthellum indicum</i> subsp. <i>afroamericanum</i>	Asteraceae			<i>wan tugdo/kaan-nao/sileg- nagnessé</i>
8	<i>Combretum micranthum</i>	Combretaceae	Kinkéliba**	<i>go</i>	<i>randega</i>
9	<i>Delonix regia</i>	Fabaceae	Flamboyant***	<i>nasara échila</i>	<i>nasara rôâaga</i>
10	<i>Hyptis spicigera</i>	Lamiaceae		<i>bombomjourhou</i>	<i>kim rigd gnoogo</i>
11	<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	Manguier/Mangot***	<i>mangué</i>	<i>manguié, mangê n tiiga</i>
12	<i>Nauclea latifolia</i>	Rubiaceae	Pêcher africain***/ liane fraise	<i>zanlô</i>	<i>katr foaanga/gwiinga</i>
13	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Goyavier***	<i>Goya</i>	<i>goyaak tiiga/goyaaka</i>
14	<i>Senna siamea</i>	Fabaceae	Casse du Siam***/bois- perdrix***		
15	<i>Senna alata</i>	Fabaceae	Dartrier		<i>jonis tiiga</i>
16	<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Badamier**	<i>Kô néboulou</i>	
17	<i>Vernonia colorata</i>	Asteraceae			<i>koa-safandé</i>
18	<i>Waltheria indica</i>	Sterculiaceae	http://ethnobotanika.org	<i>goumounloâpoâ ra</i>	<i>soum</i>

Investigation des plantes à visée antipaludéennes

- Etudes bibliographiques de la sélection d'espèces

Fiches monographiques

Nom scientifique :

Synonymes :

Famille :

Risques de falsification :

Description botanique

Distribution géographique

Utilisation en médecine traditionnelle

- Données issues de la bibliographie
- Données issues des enquêtes

Constituants chimiques

Pharmacologie

- Humaine
- Animale

Toxicologie

Autres données

Préparation et posologie

Discussion

Résultats et perspectives

Données encourageantes sur le potentiel thérapeutique des espèces:

- ↩ - Bénéfice direct : propriétés anti-malarique
- Bénéfice indirect : effets sur les symptômes de la crise
 - ↳ Effets hépatoprotecteurs, fébrifuges, etc...

Résultats et perspectives

- Propriétés anti-malariques

Azadirachta indica A. Juss.

- Extrait alcoolique de feuilles et de graines
actifs sur *Plasmodium*

! Toxicité



Combretum micranthum G. Don

- Extrait de feuilles modérément actifs



Nauclea latifolia Smith

- Propriétés anti-malariques
pour
les extraits de racines, tiges,
feuilles

⚠️ Extraits riches en alcaloïdes
Toxicité à long terme (foie,
rein)

Psidium guajava L.

- Activité anti-plasmodiale pour
l'extrait d'écorce de tige

- Extrait de feuilles?



Senna siamea (Lam.) H.S. Irwin et Barneby

- Activité anti-malarique de différents extraits (écorce, feuilles)
- Intérêt de son association à d'autres plantes



Toxicité du barakol

Vernonia colorata Drake

- Activité anti-malarique pour l'extrait des parties aériennes

- Vernodalol et 11β , 13 -dihydrovernodaline



Balanites aegyptiaca (L.) Delile

- Propriétés anti-malariques pour
l'extrait d'écorce de racine



- **Propriétés hépatoprotectrices**

Azadirachta indica A. Juss.

Balanites aegyptiaca (L.) Delile

Chrysanthellum indicum subsp. *afroamericanum* B.L.Turner

Terminalia catappa L.

Psidium guajava L.

Senna alata (cholérétique) (Lam.) H.S. Irwin et Barneby

Combretum micranthum G. Don



Extraits actifs, toxicité, doses efficaces

<http://ethnobotanika.org>

Résultats et perspectives

- Propriétés antipyrétiques

- *Azadirachta indica* A. Juss.
- *Vernonia colorata* Drake

- Propriétés immunostimulantes, anti-asthénique, etc...

- *Bombax costatum* Pellegrin et Vuillet: riche en Fer
- *Mangifera indica* L.: immunostimulant
- *Waltheria indica* L.: anti-anémiant
- *Capparis sepiaria* L.: qualité nutritionnelle
- *Cenchrus biflorus* Roxburgh.: qualité nutritionnelle

- Pistes d'activités

Bauhinia rufescens Lam.

(similitudes chimiques dans le genre)



Capparis sepiaria L.

(similitudes chimiques dans la famille)



Delonix regia (Boj.) Raf.



Conclusion



- **Enjeux du paludisme**
étude de la pharmacopée traditionnelle
- **Validation scientifique de l'usage traditionnel**
- **Candidates potentielles pour des investigations des propriétés anti-malariques**
- **Nécessité de confronter ces informations au terrain**

« Investigation des potentialités antiplasmodiales de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso »



Présenté par Olivia JANSEN
Service de Pharmacognosie - ULg

Plantes sélectionnées et récoltées

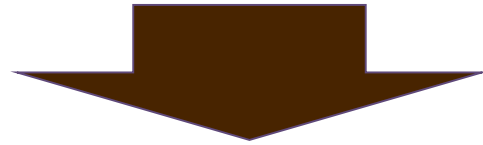
	<i>Espèces</i>	Famille	Echantillon	Lieu de récolte (* = Herboriste)
1	<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	FABACEAE	Feuilles Tige	Koudougou Koudougou
2	<i>Bergia suffruticosa</i> Fenzl.	ELATINACEAE	Plante	Koudougou*
3	<i>Boswellia dalzielli</i> Hutch <i>Crossopteryx</i>	BURSERACEAE	Feuilles	Kassou
4	<i>febrifuga</i> (Afz ex G.Don)	RUBIACEAE	Feuilles	Banfora
5	<i>Dicoma tomentosa</i> Cass	ASTERACEAE	Plante	Banfora*
6	<i>Dyschoriste perrottetii</i> O. Kuntze	ACANTHACEAE	Plante	Koudougou*
7	<i>Ficus thonningii</i> Blume	MORACEAE	Feuilles	Godin
8	<i>Gardenia sokotensis</i> Hutch	RUBIACEAE	Feuilles	Godin
9	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	EUPHORBIAEAE	Feuilles	Bonyolo
10	<i>Loeseneriella africana</i> (Willd.) N. Hallé	CELASTRACEAE	Feuilles	Banfora
11	<i>Psorospermum senegalense</i> Spach	CLUSIACEAE	Feuilles	Banfora
			Feuilles	Réo
			Ecorces	Godin
			Ecorces 2	Réo
		STERCULIACEAE	Racines	Réo
1 3	<i>Waltheria indica</i> L.		Tiges feuillées	Réo

TOTAL: 17 échantillons ← 13 sp. ← 12 familles bota

Bonne activité (IC50<15µg/ml)

Dicoma tomentosa,
Psorospermum senegalense,
Gardenia sokotensis

Tests
supplém.



✓ Tests *in vitro* sur souche CQ-Résist. de *P. falciparum* (W2)

✓ Cytotoxicité *in vitro* sur cellules saines

Test WST-1 / Souche : WI-38 (fibroblastes)

→ Calcul index de sélectivité

→ !!!! *Gardenia* !!!!



!! Problème de
synonymie
botanique !!

Dicoma tomentosa (pl. ent.) et *Psorospermum senegalense* (fe.)

→ à étudier sur le plan phytochimique et pharmacologique



III. Dicoma tomentosa Cass.

ASTERACEAE



AOÛT 2010



Dicoma tomentosa Cass.
ETHNOBOTANIQUE

Gômtidga,
Sakwipèelga (mooré)

En zone Mossi (Boutoko)	connu par sa vertu médicinale contre la toux	Infusion de feuilles ou mâcher les feuilles, aspirer le jus, avaler ce jus et rejeter le résidus
	chez femmes accouchées pour les laver et bien nettoyer le ventre.	bouillir les tiges feuillées du <i>Dicoma tomentosa</i> , filtrer la solution et boire ou encore bouillir, laisser refroidir et se purger
	contre indiqué chez les femmes enceintes car peut provoquer des avortements	
En zone Gourounsi (Bonyolo, Mogueya, Poun)	connu pour son traitement des gonflements du foie des enfants lors du paludisme pendant le froid	
	aussi utilisé dans le cas paludisme simple	
Région du Plateau central	contre le paludisme des enfants avec inflammation de la rate (Guinko, 1988)	Toute la plante en décoction (lavements)
	aussi contre le paludisme des adultes (Nacoulma, 1996)	Tiges feuillées en usage interne (infusion)

Dicoma tomentosa Cass.

PHYTOCHIMIE

✓ **Acide gras** : ac. octacosanoïque

✓ **Triterpènes et stérols** :

ac. betulinique, lupeylacetate, taraxasterol, stigmasterol, β -sitosterol

✓ **Lactones sesquiterpéniques** :

Germacranolides (5) et mélampolides (5)

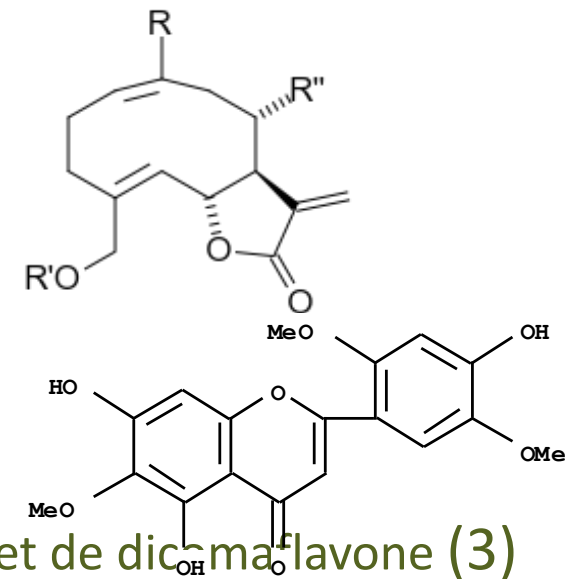
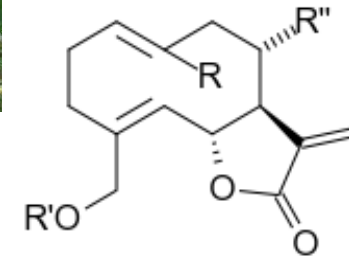
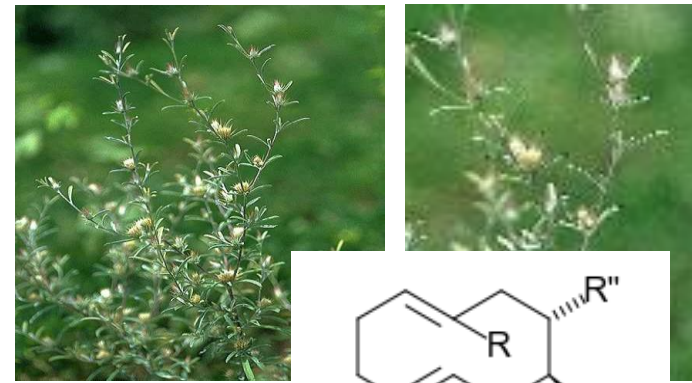
→ albicolide - urospermal A et dérivés

✓ **Flavonoïdes** :

Génines (4) :

quercétine, eupatine, eupatolitine, **dicomaflavone**

Hétérosides de quercétine (1), d'eupatolitine (1) et de dicomaflavone (3)



PHARMACOLOGIE *Dicoma tomentosa* Cass.

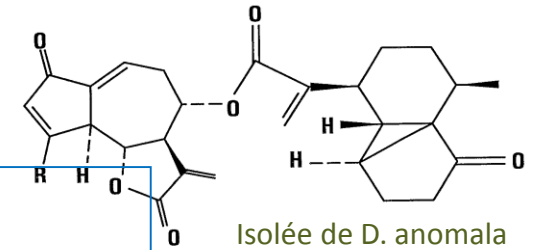
Pas d'étude pharmacologique sur le *Dicoma tomentosa*

Mais rapport de l'activité antiplasmodiale de *D. anomala*

Lactones sesquiterpéniques de DT : /

STL's (germacranolides & mélampolides):

Plusieurs rapports d'activité antiplasmodiale, cytotoxique et génotoxique



Eupatine : activité cytotoxique/ anticancéreuse

Quercetine : propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires

Ac. betulinique : propriétés antiplasmodiales, anticancéreuses, anti-HIV, antibactériennes (*S. aureus*), anthelminthiques, antioxydantes, immunomodulatrices

Taraxasterol : propriétés antiinflammatoires, antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses

Stigmasterol : propriétés hypocholestérolémiantes, hypoglycémiantes, antioxydantes, antiosteoarthritiques, préventives de certains cancers

β -sitosterol : propriétés hypocholestérolémiantes, antiinflammatoires, antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses

Dicoma tomentosa: travaux réalisés l'an dernier

❖ **Récolte de 3 nouveaux échantillons (plantes entières)**
 au Burkina Faso par l'équipe de « Jardins du Monde »

- Lot n°1 : récolté à Poun (01/10/2008) 357 g
- Lot n°2 : récolté à Poun (03/10/2008) 118 g
- Lot n°3 : récolté à Mogueya (07/10/2008) 844 g



❖ Tests antiplasmodiaux

- *In vitro* (extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux X 3 lots) - *P. falciparum*
 3D7 & W2

- *In vivo* (extrait MeOH i.p et p.o) - *P. berghei*

Tests cytotoxicité + calcul IS

(extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux X 3 lots)

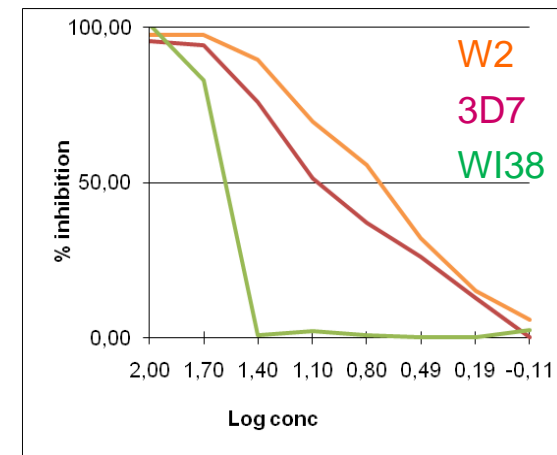
- fibroblastes WI38

Tests génotoxicité

(extraits CH₂Cl₂, MeOH et aqueux lot n°1)

Fractionnement bioguidé de l'extrait CH₂Cl₂ (lot n°1)

→ Isolement de P1 & P2 non identifiés (petites quantités)



2. Bilan des résultats obtenus avec *Dicoma tomentosa*



- I. Activité **antiplasmodiale** *in vitro* (*P. falciparum* - 3D7 et W2)
- II. Activité **cytotoxique** *in vitro* (fibroblastes WI38)
- III. Activité **hémolytique** *in vitro*
- IV. Activité **antiplasmodiale** *in vivo* (3 tests)
- V. Activité **génotoxique** *in vitro*
- VI. **Etude phytochimique** : CCM des extraits
- VII. **Fractionnement bioguidé** (extr. CH₂Cl₂)
→ isolement et identification du PA antiplasmodial majoritaire
- I. **Etude des flavonoïdes** (extr. EtOH50%)

Rendements d'extraction

Extraits CH₂Cl₂ :

Lot 1	5,43%
Lot 2	5,44%
Lot 3	4,61%

Extraits MeOH :

Lot 1	11,08%
Lot 2	11,46%
Lot 3	11,18%

Extraits aqueux:

Lot 1	20,3%
Lot 2	20,3%
Lot 3	18,3%

Extraits EtOH 50% :

Lot 1	16,17%
Lot 2	16,42%
Lot 3	16,90%

Nouveaux extraits Lot 1

Ether	3,41%
EtOAc	4,10 %
Ether petrole	1,79 %
Hexane	1,67 %

Extraits obtenus par
macération 3X30 min
(1g/3x10ml slvt)
Sauf extraits aqueux
(décoction 1h)

I. Activité antiplasmodiale *in vitro* (*P. falciparum* - 3D7 et W2)

- Mise en contact extraits (série de 8 dilutions) avec culture de *P. falciparum* (H = 1%; P = 2%) - 48h

- Révélation colorimétrique (mesure activité LDH plasmodiale)

❖ très bonne activité ($IC_{50} < 5\mu\text{g/ml}$)

❖ bonne activité ($IC_{50} < 15\mu\text{g/ml}$)

❖ activité modérée ($IC_{50} < 50\mu\text{g/ml}$)

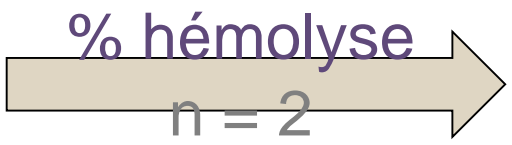
n= 3	IC 50 3D7 $\pm \sigma$ ($\mu\text{g/ml}$)			IC 50 W2 $\pm \sigma$ ($\mu\text{g/ml}$)		
	LOT 1	LOT2	LOT 3	LOT1	LOT2	LOT3
CH ₂ Cl ₂	3,4	3,0	3,8	1,9	1,8	2,1
MeOH	5,8	5,8	9,0	3,0	3,0	4,6
EtOH 50%	12,9	8,4	12,3	9,7	5,8	8,8
H ₂ O	12,8	9,6	18,2	6,7	5,3	12,8
Ether	3,9			4,8		
EtOAc	4,4			4,6		
Ether petrole	23,2			21,2		
Hexane	18,7			17,7		

II. *Activité cytotoxique in vitro (fibroblastes WI38)*

	IC50 3D7	IC50 W2
DT1 DCM	3,4	1,9
DT1 MeOH	5,8	3,0
DT1 EtOH50%	12,9	9,7
DT1 H ₂ O	12,8	6,7
DT1 ether	3,9	4,8
DT1 EtOAc	4,4	4,6
DT1 Ether petrole	23,2	21,2
DT1 Hexane	18,7	17,7
DT2 DCM	3,0	1,7
DT2 MeOH	5,8	3,1
DT2 EtOH50%	8,4	5,8
DT2 H ₂ O	9,6	5,3
DT3 DCM	3,8	2,1
DT3 MeOH	9,0	4,6
DT3 ETOH 50%	12,3	8,8
DT3 H ₂ O	18,2	12,8

III. *Activité hémolytique in vitro*

Extraits testés : *Dicoma tomentosa* lot n°1

- CH ₂ Cl ₂		< 1%
- MeOH		< 1%
- EtOH50%		< 1%
- H ₂ O		< 1%

Test d'hémolyse : mode opératoire

- Dilution de solutions mères d'extraits/produits purs (DMSO) avec du PBS (5X)
- **Mise en contact extrait avec solution de globules rouges** 10% (v/v) (1h) (dilution 20X)
- centrifuger 5' et prélever 150 µl surnageant → boîte 96-puits
- Mesurer l'absorbance à 550 nm
- Chaque condition en triplicate (C extrait : 100µg/ml)
- **T positif** : Triton X-100 (20%, v/v, H₂O) → hémolyse = 100%
- **T négatif** : PBS
- **T control solvant** : DMSO 1%

$$\% \text{ Hémolyse} = \frac{A_{\text{produit}} - A_{\text{solvant}}}{A_{\text{triton}} - A_{\text{PBS}}} \times 100$$

A triton - A PBS

IV. Activité antiplasmodiale in vivo (3 tests)

- ✓ Souche *P. berghei* (souris) :
- 4-days suppressive test
 - ✓ Infection : Jour 1
 - ✓ Traitement : Jour 1 à 4 (1 X/jour)
- ✓ Mesure de la parasitémie :
- Frottis (sang prélevé au niveau de la queue) à Jours 5 & 8
- ✓ Réalisation de 3 tests indépendants:



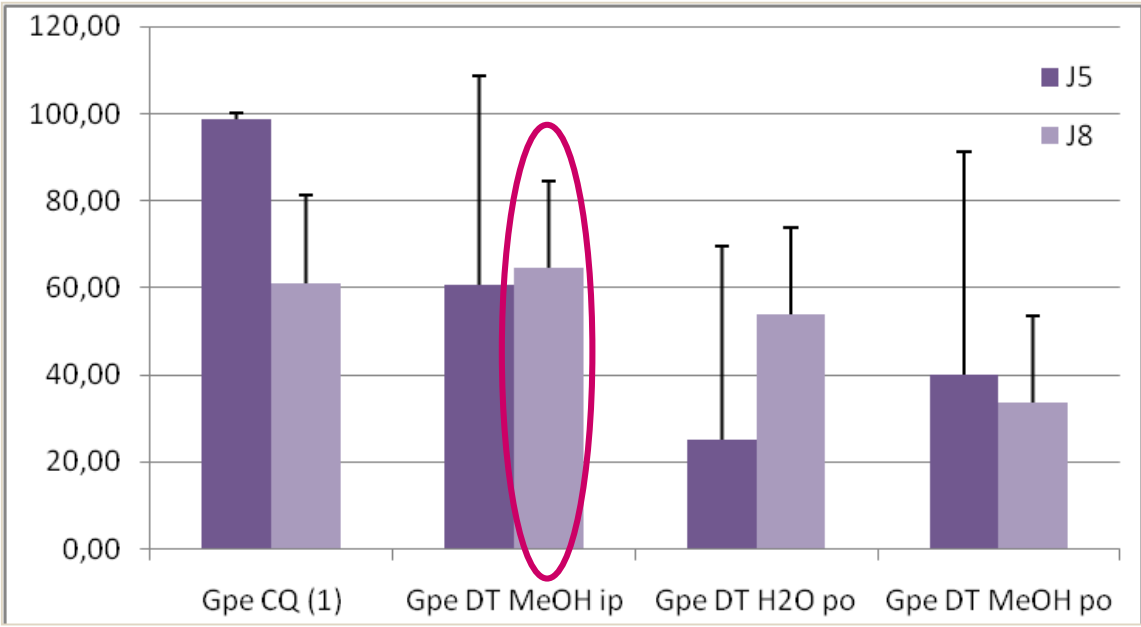
TEST n°1	<ul style="list-style-type: none"> - extrait MeOH i.p 100mg/kg - extrait MeOH p.o 300mg/kg - extrait H2O p.o 300mg/kg
TEST n°2	<ul style="list-style-type: none"> -extrait EtOH50% i.p 100 mg/kg - extrait EtOH 50% p.o 300mg/kg
TEST n°3	<ul style="list-style-type: none"> - extrait MeOH i.p 100 mg/kg extrait EtOH 50% i.p 100 mg/kg

<http://ethnobotanika.org>

T négatif Non traité
 → Croissance *P. berghei* = 100%
 → Calcul inhibition croissance (%)

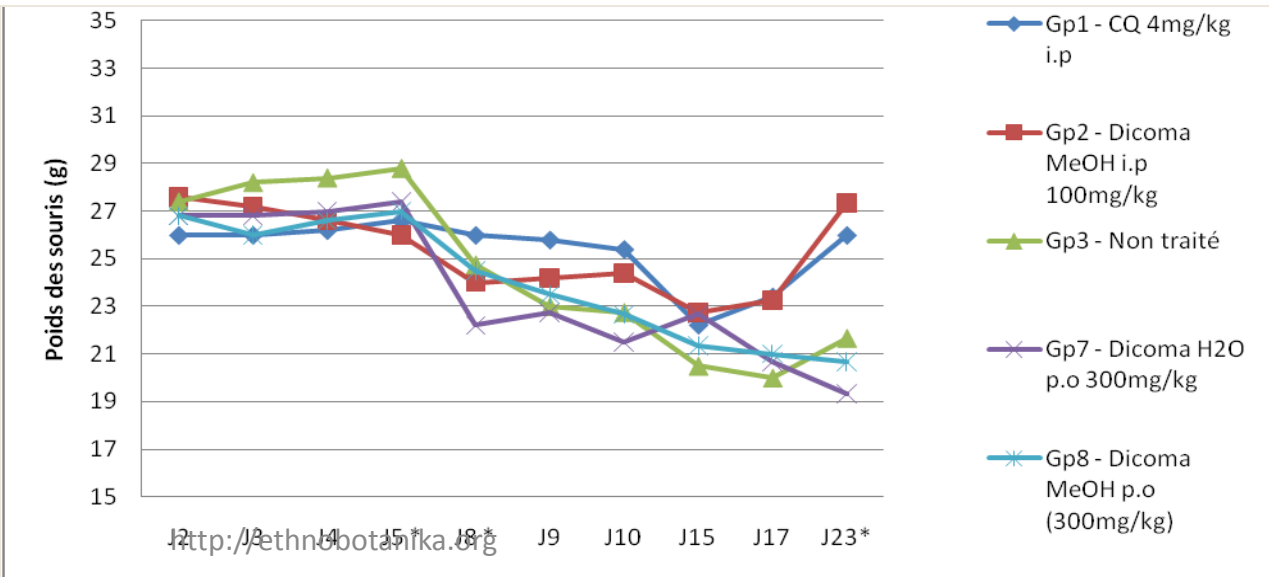
T positif :
 chloroquine 4mg/kg i.p ou extrait MeOH de quinquina 200mg/kg i.p. (test 3)

IV. Activité antiplasmodiale in vivo (test 1)

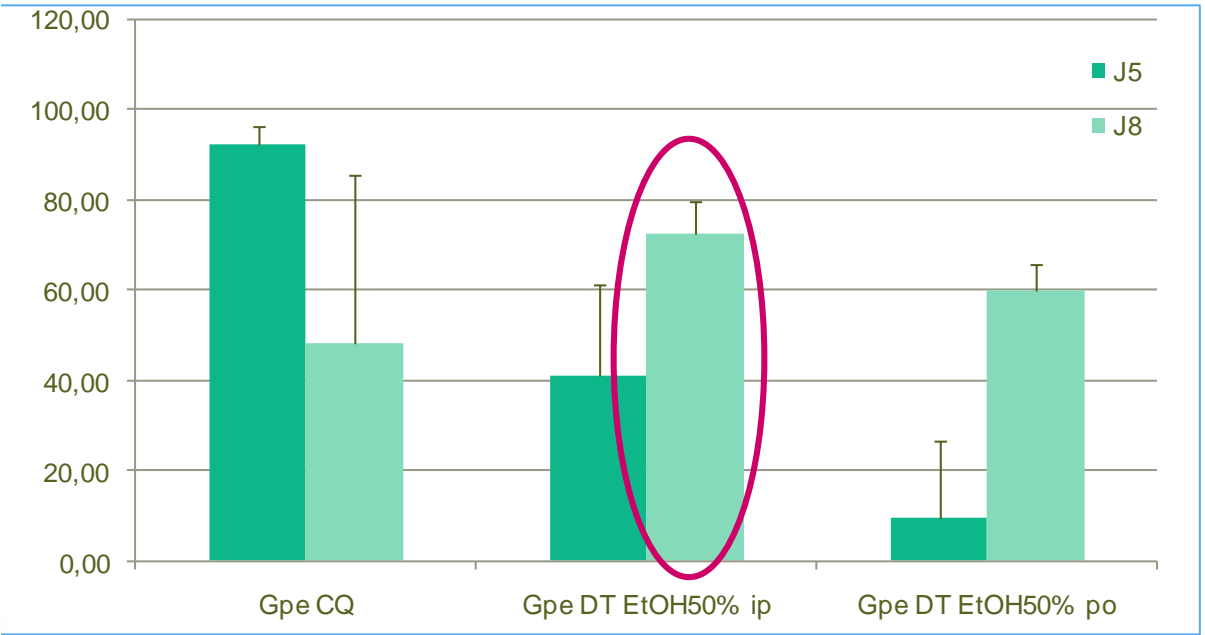


**% inhibition croissance
*P. berghei***

Evolution du poids des souris

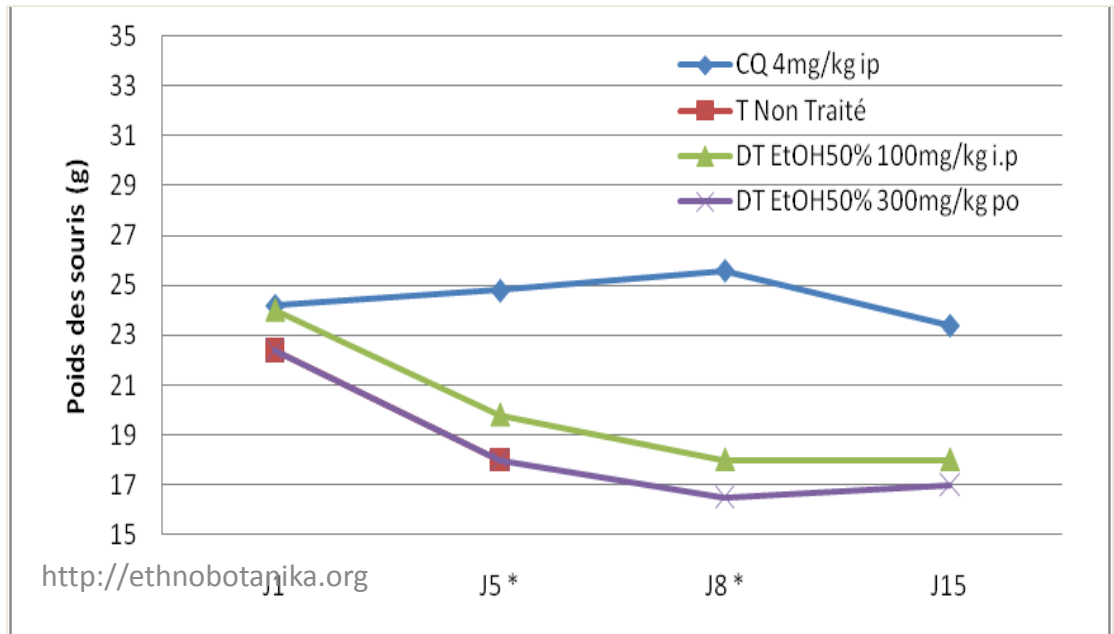


IV. Activité antiplasmodiale in vivo (test 2)

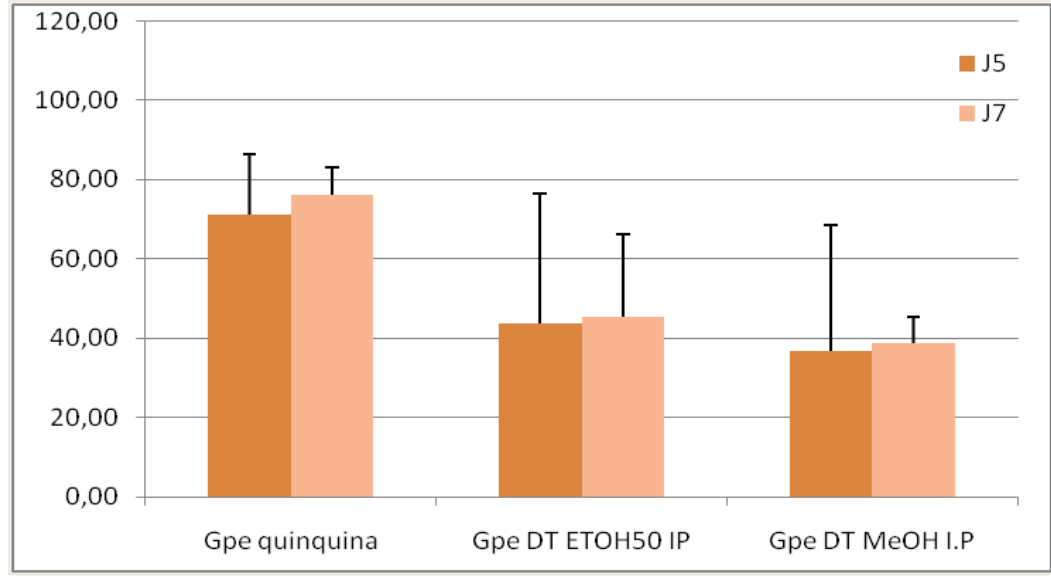


**% inhibition croissance
*P. berghei***

Evolution du poids des souris

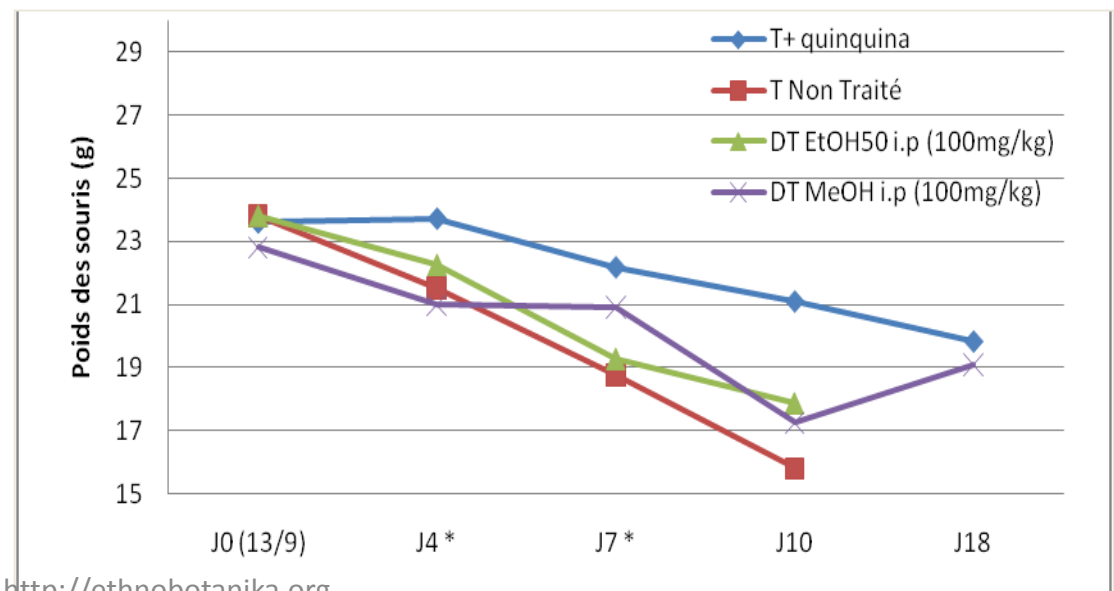


IV. Activité antiplasmodiale in vivo (test 3)



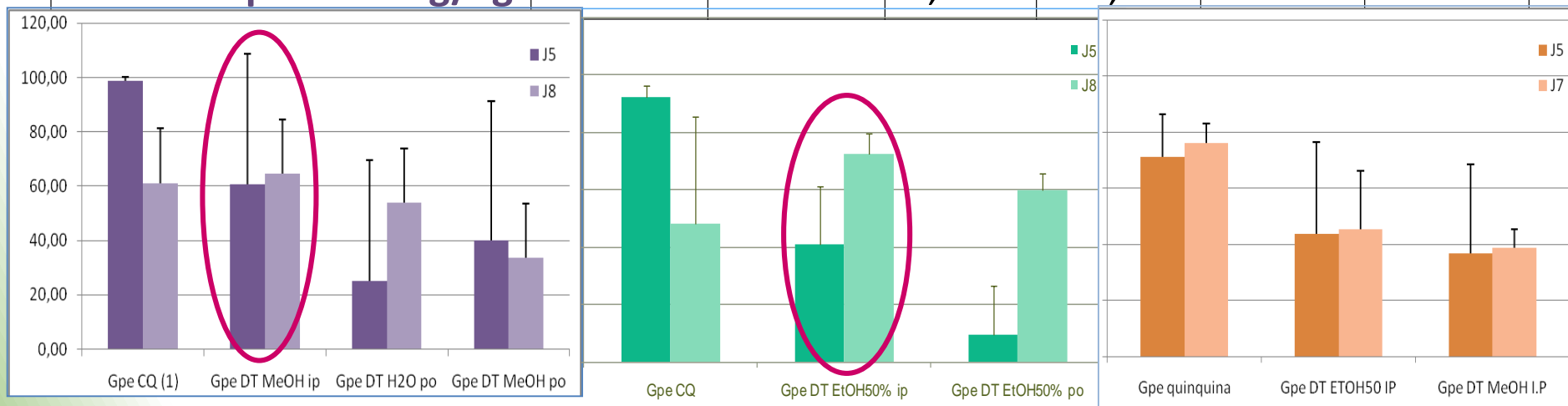
**% inhibition croissance
*P. berghei***

Evolution du poids des souris



IV. Activité antiplasmodiale in vivo : résumé 3 tests

% inhibition de la croissance <i>P. berghei</i>	TEST n°1		TEST n°2		TEST n°3	
	J5	J8	J5	J8	J5	J8
MeOH i.p 100mg/kg	60,7%	64,6%			43,8%	45,6%
MeOH p.o 300mg/kg	40,2%	33,6%				
H2O p.o 300mg/kg	25,2%	53,8%				
EtOH50% i.p 100mg/kg			41,1%	72,7%	36,7%	38,8%
EtOH50% p.o 300 mg/kg			9,67%	60,0%		



Moyennes % INHIBITION :

MeOH i.p : J5 : 52,2 ± 11,9%

J8 : 55,1 ± 13,4%

EtOH50% ip : J5 : 38,8 ± 3,11%

J8 : 55,7% ± 23,69%

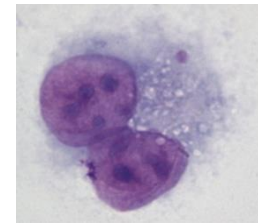
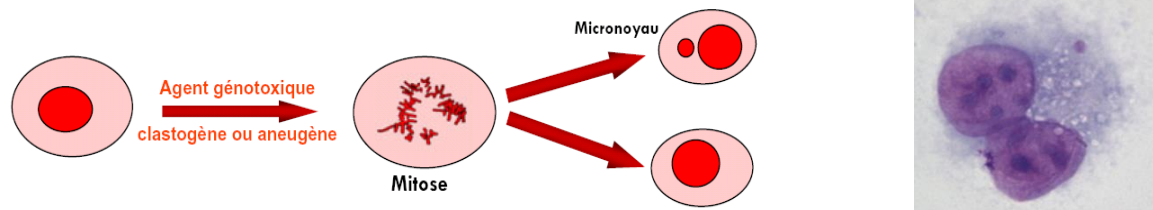
V. Activité génotoxique *in vitro*

En collaboration avec l'Université d'Aix-Marseille II (Prof. E. Ollivier et Dr. Di Giorgio)

Test de numération des micronoyaux :

Test court (3h) de mutagénèse 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**



Afin de **mimer les transformations métaboliques** caractéristiques des organismes supérieurs, le test inclut l'utilisation d'une source exogène d'activation métabolique (**S9 mix**)

V. Activité génotoxique *in vitro*

Concentration Minimale Clastogène :

concentration d'extrait à partir de laquelle une augmentation significative des taux de cellules micronucléées est observée.

Extraits lot n°1		Concentration Minimale Clastogène (µg/ml)
CH₂Cl₂	- S9 Mix	0.42
	+ S9 Mix	0.59
H ₂ O	- S9 Mix	3.44
	+ S9 Mix	8.88
MeOH	- S9 Mix	NS
	+ S9 Mix	NS

→ **Activité génotoxique importante de l'extrait CH₂Cl₂ (et de l'extrait aqueux)**

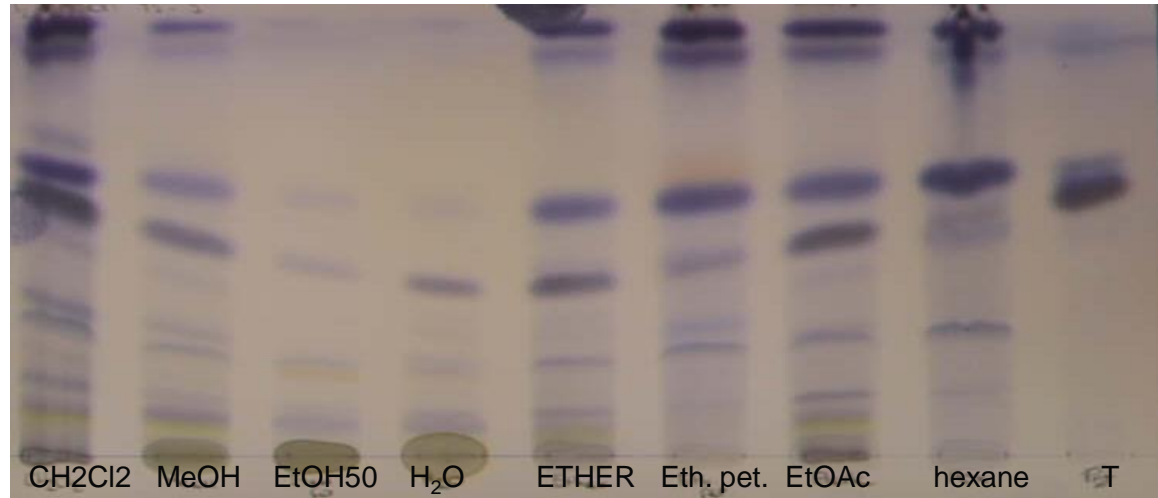
→ PA génotoxique ou présence de pesticides?

→ ~~Tester les mêmes extraits réalisés à partir d'un autre lot (n°3)~~

→ Tester sur d'autres modèles : tests d'Ames et tests des comètes

→ + tester PA antiplasmodiaux isolés

VI. Etude phytochimique : CCM 8 extraits (lot n°1)



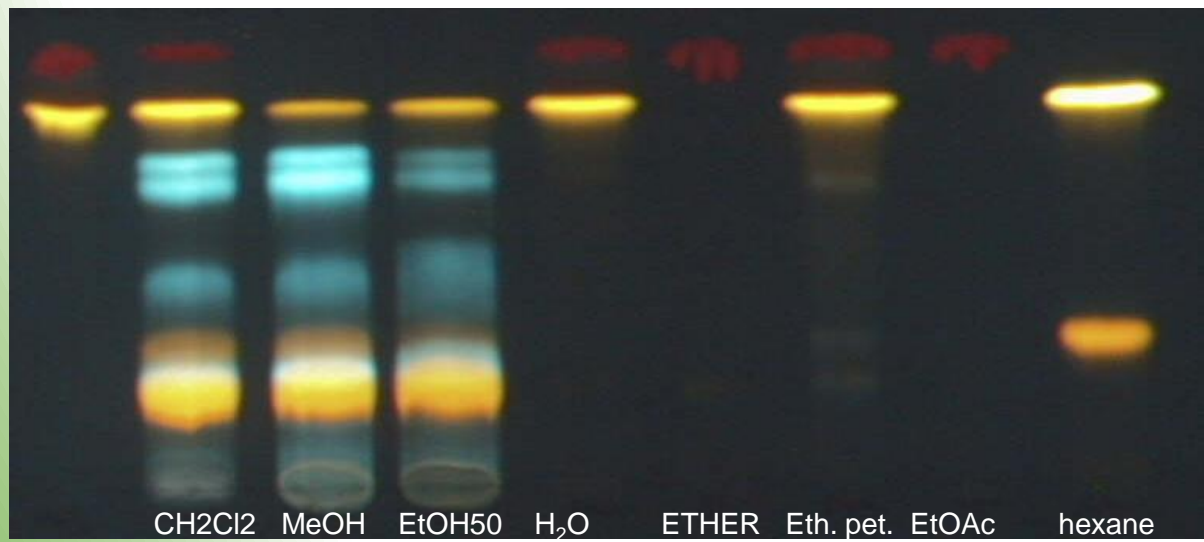
3,4	5,8	12,9	12,8	3,9	23,2	4,4	18,7
-----	-----	------	------	-----	------	-----	------

TERPÈNES

(vanilline sulfurique + 100°C 5')

φ. Mob : CH₂Cl₂ – MeOH (95 : 5)

IC₅₀ (µg/ml)



LUTEOLINE

FLAVONOÏDES

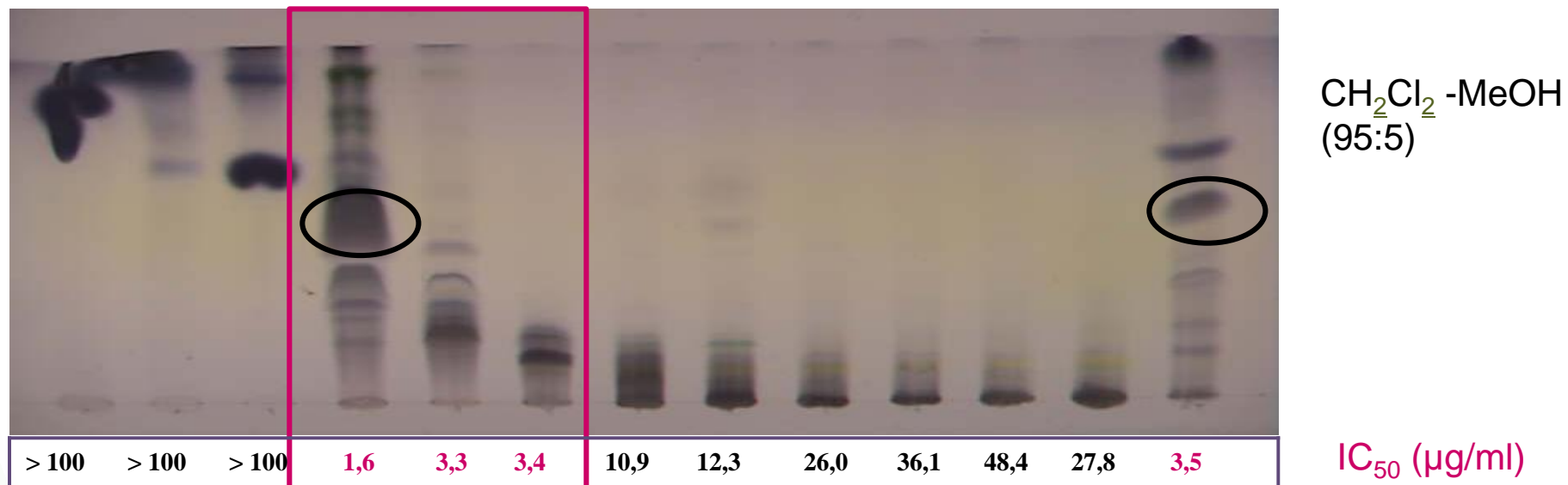
(réactif DPBAE UV 366nm)

LUTEOLINE-7-O-Glc

φ. Mob : EtOAc – HOAc – Ac form.- H₂O (100 : 11 : 11 : 26)

VII. Fractionnement bioguidé (extr. CH₂Cl₂)

1. HPLC Preparative (phase normale Si60) - gradient CH₂Cl₂-MeOH (3-5%)

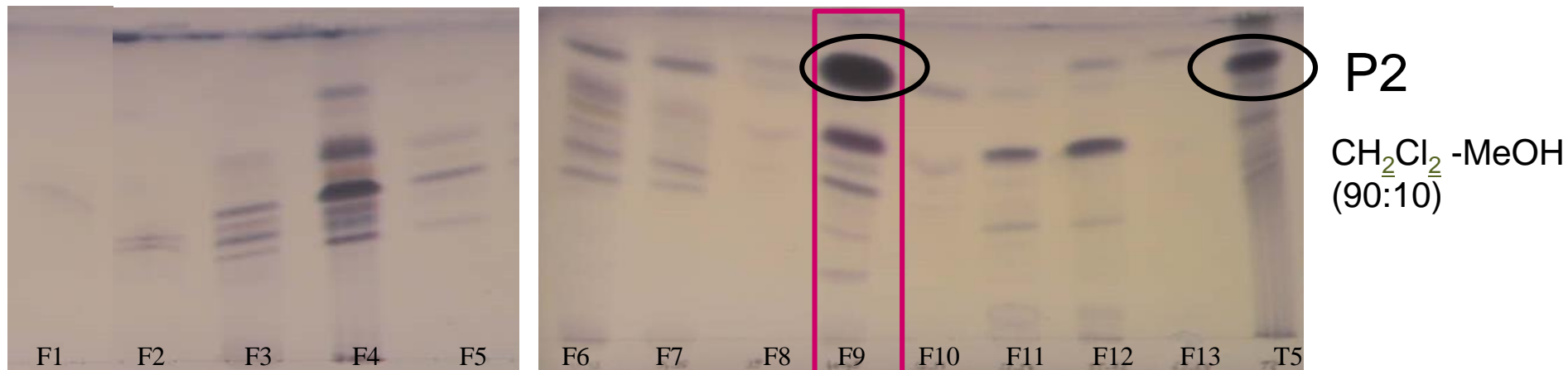


- **Plusieurs fractions actives** → synergie d'activité antiplasmodiale
- **Un produit largement majoritaire** dans la **fraction la plus active** (=P2) qui est aussi la fraction majoritaire (~ 400mg / 1g d'extrait)

Séparer cette fraction par **HPLC Preparative (phase inverse RP18) - MeOH:H₂O (50:50) isocratique**

VII. Fractionnement bioguidé (extr. CH₂Cl₂) suite

2. HPLC Préparative (phase inverse RP18) - MeOH:H₂O (50:50) isocratique



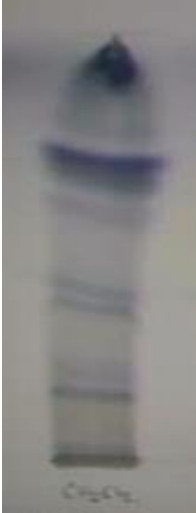



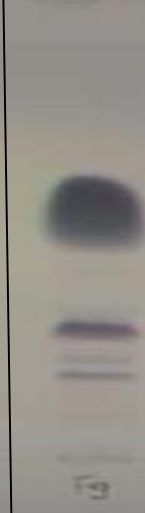
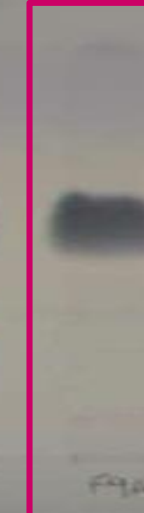
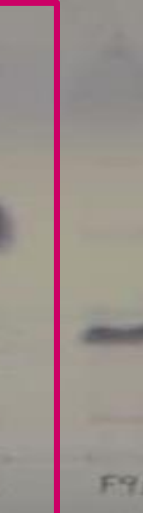
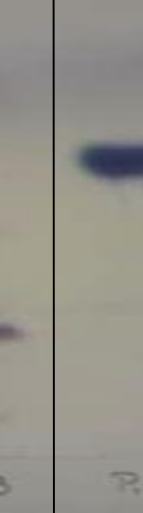
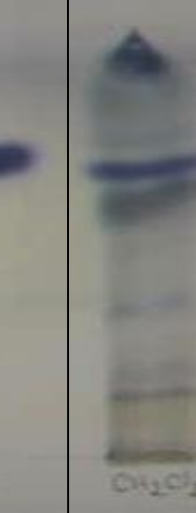
2,1	0,5	0,2	1,4	1,6	0,9	2,2	0,1	65,7	0,2	0,7	3,5	0,3		Nbre mg
3,23	-	-	1,1	-	3,4	-	-	1,7	-	-	-	1,35	1,6	IC ₅₀ (µg/ml)

- Synergie d'activité antiplasmodiale entre +s composés terpéniques
 -Produit majoritaire **P2** dans la **fraction F9** (= fraction majoritaire)
 20 mg

3. Purifier cette fraction par CCM Préparative (CH₂Cl₂-MeOH 95:5) **P2 = F9A**



VII. Fractionnement bioguidé (extr. CH₂Cl₂) : RESUME

	Extrait Total	HPLC preparative en phase normale			HPLC prepa RP18 + CCM prep				
									
IC ₅₀ (µg/ml) 3D7	CH ₂ Cl ₂ 3,4	T5 1,6	S2F2 1,7	S1F4 1,5	F9 1,2	F9A=P2 0,9	F9B 1,7	P1 >100	CH ₂ Cl ₂ 2,7
WI38					3,0	6,6			
SI					3,3	3,9			
% hémolyse					< 1%	< 1%	< 1%		

**F9A= P2 = produit majoritaire de T5 et extr. CH₂Cl₂
= PA antiplasmodial majoritaire**

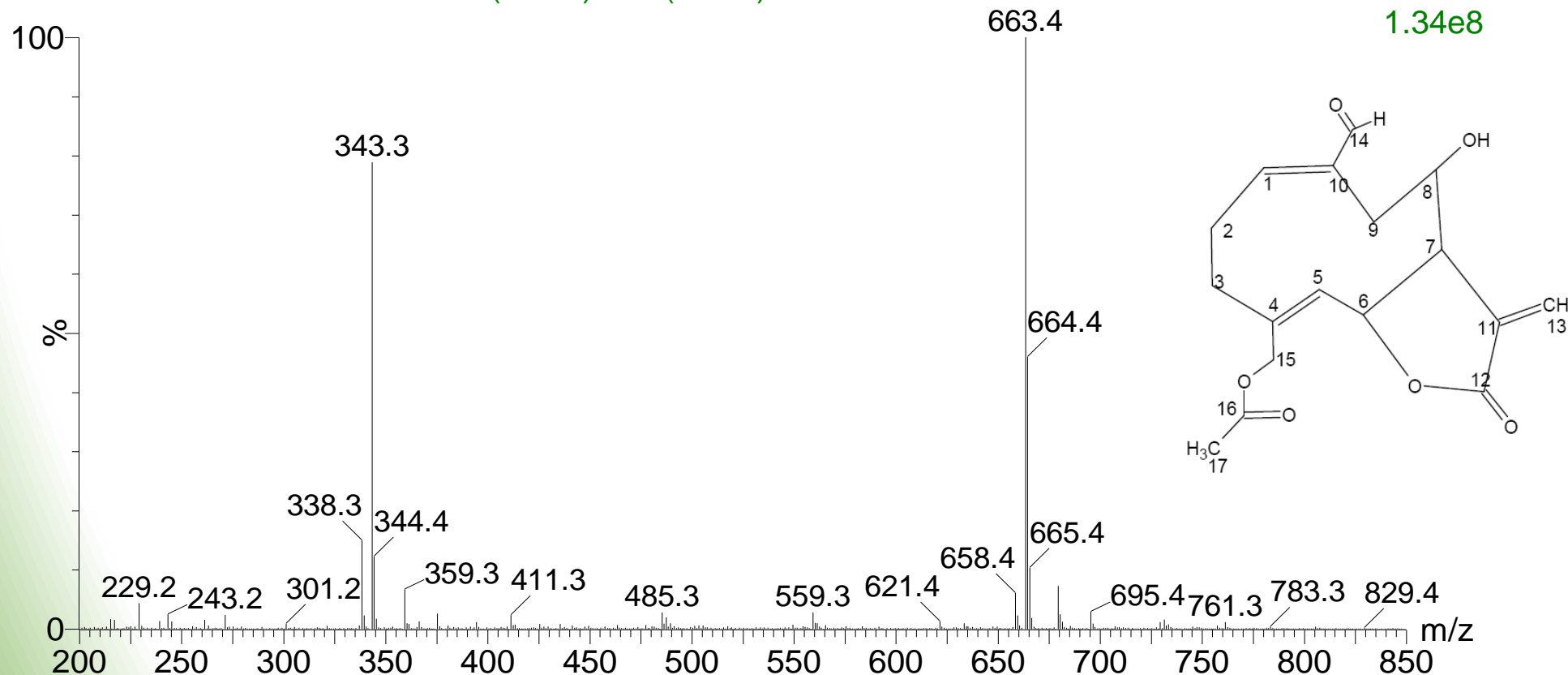
VII. Identification structurale de F9A : MS

VB119

06-Dec-2010 13:50:46

JW101206-LCP-OJ-TSAPOS 46 (0.850) Cm (46:76)

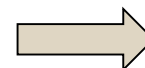
Scan ES+
1.34e8



2 ions majoritaires

m/z = 343 et 663

→ Adduits sodium et dimérisation dans la source ?



m/z « réel » = 320 (+1)

$C_{17}H_{20}O_6$

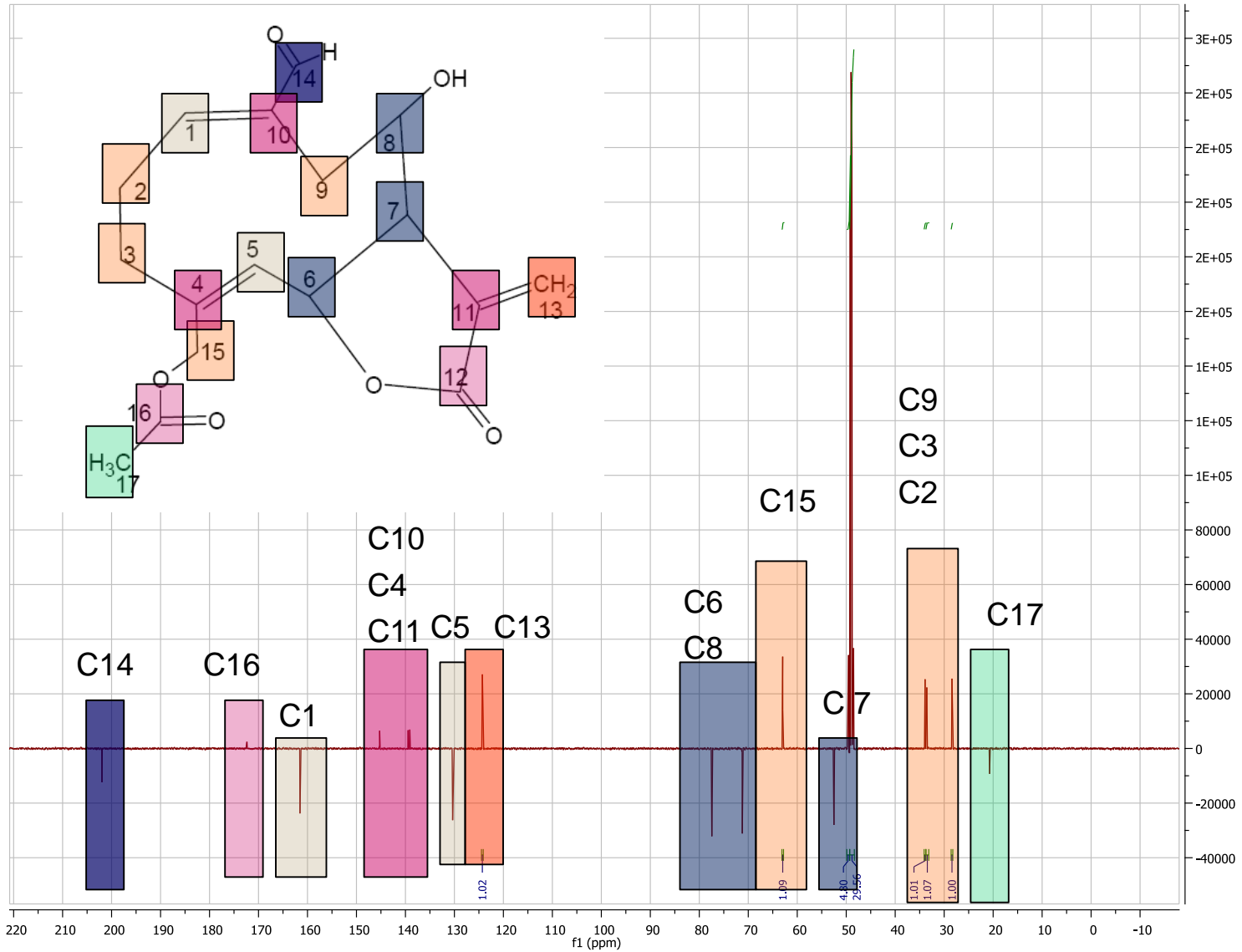
VII. Identification structurale de F9A : RMN ¹³C

1 CH₃

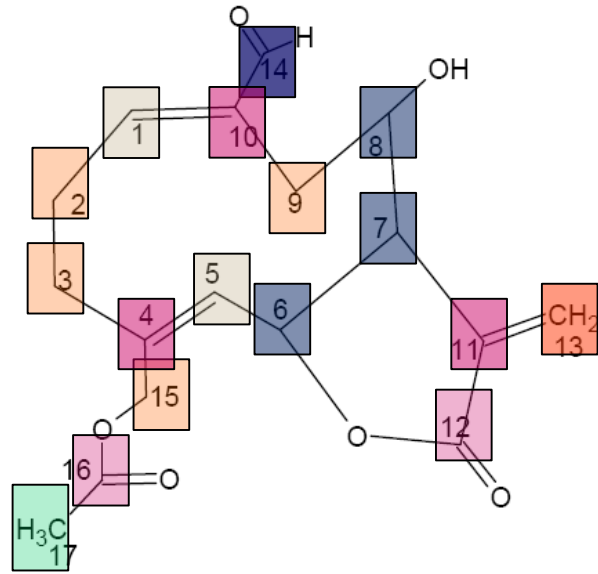
5 CH₂

6 CH

5 C



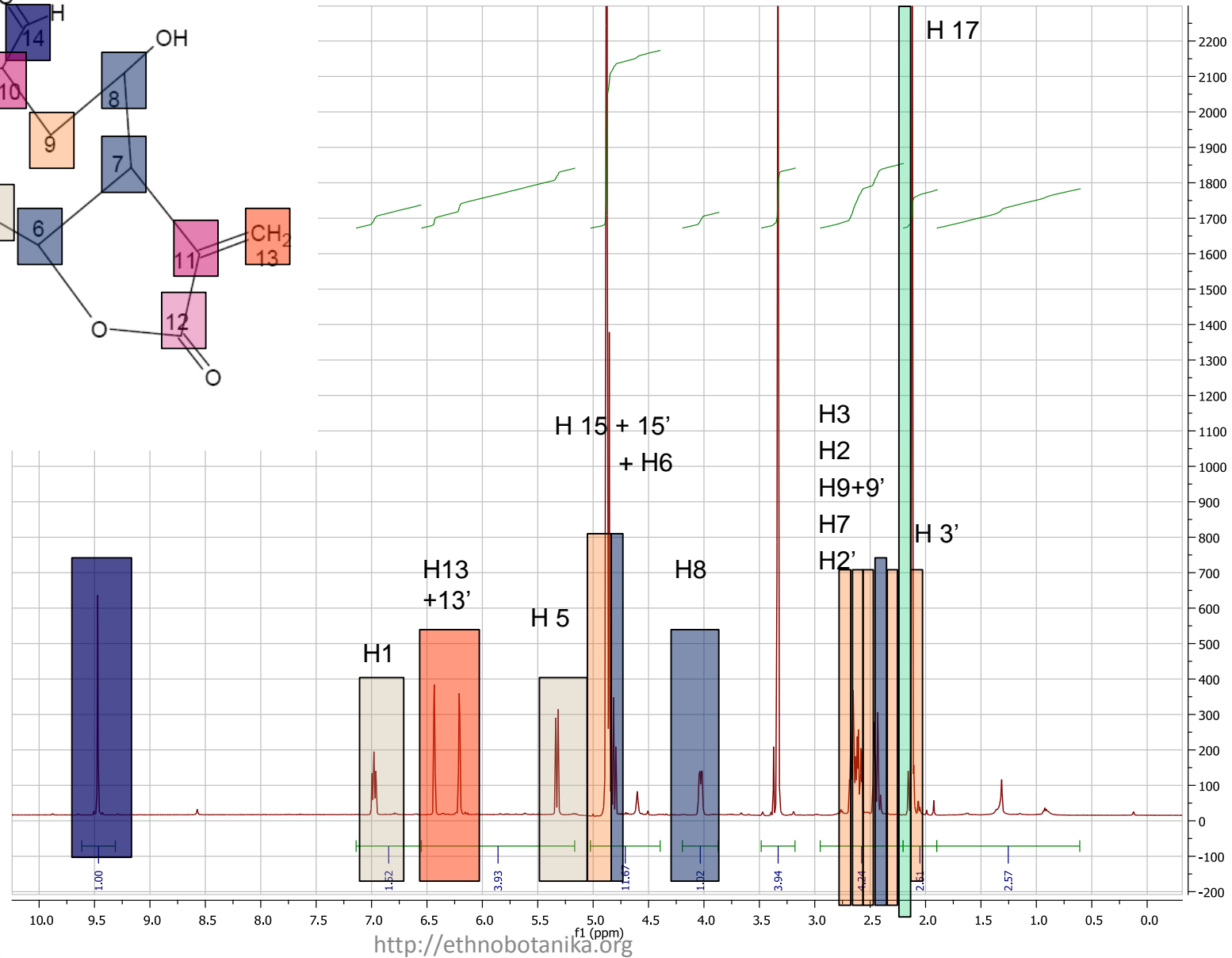
VII. Identification structurale de F9A : RMN ¹H



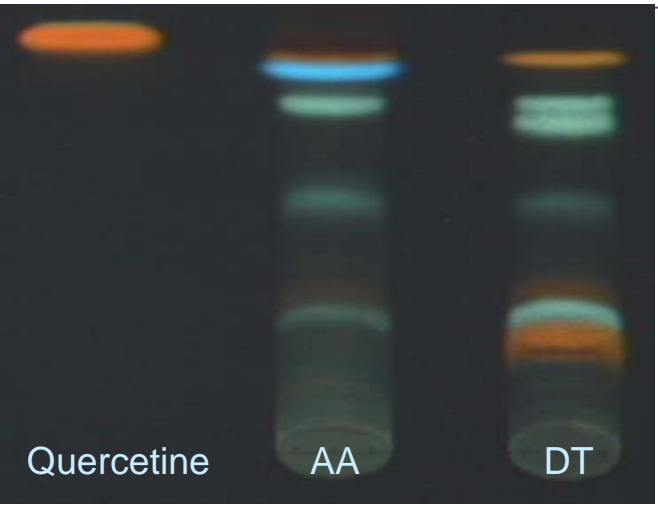
1 CH₃

5 CH₂

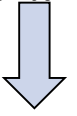
6 CH



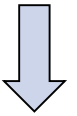
VIII. Etude des flavonoïdes de *Dicoma tomentosa* (extr. EtOH 50%)



Comparaison des flavonoïdes de *Dicoma tomentosa* et d'*Artemisia annua*

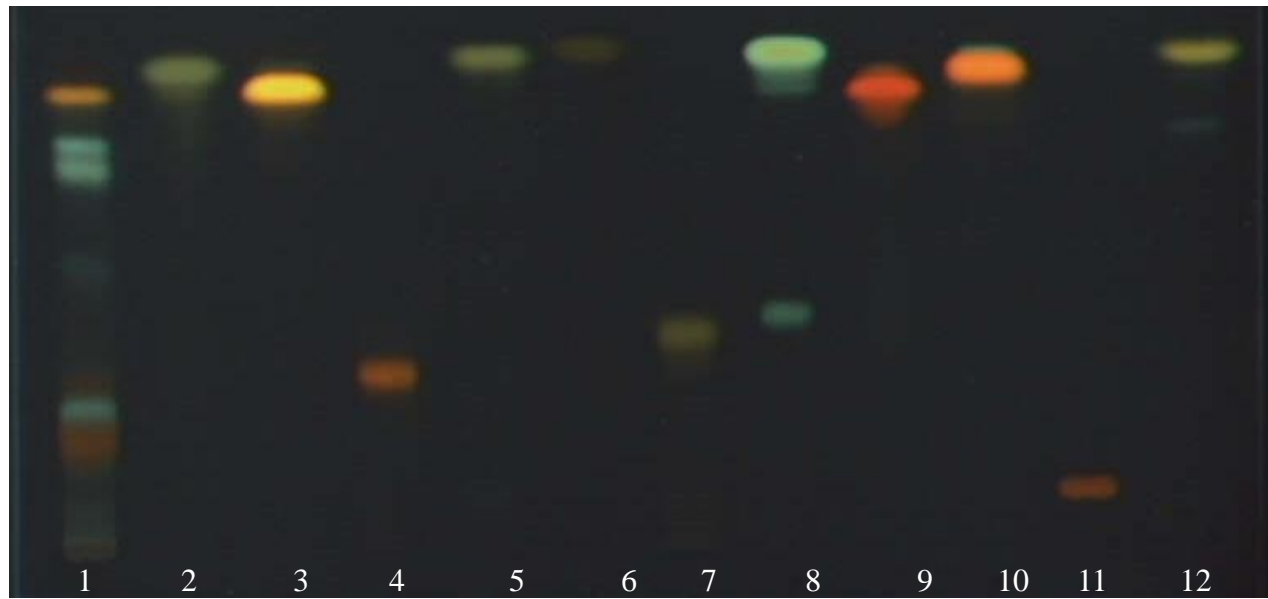


Plusieurs spots en communs



Comparaison avec les substances de référence connues dans Artemisia et disponible au labo

1. Extrait DT ETOH 50%
2. Apigénine
3. Lutéoline
4. Lutéoline-7-glc
5. Acacétine
6. Chrysine
7. Astragaline
8. Kaempferol
9. Myricétine
10. Quercétine
11. Rutine
12. Rétusine

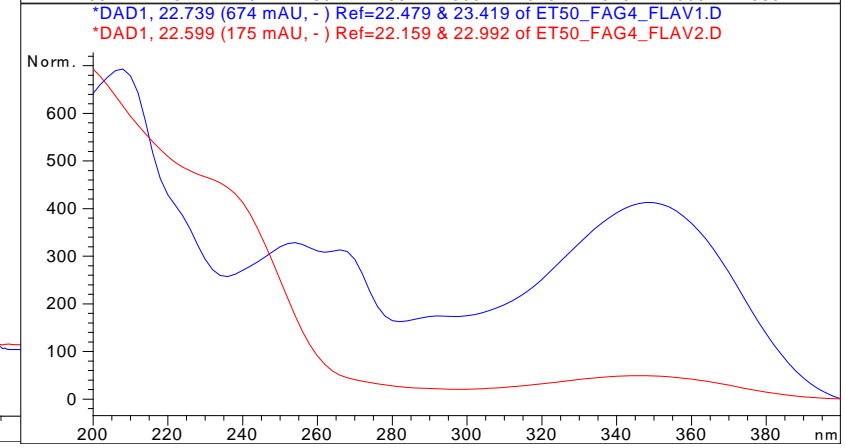
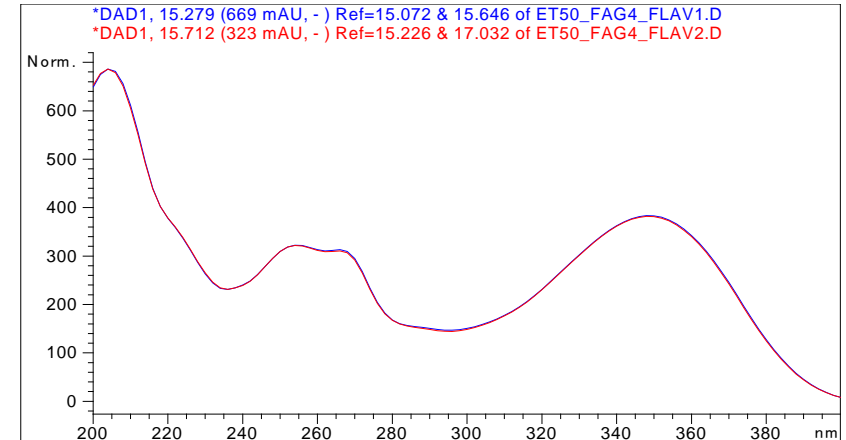
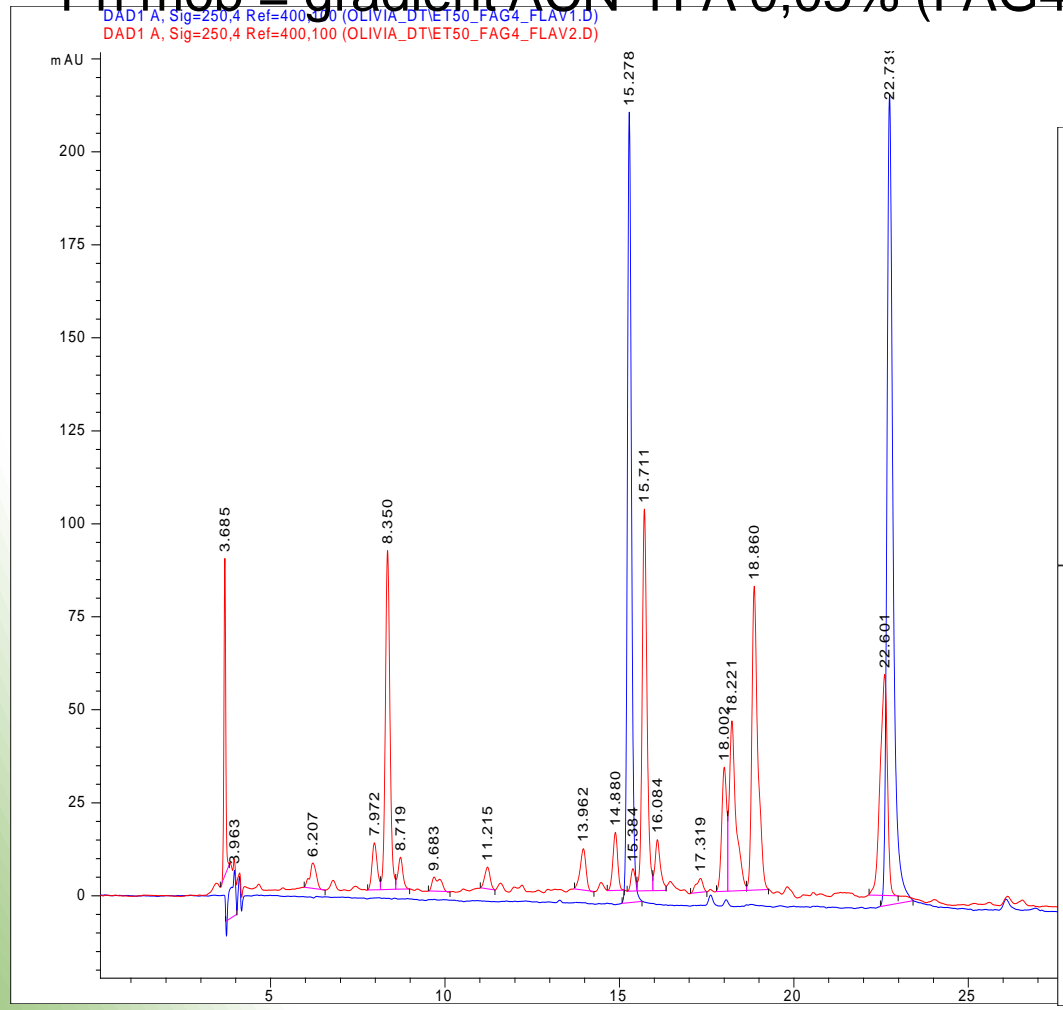


VIII. Etude des flavonoïdes de *Dicoma tomentosa*

2. HPLC : Echantillons : **DT ETOH 50 (02)** et **T luteoline + ~-7Glc (01)**

Ph stat = Pursuit diphenyl

Ph mob = gradient ACN-TFA 0,05% (FAG4)



Perspectives

Dicoma tomentosa Cass.

- Publication (n° 3) en préparation
- Résultats génotoxicité
- Stade d'action PA / *Plasmodium falciparum* ?
- Continuer investigation des flavonoïdes (& des terpènes ?)



Autres plantes:

Psorospermum senegalense Spach.

- Problèmes synonymie botanique → en suspend



Gardenia sokotensis Hutch

- **Ecartée** car activité cytotoxique > activité antiplasmodiale (IS= 0,9)
- Pas d'étude phytochimique dans la littérature pour cette espèce
- Activité *in vivo* démontrée (Traoré 2003) mais pas de PA isolé
- Autre *Gardenia* (*G. saxatilis*) antiplasmodial → triterpènes
- **Essayer un fractionnement pour isoler les PA (?)**



Merci pour votre attention



Les monographies simplifiées de la plupart des plantes présentées ici et les travaux de recherche sont disponibles en ligne sur le site :

<http://ethnobotanika.org>