

ACTIVITE IN VITRO D'EXTRAITS PURIFIES DE KHAYA GRANDIFOLIA (MELIACEAE) SUR PLASMODIUM FALCIPARUM

BICKI P., NJIKAM NJIFUTIE, AYAFOR FOYERE J., RINGWALD P. *uscal*

RESUME

L'extension de la résistance du paludisme à la chloroquine et à la plupart des antipaludiques classiques nécessite le développement de nouvelles molécules antipaludiques. Les plantes médicinales ont été longtemps utilisées dans le traitement des fièvres et du paludisme. Nous avons utilisé le semi-microtest isotopique pour étudier *in vitro*, l'activité de 4 extraits purifiés de *Khaya grandifolia* (Kh0, Kh1, Kh2, Kh3) sur 10 isolats de *Plasmodium falciparum* et un clone chloroquino-résistant W2. Conjointement, ont été étudiées la sensibilité des isolats à la chloroquine et la combinaison des extraits avec la chloroquine. Les résultats ont été exprimés en concentrations inhibitrices 50% (CI50). Parmi les 10 isolats, 4 étaient chloroquino-résistants (CI50 > 100nM). Les moyennes (\pm SD) des CI50 pour les isolats sont les suivantes : Kh0 : $9,9 \pm 7,1 \mu\text{g/ml}$; Kh1 : $3,8 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$; Kh2 : $10,0 \pm 6,8 \mu\text{g/ml}$; Kh3 : $16,3 \pm 8,1 \mu\text{g/ml}$. Pour le clone W2, les tests ont été effectués en triplicate et les valeurs obtenues sont les suivantes : Kh0 : $19,4 \pm 4,0 \mu\text{g/ml}$; Kh1 : $6,8 \pm 5,0 \mu\text{g/ml}$; Kh2 : $10,4 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$; Kh3 : $28,1 \pm 8,5 \mu\text{g/ml}$. Ces résultats démontrent une activité modérée *in vitro* de *K. grandifolia* sur *P. falciparum*. Les tests de combinaison utilisant le clone W2 n'ont pas montré de synergie entre les extraits et la chloroquine. Toutefois des investigations complémentaires sont nécessaires pour prouver son efficacité thérapeutique.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, chimiorésistance, *Khaya grandifolia*, Méliaceae, test *in vitro*.

INTRODUCTION

L'extension de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine et la survenue des multi-résistances nécessitent le développement de nouvelles molécules obtenues soit par synthèse, soit à partir des plantes naturelles. Dans les pays tropicaux et subtropicaux du globe, où le paludisme est endémique, les plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner le paludisme (Phillipson et O'Neil, 1986 ; Noster et Kraus, 1990). Les extraits de plantes ainsi que leurs produits ont été soumis à des tests *in vivo* et *in vitro* avec des résultats intéressants pour la plupart (Fandeur *et al.*, 1984 ; O'Neil *et al.*, 1985 ; Noster et Kraus, 1990 ; Weenen *et al.*, 1990 ; Ratsimamanga-Uverget *et al.*, 1990 ; Bray *et al.*, 1990 ; Agbaje et Onabanjo,

1991 ; Koumaglo *et al.*, 1991 ; Ekong *et al.*, 1991 ; Presber *et al.*, 1992 ; Gessler *et al.*, 1993). Plusieurs espèces de Méliacées ont été utilisées en médecine traditionnelle comme antipaludiques ou comme fébrifuges (*Azadirachta indica*, *K. grandifolia*, *Guarea multiflora*, *Cedrela odorata*, *Entendrophragma bussei*) (Obih *et al.*, 1985 ; Makinde *et al.*, 1988 ; Weenen *et al.*, 1990 ; Bray *et al.*, 1990). Elles produisent des terpénoïdes, en particulier des limonoïdes avec des structures comparables à celles des quassinoïdes dont les activités antipaludiques et cytotoxiques ont été démontrées *in vitro* (Bray *et al.*, 1990). Le genre *Khaya* est composé de plusieurs grands arbres tropicaux constitués essentiellement d'acajous. Trois espèces ont été identifiées au Cameroun à savoir *K. anthotheca*, *K. ivorensis*, *K. grandifolia*, cette dernière ayant fait l'objet de la présente étude. Sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle (antiplasmodiale et antifilarienne), plusieurs extraits de *K. grandifolia* ont été isolés et leurs structures chimiques sont en cours d'analyse. Nous avons testé la sensibilité *in vitro* d'un

1. Laboratoire de Recherches sur le Paludisme, LAF 302, OCEAC, BP. 288 Yaoundé, Cameroun.
2. Département de Biologie et Physiologie Animales, Université de Yaoundé I, BP. 812 Yaoundé, Cameroun.
3. Département de Chimie Organique, Université de Yaoundé I, BP. 812 Yaoundé, Cameroun..



clone chloroquino-résistant et des isolats de *P. falciparum* à des extraits purifiés de *K. grandifolia* conjointement à celle de la chloroquine ainsi que la combinaison de ces extraits avec la chloroquine *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Les parasites

Les isolats de *P. falciparum* ont été obtenus à partir des prélèvements veineux au pli du coude de patients consultant au dispensaire de Nlongkak, pour accès palustre avec une parasitémie monospécifique supérieure à 0,2%. Le clone W2 de *P. falciparum* (parent IndochinaI/CDC) a été obtenu par micromanipulation. Ce clone est résistant à la chloroquine, à la pyriméthamine et au cycloguanil, mais sensible à la quinine, à la méfloquine et à l'halofantrine (Oduola *et al.*, 1987). Le clone W2 a été maintenu en culture continue selon la technique décrite par Trager et Jensen (1976). La culture est faite en milieu de culture RPMI-1640 enrichi de 10% de sérum humain AB à un hémocrite compris entre 3-5%. Ce milieu de culture est changé quotidiennement et un frottis réalisé chaque jour et coloré au *Giemsa* a permis de déterminer le pourcentage de croissance du clone. Pour maintenir une bonne croissance et abaisser les parasitémies entre 0,5-1%, la culture est diluée avec des hématies saines du groupe A.

Les molécules

Les écorces de tronc de *K. grandifolia* ont été pulvérisées après séchage. Les extractions ainsi que l'isolement des composés individuels ont été réalisés avec des solvants de polarité croissante et par des techniques chromatographiques. Plusieurs extraits purifiés ont été obtenus dont 4 seulement ont été étudiés à savoir Kh0, Kh1, Kh2, et Kh3. En parallèle, nous avons utilisé du sulfate de chloroquine (Spécia, Paris, France).

La solution mère de chloroquine a été préparée après dilution dans de l'eau distillée stérile tandis que les extraits purifiés de *K. grandifolia* ont été dilués dans du méthanol pur. Avant utilisation, 8 concentrations choisies pour chaque médicament ont été distribuées en série dans les 24 puits des plaques de culture en duplicate ou en triplicate, 3 puits servant de témoins (sans médicament). Les gammes utilisées ont été les suivantes : 12,5-1600nM pour la chloroquine et 1-128µg/ml pour les extraits purifiés.

Le test *in vitro* de chimiosensibilité

Le test a été effectué selon la technique classique du semi-microtest de Le Bras et Deloron (1984) avec les modifications suivantes. Après prélèvement ou après culture (pour le clone), les hématies parasitées sont lavées trois fois avec du RPMI-1640 contenant 25mM de HEPES et 25mM de NaHCO₃. Les parasitémies supérieures à 1% ont été diluées avec des hématies saines du groupe A, afin d'obtenir une parasitémie initiale entre 0,1-0,5%. Une suspension d'hématies parasitées à un hémocrite de 1,5% dans 700µl de RPMI-1640 contenant 25mM de HEPES, 25mM de NaHCO₃ et 10% de sérum humain AB est distribuée dans chaque puits des plaques de culture contenant des doses croissantes d'antipaludiques. Les parasites sont incubés à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂, 17-18 de O₂ et 95% d'humidité pendant 42 heures. Après 18 heures d'incubation, 25µl (1µCi) d'une solution d'hypoxanthine tritiée (Amersham, Buckinghamshire, Royaume-Uni), ont été rajoutés dans chaque puits afin de mesurer l'index de croissance parasitaire. A la fin de la période d'incubation, les plaques sont congelées puis décongelées et le contenu des puits est recueilli sur des disques de papier filtre à fibres en verre. Ces disques sont séchés et placés dans des flacons de scintillation contenant 2 ml de liquide scintillant (OCS, Amersham, Royaume-Uni) pour comptage au spectrophotomètre à scintillation liquide (Wallac 1409, Pharmacia, Uppsala, Suède) pendant 60 secondes.

Les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice 50% (CI50) correspondant à la concentration de médicament inhibant 50% de la croissance des parasites. La CI50 a été calculée à partir d'une droite de régression log-logit de la courbe dose-réponse. Le seuil de sensibilité de la chloroquine a été fixé à 100nM.

Les combinaisons médicamenteuses : le test de synergie

Le test a été effectué en duplicate selon les techniques décrites par Basco et Le Bras (1990), Basco *et al.* (1991), Ekong *et al.* (1991). Avant la réalisation du test, la sensibilité du clone W2 a été évaluée à la chloroquine ainsi qu'aux extraits purifiés afin de déterminer leur CI50 respective. Trois concentrations sub-inhibitrices des extraits inférieures à la CI50 de l'extrait correspondant ont été choisies pour être testées en combinaison avec la chloroquine. Les concentrations sub-

inhibitrices sont les suivantes : 2-4-8µg/ml pour Kh0, Kh2 et Kh3 et 1-2-4µg/ml pour Kh1. Les tests *in vitro* ont été effectués en associant la chloroquine aux 3 doses croissantes d'extraits de *K. gandifolia*. Les CI50 ainsi obtenues ont été utilisées pour construire des isobogrammes dont l'axe des abscisses correspond au rapport de la CI50 du mélange chloroquine-extrait/CI50 de la chloroquine seule et l'axe des ordonnées au rapport des concentration de l'extrait ajoutée à la chloroquine/CI50 de l'extrait correspondant (Chawira *et al.*, 1987 ; Chawira et Warhurst, 1987 ; Martin *et al.*, 1987 ; Basco et Le Bras, 1990 ; Basco *et al.*, 1991 ; Ekong *et al.*, 1991). Une diagonale joint les points exprimés par les valeurs des CI50 des drogues individuelles. Les points situés au-dessus de la droite indiquent un antagonisme, ceux en dessous une synergie. Les points proches de la ligne indiquent une interaction additive.

RESULTATS

Les tests *in vitro* ont été effectués en triplicate pour le clone W2. Les résultats sont donnés dans le tableau I.

Tableau I

Sensibilité *in vitro* de 4 extraits de *Khaya gandifolia* sur le clone W2 (n=3). Les résultats sont exprimés en nM pour la chloroquine (CQ) et en mg/ml pour les extraits.

	CQ	Kh0	Kh1	Kh2	Kh3
Moyenne des CI50	240,38	16,42	6,79	10,44	28,09
SD	18,19	4,02	5,01	1,83	8,5

La sensibilité de 10 isolats de *Plasmodium falciparum* a été testée vis-à-vis des extraits purifiés de *K. gandifolia*. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

Il n'existe pas de différence significative entre les valeurs des CI50 des isolats chloroquino-résistants et chloroquino-sensibles pour les différents extraits (tableau III).

Les résultats des isobogrammes ont montré soit un effet faiblement additif soit un effet antagoniste entre la chloroquine et les différents extraits (figure 1).

Tableau II

CI50 de 4 extraits de *Khaya gandifolia* sur 10 isolats de *Plasmodium falciparum*. Les résultats sont exprimés en nM pour la CQ et en µg/ml pour les extraits

	CQ	Kh0	Kh1	Kh2	Kh3
Isolat 1	40,91	7,32	5,52	7,88	9,63
Isolat 2	24,62	8,13	4,13	6,01	8,8
Isolat 3	23,45	10,1	3,36	6,12	8,89
Isolat 4	99,8	5,66	4,11	5,3	18,54
Isolat 5	22,21	2,34	0,86	6,96	22,02
Isolat 6	390,96	24,03	6,02	24,47	33,12
Isolat 7	30,64	21,27	5,48	20,7	24,35
Isolat 8	119,96	4,86	2,74	8,11	16,04
Isolat 9	119,73	9,45	3,18	8,46	10,18
Isolat 10	196,29	6,14	3,03	5,91	11,84

Tableau III

Comparaison des CI50 des extraits purifiés de *Khaya gandifolia* de 10 isolats de *Plasmodium falciparum* en fonction de la sensibilité à la chloroquine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

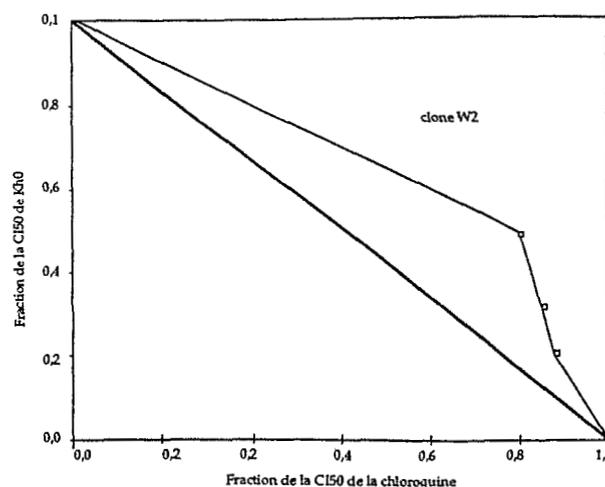
Molécules	Isolats chloroqui-nosensibles (n=6)	Isolats chloroqui-norésistants (n=4)
Chloroquine(a)	40,3 ± 30	206,7 ± 128
Kh0(b)	9,14 ± 6,5	11,1 ± 8,8
Kh1(b)	3,91 ± 1,7	3,74 ± 1,5
Kh2(b)	8,82 ± 5,9	11,7 ± 8,6
Kh3(b)	15,4 ± 7,1	17,8 ± 10,5

(a) : résultats exprimés en nM

(b) : résultats exprimés en µg/ml

Figure 1

Isobogramme de l'interaction entre la chloroquine et l'extrait Kh0 avec le clone W2



DISCUSSION

Les valeurs moyennes de CI50 obtenues avec les extraits purifiés de *K. grandifolia* sont toutes inférieures à 20µg/ml et à 30µg/ml pour les isolats et pour le clone W2, respectivement. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec les extraits d'écorce d'*Entendrophragma bussei* et meilleurs que ceux obtenus avec les extraits de *Azadirachta indica* (Weenen *et al.*, 1990), de *Guerea multiflora*, de *Cedrela odorata* et de *Melia azadarach* (Bray *et al.*, 1990).

Comparés à d'autres espèces d'arbres ou de plantes, nos résultats sont équivalents à ceux trouvés avec les extraits de *Coutrera latiflora* et *Exostema caribaeum* (Noster et Kraus, 1990), les extraits bruts de *Artemisia annua* (O'Neill *et al.*, 1985) et meilleurs que ceux obtenus avec *Cochlospermum angolense* (Presber *et al.*, 1990). Cependant, l'activité de nos extraits reste 10 à 100 fois inférieure à celle de l'artémisinine et à celle de la quinine qui sont devenues des médicaments de référence issus de la pharmacopée traditionnelle (Bray *et al.*, 1990).

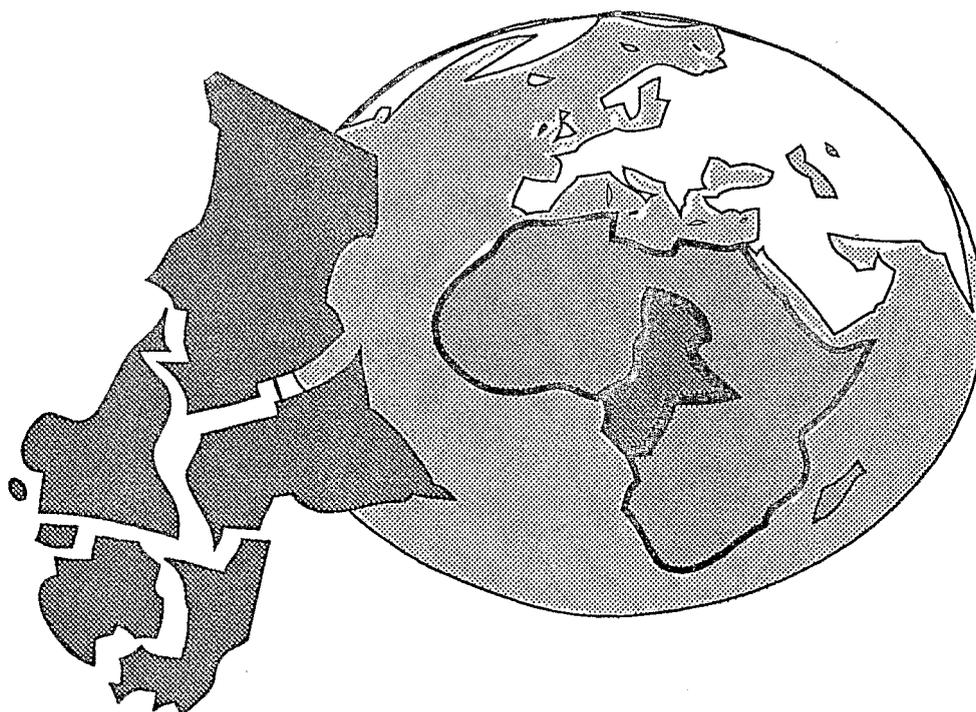
Contrairement à ce qui a été décrit par certains auteurs (Ye *et al.*, 1989 ; Ekong *et al.*, 1991 ; Ye *et al.*, 1993 ; Ratsimamanga-Uverg *et al.*, 1994 ; Ratsimamanga-Uverg *et al.*, 1994), nous n'avons pas retrouvé de synergie entre la chloroquine et les extraits étudiés. Les résultats de cette étude ne peuvent pas directement être corrélés aux effets du traitement traditionnel car les méthodes de préparation, les effets des combinaisons des extraits ainsi que les conditions de conservation ne sont pas les mêmes. Il est à signaler que le test *in vitro* ne reproduit pas avec précision la situation *in vivo*, car certains extraits et composés chimiquement purs pourraient devenir actifs seulement après des processus métaboliques spécifiques *in vivo*.

Nos résultats montrent une activité antipaludique modérée des extraits purifiés de *K. grandifolia in vitro* et l'absence de synergie avec la chloroquine. Toutefois des études complémentaires *in vivo* seraient nécessaires pour justifier leur usage thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Agbaje EO, Onabanjo AO. The effects of extracts of *Enantia chloranta* in malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1991 ; 85 : 585-90.
- 2- Bray DH, Warhurst DC, Connolly JD, O'Neill MJ, Phillipson JD. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliceae plants and their constituent limonoïds. *Phytother Res* 1990 ; 4 : 29-35.
- 3- Basco LK, Le Bras J. Reversal of chloroquine resistance with desipramine in isolates of *Plasmodium falciparum* from Central and West Africa. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1990 ; 84 : 479-81.
- 4- Chawira AN, Warhurst DC. The effect of artemisinin combined with standard antimalarials against chloroquine-sensitive and -resistant strains of *Plasmodium falciparum in vitro*. *J Trop Med Hyg* 1987 ; 90 : 1-8.
- 5- Ekong R, Partridge SJ, Anderson MM, Kirby GC, Warhurst DC, Russell PF, Phillipson JD. *Plasmodium falciparum* : effects of phaeanthine, a naturally-occurring bis benzylisoquinoline alkaloid on chloroquine-resistant and -sensitive parasites *in vitro*, and its influence on chloroquine activity. *Ann Trop Med Parasitol* 1991 ; 85 : 205-13.
- 6- Fandeur T, Moretti C, Polonsky J. *In vitro* and *in vivo* assesment of the antimalarial activity of Sergeolide. *Planta Med* 1985 ; 61 : 20-3.
- 7- Gessler MC, Nkunya MHH, Mwasumbi LB, Heinrich M, Tanner M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Trop* 1993 ; 56 : 65-77.
- 8- Koumaglo K, Gbeassor M, Nikabu O, de Souza C, Werner W. Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*. *Planta Med* 1991 ; 58 : 533-4.
- 9- Le Bras J, Adrieu B, Hatin I, Savel J, Coulaud JP. *Plasmodium falciparum* : interprétation du semi-microtest de sensibilité *in vitro* par incorporation de 3H-hypoxanthine. *Path Biol* 1984 ; 32 : 463-6.
- 10- Martin SK, Oduola AMJ, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987 ; 235 : 899-901.
- 11- Noster S, Kraus LJ. *In vitro* antimalarial activity of *Coutrera latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Med* 1990 ; 56 : 63-5.
- 12- Obih PO, Makinde JM, Laoye J. Investigations of various extracts of *Morinda lucida* for antimalarial actions on *Plasmodium berghei* in mice. *Afr J Med Sci* 1985 ; 14 : 45-9.

- 13- O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 1. *In vitro* test method for evaluation of crude extracts from plants. *Planta Med* 1985 ; 61 : 394-7.
- 14- Presber W, Hegenscheid B, Hernandez-Alvarez H, Herrmann D, Brendel C. Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* *in vitro* by an extract of *Cochlospermum angolense* (Welw). *Acta Trop* 1992 ; 50 : 331-8.
- 15- Ratsimamanga-Uverg S, Rasoanaivo P, Rakoto-Ratsimamanga A, Le Bras J, Ramiliarisoa O, Savel J. Antimalarial activity and cytotoxicity of *Ficus pyrifolia* and *Rhus* (= *Baronia*) *taratana* leaf extract. *Phytother Res* 1990 ; 4 : 1-3.
- 16- Ratsimamanga-Uverg S, Rasoanaivo P, Milijoana R, Rakotoarimanga J, Rafatro H, Robijoana B, Rakoto-Ratsimamanga A, Verdier F, Le Bras J. *In vitro* antimalarial activity, chloroquine potentiating effect and cytotoxicity of alkaloids of *Hernandia voyronii* Jum. (Hernandiaceae). *Phytother Res* 1994 ; 8 : 18-21.
- 17- Ratsimamanga-Uverg S, Rasoanaivo P, Rafatro A, Robijoana B, Rakoto-Ratsimamanga A. *In vitro* antiplasmodial activity and chloroquine-potentiating action of three new isoquinoline alkaloid dimers isolated from *Hernandia voyronii* Jumelle. *Ann Trop Med Parasitol* 1994 ; 88 : 271-7.
- 18- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976 ; 193 : 674-5.
- 19- Weenen H, Nkunya MHH, Bray DH, Mwasumbi LB, Kinabo LS, Kilimali VAEB. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. *Planta Med* 1990 ; 56 : 368-70.
- 20- Ye Z, Van Dyke K. Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Comm* 1989 ; 159 : 242-8.
- 21- Ye Z, Van Dyke K, Yang B. Interaction of berbamine and chloroquine or artemisinin against chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Drug Develop Res* 1993 ; 30 : 229-37.



Le
BULLETIN
de liaison et de documentation
de
I'OCEAC



PH 253

23 JUIN 1997

Volume 30(2) : 2^{ème} trimestre 1997



**ORGANISATION DE COORDINATION POUR LA LUTTE
CONTRE LES ENDEMIES EN AFRIQUE CENTRALE**

SECRETARIAT GENERAL B.P. 288 YAOUNDE REPUBLIQUE DU CAMEROUN
TEL : 237 23 22 32 FAX : 237 23 00 61 TELEX : 8411 KN