Etude de l'activité antitrypanosomale in vitro de Strychnos spinosa Lam (Plante utilisée en médecine traditionnelle béninoise pour traiter la maladie du sommeil)

Ing. J. COPPEZ
Lic. B. PIRSON
ISICHt – Mons

Les feuilles de Strychnos spinosa Lam., une plante africaine, contiennent des substances chimiques capables d'inhiber la croissance des trypanosomes africains, responsables de la maladie du sommeil. L'objectif de ce travail consiste à mettre au point une technique de fractionnement (High Speed Counter Current Chromatography (HSCCC)) des molécules extraites des feuilles de manière à isoler et à purifier le(s) principe(s) actif(s) contenu(s) dans la plante.

Mots-clefs : maladie du sommeil, trypanosome, HSCCC.

The leaves of Strychnos spinosa Lam., an African plant, contain molecules that can inhibit the growth of the African trypanosomes responsible of sleeping sickness. The aim of this work is to develop a fractionation technique (High Speed Counter Current Chromatography (HSCCC)) to isolate and purify the active principle(s) contained in the leaf extract.

Keywords : sleeping sickness, trypanosome, HSCCC.

1. Introduction

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Catholique de Louvain. La pharmacognosie consiste en l'étude des matières premières et des substances pharmacologiquement actives (ou utilisées dans la fabrication de médicaments) d'origine biologique, c'est-à-dire obtenues à partir des végétaux, des animaux ou encore par fermentation à partir de micro-organismes [1].
Le laboratoire de Pharmacognosie est en relation avec d'autres laboratoires de pays tels que le Bénin et Madagascar; pays dans lesquels les habitants se soignent encore quasi exclusivement à l'aide de plantes. Certaines d'entre elles sont analysées au laboratoire dans le but d'en valider l'utilisation par l'isolement et l'identification de la ou des molécules responsables de l'activité observée.
Il faut savoir que plus de 60% des médicaments sont d'origine naturelle et que depuis plusieurs années, l'intérêt envers les composés naturels biologiquement actifs est en constante augmentation.

1.1 Maladie du sommeil ou Trypanosomiase Africaine (TA)

La Trypanosomiase Africaine, plus communément appelée « maladie du sommeil » est une maladie parasitaire à transmission vectorielle.

Le parasite responsable est un protozoaire flagellé ; il existe différentes sous espèces de *Trypanosoma brucei* (trypanosome).

Figure 1 : Image d'un trypanosome

Les glossines, plus connues sous le nom de mouches tsé-tsé, agents vecteurs, sont des insectes diptères qui piquent de jour et qui sont attirés par des couleurs sombres. Ce sont des insectes gris brun de la taille d'une abeille ; leur durée de vie est d'environ trois mois.

Figure 2 : Mouche tsé-tsé

La maladie est causée par la transmission des parasites aux vertébrés à la suite d'une piqûre d'une mouche tsé-tsé infectée mâle ou femelle. Les hôtes vertébrés sont soit les animaux domestiques (chiens, moutons, etc...) ou sauvages (buffles, antilopes, etc…), soit les êtres humains.
Le cycle du parasite est uniquement extracellulaire et alterne entre le sang et les tissus de l'hôte vertébré et entre le tractus intestinal et les glandes salivaires de l'insecte. En l'absence de soins, la mort est inéluctable.

Les traitements actuels présentent de nombreuses limitations, ainsi :

- très peu de molécules sont disponibles dans le commerce ;
- des effets secondaires non négligeables apparaissent ;
- l'administration du traitement est le plus souvent par voie parentérale et est de longue durée ce qui nécessite une hospitalisation ;
- le traitement est de ce fait très coûteux et n'est pas accessible à la population rurale infectée ;
- une augmentation des résistances est également constatée.

Il existe donc un besoin urgent de découvrir de nouvelles molécules efficaces, non toxiques, si possible bon marché et facilement administrées sur un intervalle de temps relativement court.
C'est pourquoi, les plantes peuvent être une source potentielle car elles contiennent une grande variété de structures chimiques ayant des activités

biologiques diverses (terpènes (précurseurs d'hormones), alcaloïdes, etc…). D'ailleurs, 80% de la population des pays du Sud a recours à la médecine traditionnelle qui utilise essentiellement des remèdes à base de plantes.
De plus, très peu d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antitrypanosomale d'extraits ou de composés isolés de plantes.

1.2 La plante Strychnos spinosa Lam

Le laboratoire de l'UCL travaille en collaboration avec un laboratoire de Pharmacognosie du Bénin et l'étude a débuté par l'analyse de cinq plantes béninoises utilisées traditionnellement pour traiter la maladie du sommeil. La plante *Strychnos spinosa* Lam. a été sélectionnée d'une part, parce que les molécules extraites de ses feuilles avaient la meilleure activité antitrypanosomale *in vitro* et, d'autre part parce que ces mêmes molécules présentaient une faible toxicité sur les cellules mamifères *in vitro*.

Strychnos spinosa Lam., arbuste épineux à feuilles caduques, appartient à la famille des Loganiacées. Cette espèce présente des caractéristiques très variables non seulement d'une plante à l'autre mais également au sein d'une même plante comme par exemple la forme et la taille des feuilles. On la retrouve dans la savane arborée-arbustive et elle présente une très large distribution dans toute l'Afrique intertropicale.

Figure 3 : Photo de Strychnos spinosa Lam

Cette plante est connue sous le nom d' « oranger de brousse » car elle présente, à maturité, un fruit jaune et globuleux dont la pulpe est comestible.

Figure 4 : Fruit de Strychnos spinosa Lam.

La composition des feuilles de *Strychnos spinosa* Lam. a très peu été étudiée, exception faite de son contenu en alcaloïdes. La famille des Loganiacées est connue pour sa richesse en alcaloïdes indoliques mais *Strychnos spinosa* Lam. n'en contient que très peu. D'ailleurs, seulement trois molécules ont été isolées.
Les feuilles de *Strychnos spinosa* Lam. sont utilisées traditionnellement pour diverses affections. En plus de l'utilisation pour traiter la maladie du sommeil, d'autres usages ont été rapportés telles que :

- les troubles gastro-intestinaux: diarrhées, coliques, etc… ;
- les douleurs oculaires : conjonctivite, etc… ;
- la malaria ;
- la morsure de serpent, etc…

2. But du travail

Dans le cadre de ce mémoire, le travail proposé consiste à mettre au point une technique de fractionnement bioguidé (la High Speed Counter Current Chromatography – HSCCC) des molécules présentent dans les feuilles de *Strychnos spinosa* Lam., et ce afin d'isoler et de purifier le(s) principe(s) actif(s) contenu(s) dans la plante. Chaque fraction obtenue après séparation par cette méthode sera analysée par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et testée pharmacologiquement *in vitro* sur des trypanosomes. Dans le futur, les fractions les plus actives seront soumises à de nouvelles purifications jusqu'à l'obtention d'une molécule active pure.
Nous avons également évalué l'activité antitrypanosomale *in vitro* de nouveaux arrivages de feuilles de *Strychnos spinosa* Lam.

3. Matériel et méthodes

3.1 Percolation

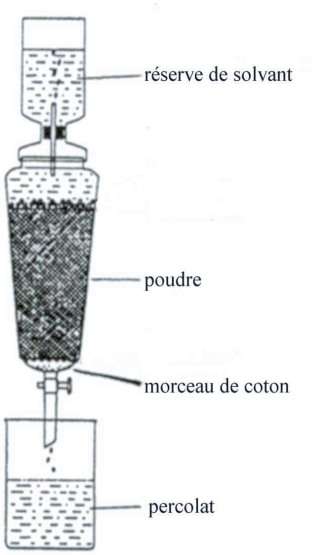

Figure 5 : Schéma d'un percolateur utilisé en laboratoire

Les feuilles séchées sont broyées en une poudre fine et homogène, imprégnées de dichlorométhane (CH_2Cl_2), puis introduite dans un percolateur . Le dichlorométhane est un solvant peu polaire solubilisant des molécules telles que les terpènes, les alcaloïdes, les pigments, etc…. Il s'écoule alors lentement au travers de la poudre de manière à obtenir la meilleure extraction possible. L'extrait (ou percolat) est finalement récolté.

3.2 Obtention d'un extrait sec

Le dichlorométhane étant particulièrement volatile, il est évaporé sous pression réduite (rotavapor) et ainsi éliminé du percolat. Nous récupérons dès lors un extrait sec.

3.3 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une méthode très employée au cours de notre travail ; elle nous permet d'analyser, rapidement et à faible coût, la composition des extraits.
A l'aide d'une seringue, nous déposons les échantillons au bas d'un support pour chromatographie (gel de silice). Celui-ci est alors introduit verticalement dans une cuve chromatographique contenant un solvant. Par capillarité, ce dernier migrera sur le support jusqu'à environ 1 cm du bord supérieur. Les différents constituants des extraits analysés se sépareront en fonction de leur affinité soit pour la phase fixe (le support de silice), soit pour la phase mobile (le solvant).

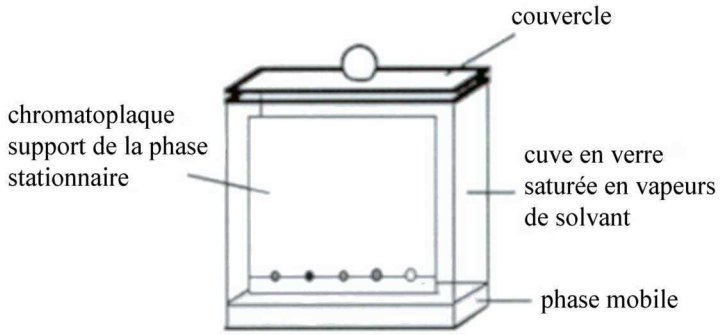

Figure 6 : Schéma d'une cuve chromatographique.

Plusieurs méthodes de détection sont utilisées ; elles dépendent de la nature des constituants contenus dans l'échantillon. Dans notre cas, nous avons recours à des réactifs plus ou moins spécifiques qui sont vaporisés sur la phase stationnaire ; il s'agit de l'anisaldéhyde sulfurique qui réagit essentiellement avec les terpènes et du réactif de « Dragendorff » qui réagit avec les alcaloïdes.

3.4 Fractionnement bioguidé par High Speed Counter Chromatography (HSCCC)

Figure 7 : Photographie de l'appareillage chromatographique HSCCC employé au laboratoire

Il s'agit d'une chromatographie à contre courant à grande vitesse qui permet un fractionnement bioguidé. Cette technique est basée sur le partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles (phases stationnaire et mobile) d'un système de solvants biphasique.
L'appareil est constitué de deux bobines animées d'une rotation sur elles-mêmes et d'un mouvement planétaire. La phase stationnaire est maintenue dans les bobines par un champ de force centrifuge et la phase mobile la traverse.
La rotation des bobines assure à certains endroits des échanges de masse entre les deux phases (zones de turbulence) alors qu'aux autres endroits, il y a séparation des phases (zone de repos).

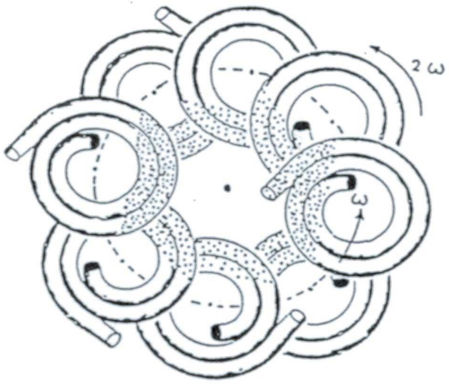

Figure 8 : Schéma représentant la zone d'agitation (interne) et la zone de séparation (externe) au sein des spires en rotation

Dans la zone d'agitation, une infinité de gouttelettes se forme ce qui permet aux solutés de passer dans l'une ou l'autre phase selon leur coefficient de partage. Cette zone correspond à l'étape d'agitation dans une ampoule à décanter. Dans la zone de séparation, les deux phases non miscibles se séparent et cette zone correspond à la phase de décantation dans une ampoule à décanter.

⇒ *Recherche d'un système de solvants biphasique*

Le système de solvants doit satisfaire à trois critères car c'est une étape importante pour une bonne séparation des constituants:

- le volume des deux phases doit être le plus équivalent possible;
- les solutés à séparer doivent présenter des coefficients de partage proches de 1 (0,5 à 2). Les solutés à séparer doivent donc se répartir plus ou moins équitablement entre la phase supérieure et la phase inférieure du système de solvants;
- le temps que met le ménisque entre les deux phases non miscibles pour se reformer après agitation (« settling time » = temps de décantation) doit être idéalement inférieur à 30 secondes[2]. Si ce n'est pas le cas, une perte graduelle de phase stationnaire est observée au cours de la séparation.

Nous testons par essais et erreurs successifs différents systèmes de solvants dans une ampoule à décanter en analysant la répartition des solutés dans les deux phases par CCM.

⇒ *Choix des phases mobile et stationnaire*

En général, pour des raisons pratiques, la phase la plus volatile est choisie pour constituer la phase mobile. Dans notre cas et selon les points d'ébullition des deux phases, la phase mobile est la phase inférieure (dans l'ampoule à décanter).

⇒ *Choix de l'injection de la phase mobile*

Selon les densités relatives des deux phases et puisque dans notre cas la phase mobile est la phase inférieure, nous choisissons d'injecter celle-ci en tête de colonne selon un mode dit « descendant ».
L'extrait à analyser est dès lors injecté puis fractionné par la technique HSCCC. Les nombreuses fractions sont récupérées dans un collecteur à raison de 8 ml par tube. Un tube sur trois sera ensuite analysé par CCM.

3.5 Mesure de l'activité antitrypanosomale

La technique, nommée « LILIT » (Low Inoculation Long Incubation Test), a été développée pour évaluer l'activité antitrypanosomale résiduelle *in vitro* suite à l'ajout d'extraits en différentes concentrations.
L'indicateur d'activité métabolique employé est l'Alamar Blue® . En présence de substances réductrices, celui-ci passe d'une couleur bleue non fluorescente (forme oxydée de l'indicateur) à une couleur rose fluorescente (forme réduite de l'indicateur). Or, seules les cellules viables contiennent des enzymes capables de réduire cette molécule.
Les pourcentages de croissance sont ensuite relevés en fonction de la concentration en extrait (dans une graphique semi-logarithmique) et l'IC_{50} est calculé par interpolation linéaire.
L'IC_{50} correspond à une inhibition de 50% de la croissance des trypanosomes pour une concentration en extrait donnée; plus la valeur de l'IC_{50} est basse, plus l'activité antitrypanosomale est grande.

4. Résultats expérimentaux

- Fractionnement bioguidé par la HSCCC de l'extrait CH_2Cl_2 des feuilles de Strychnos spinosa Lam.

Après mise au point des conditions expérimentales (choix du système de solvants, de la quantité d'extrait introduite, du volume des deux bobines et de la vitesse de rotation du système), un échantillon a été injecté et soumis à une HSCCC.

Nous avons récolté 239 tubes et l'analyse de leur composition a été réalisée par CCM. S'ils possédaient des profils chromatographiques comparables, des tubes ont été rassemblés; 15 fractions ont finalement été obtenues.

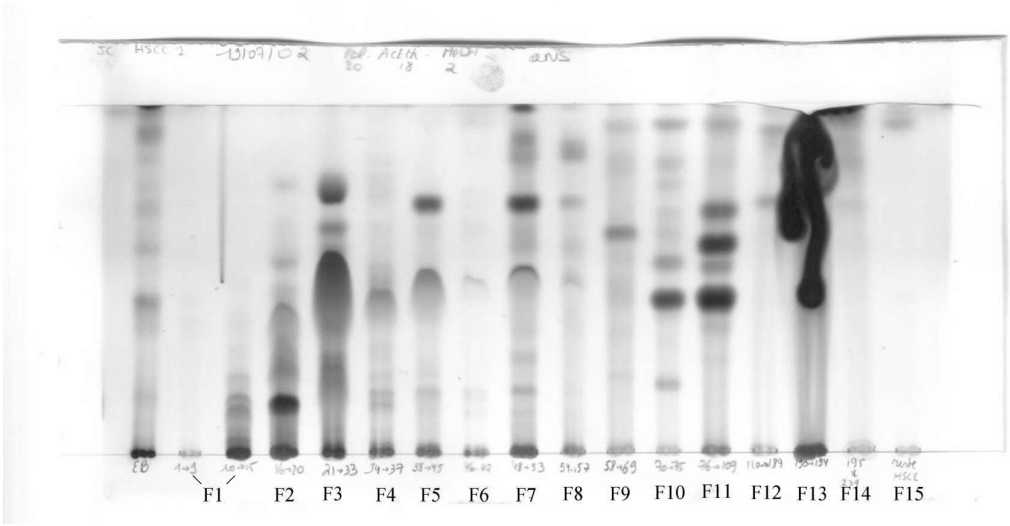

Figure 9 : Analyse CCM des 15 fractions issues de la chromatographie HSCCC
Phase mobile : toluène – acétate d'éthyle – méthanol (80:18:2).
Révélateur : anisaldéhyde sulfurique.

La composition de ces 15 fractions « recomposées » a été analysée par CCM, celle-ci est particulièrement intéressante puisqu'elle montre bien la complexité de l'extrait dichlorométhane des feuilles de Strychnos spinosa Lam.. Même après un fractionnement de l'extrait par chromatographie HSCCC, certaines fractions contiennent plus d'une dizaine de composés révélés par l'anisaldéhyde sulfurique.

Les 15 fractions sont testées in vitro sur des trypanosomes afin de déterminer les fractions les plus actives. Les résultats de ces tests nous permettront de découvrir quelle(s) fraction(s) contien(nen)t le(s) principe(s) actif(s).

Le tableau ci-après relève les valeurs d'IC_{50} recensées pour les 15 fractions obtenues à partir de l'extrait dichlorométhane de feuilles sur les trypanosomes. Par comparaison, les IC_{50} de molécules de référence (la suramine et le diminazène acéturate) sont également inclus.

N° fraction	IC_{50} moyenne (µg/ml)
1	4,8 ± 2,2
2	3,6 ± 0,4
3	22,1 ± 9,2
4	14,0 ± 4,1
5	28,8 ± 2,1
6	28,9 ± 1,5
7	49,1 ± 9,2
8	25,4 ± 6,1
9	28,2 ± 3,2
10	30,9 ± 1,7
11	10,7 ± 0,4
12	4,9 ± 3,6
13	55,3 ± 14,3
14	30,6 ± 2,2
15	1,0 ± 0,4
Extrait brut	24,1 ± 15,7
Suramine	0,064 ± 0,005
Diminazène acéturate	0,009 ± 0,003

Tableau 1 : Activité antitrypanosomale in vitro des 15 fractions issues

de la chromatographie HSCCC

- Ce tableau montre bien que par le fractionnement, des fractions plus actives que l'extrait brut (extrait de départ non fractionné) sont obtenues. En effet, nous pouvons par exemple constater une augmentation de l'activité d'un facteur proche de 25 entre l'extrait brut et la fraction 15.
- Les fractions les plus actives (1, 2, 12 et 15) présentent une valeur d'IC_{50} inférieure à 5µg/ml.
- Dans la littérature, la présence d'alcaloïdes en faible quantité dans Strychnos spinosa Lam. a été rapportée et trois molécules ont notamment été isolées des feuilles; il s'agit de l'akagérine, de la 11-méthoxydiaboline et de la kribine.

A partir d'une analyse CCM révélée au réactif de Dragendorff (révélateur spécifique des alcaloïdes), nous avons pu mettre en évidence la présence d'alcaloïdes dans les fractions 1, 11, 12, 15 ainsi que dans les fractions 8 et 9 mais en moins grande quantité.

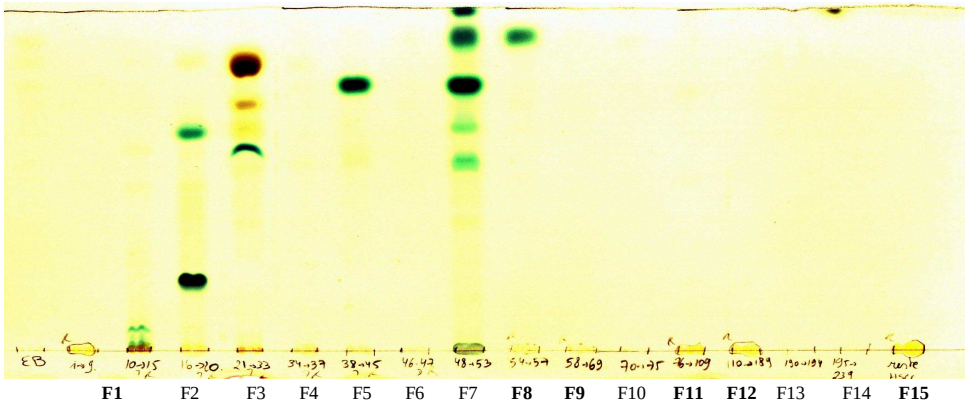

Figure 10 : Analyse CCM générale des 15 fractions issues de la chromatographie HSCCC.
Phase mobile : toluène – acétate d'éthyle – méthanol (80:18:2).
Révélateur : le réactif de Dragendorff réagit spontanément avec les alcaloïdes en donnant une coloration orange-brune (emplacement des fractions écrites en gras).

A ce stade des recherches, même si des alcaloïdes semblent présents dans les fractions les plus actives, nous ne pouvons pas établir de lien entre l'activité antitrypanosomale in vitro et la présence d'alcaloïdes dans les

fractions. En effet, ces fractions contiennent d'autres molécules qui pourraient être responsables de l'activité.

- Evaluation de l'activité antitrypanosomale in vitro de nouveaux lots de feuilles de Strychnos spinosa Lam.

Sur des feuilles de Strychnos spinosa Lam. fraîchement récoltées au Bénin, nous avons essayé de comprendre et de répondre à certaines causes des variations dans l'activité antitrypanosomale constatées lors des tests précédents. Les hypothèses pouvant a priori expliquer ces variations sont soit le lieu et/ou le moment de la récolte, soit le caractère très variable de la plante (notamment deux types de feuilles : « grandes feuilles » et « petites feuilles ») qui pourraient influencer la composition et donc l'activité des extraits.

Les résultats obtenus pour l'activité antitrypanosomale in vitro, nous montrent qu'il n'y a pas de différence majeure entre les variétés à grandes et à petites feuilles de Strychnos spinosa Lam. et que le lieu de récolte n'influence pas l'activité. Le lot récolté en septembre 2001 est nettement plus actif que tous les autres lots (juillet 2002) ; ce fait est à confirmer par l'étude d'autres lots récoltés à la même période.

5. Conclusions et perspectives

La première conclusion de notre travail concerne le fractionnement d'un extrait dichlorométhane de feuilles de Strychnos spinosa Lam. à l'aide de la chromatographie HSCCC. Nous avons mis au point une méthode de fractionnement pour pouvoir isoler les composés responsables de cette activité antitrypanosomale in vitro. Cette technique s'est révélée essentielle pour le fractionnement d'un extrait aussi complexe que l'extrait dichlorométhane. Nous avons ainsi obtenu différentes fractions dont plusieurs se sont révélées être pourvues d'une activité antitrypanosomale in vitro significative. Ceci confirme que la plante contient plusieurs composés actifs. Ultérieurement, il serait intéressant de fractionner une plus grande quantité d'extrait dichlorométhane afin d'obtenir des fractions en quantités plus importantes et de soumettre les plus actives à de nouvelles purifications jusqu'à l'obtention d'une molécule active pure.

A propos des problèmes rencontrés concernant les variations des activités antitrypanosomales in vitro, nous concluons de nos expériences que ces variations ne proviennent apparemment pas ni de l'endroit de la récolte, ni du type de feuilles de l'arbre ; elles pourraient par contre dépendre de l'époque à laquelle la récolte a eu lieu.

Au terme de ce travail, nous avons également mis en évidence la présence d'alcaloïdes dans les feuilles de Strychnos spinosa Lam., présence confirmée dans la littérature ; ces molécules ont, en effet, été révélées dans certaines fractions collectées par la chromatographie HSCCC. Cependant, à ce stade des recherches, nous ne pouvons pas établir de lien entre l'activité antitrypanosomale in vitro propre à ces fractions et la présence d'alcaloïdes dans celles-ci; d'autres molécules pouvant être responsables de l'activité antitrypanosomale in vitro.

6. Références bibliographiques

[1] BRUNETON J., *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes–médicinales*, 2e edition, Techniques et Documentation - Lavoisier, Paris, 1999.

[2] HOSTETMANN K., MARSTON A., HOSTETMANN M., *Preparative Chromatography Techniques : Applications in Natural Product Isolation*, 2e edition, Springer, Heidelberg Allemagne, 1998.