

0.000 /

## EFFETS *IN VITRO* DE L'EXTRAIT AU METHANOL DES FEUILLES DE *Bidens pilosa* SUR LA CHLOROQUINO-RESISTANCE DE *Plasmodium falciparum*.

Bilanda D. C<sup>1</sup>., Dimo T<sup>1</sup>., Mbacham F. W<sup>2</sup>., Evéhé MS<sup>2</sup>., Muluh J<sup>2</sup>., Njifutié N<sup>1</sup>.

1 : laboratoire de physiologie animale de l'université de Yaoundé I

2 : Laboratoire de santé publique du centre de biotechnologie de Nkol-bisson

### Introduction

Le paludisme est une pathologie à évolution rapide causé par un hématozoaire du genre *plasmodium* et transmis à l'homme par un moustique du genre *anophèles*. Cette maladie constitue la principale cause de mortalité dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne où elle est endémique. *Plasmodium falciparum* est l'agent causal de la forme la plus grave du paludisme humain. Les personnes les plus vulnérables sont les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. Au Cameroun, le programme national de lutte contre le paludisme fait état de 35% de décès dans les hôpitaux (Ministère de la Santé Publique, 1999). Le programme de lutte contre le paludisme est axé sur la prévention et le traitement curatif. Pour ce qui est du traitement curatif, il renferme la chimiothérapie et la phytothérapie.

La chloroquine est le premier antipaludéen de synthèse calqué sur le modèle de la quinine qui a fait naître beaucoup d'espoir dans la lutte contre le paludisme. En effet, elle était bon marché et efficace contre toutes les espèces plasmodiales (Mbacham, 1998). Malheureusement depuis 1965 ont été détectés les premiers cas de résistance à la chloroquine en Amérique latine et en Asie du sud-est (Brasseur *et al.*, 1988). Cette résistance est aujourd'hui observée dans plusieurs pays et se répand d'une manière inquiétante. L'un des moyens pour faire face à ces résistances est l'utilisation judicieuse des médicaments en association. Parmi les molécules utilisées en association avec la chloroquine, les bloqueurs des canaux calciques ont été efficaces pour ce qui est d'atténuer et même d'annuler la résistance à la chloroquine. Parmi ceux déjà étudiés on peut mentionner le cas du fantofarone, du cyproheptadine, du désipramine, de la ketotifène et du vérapamil. Malheureusement beaucoup de ces bloqueurs des canaux calciques sont toxiques à des concentrations actives, si bien que la majorité des études sont menées sur des cultures de *Plasmodium in vitro* (Adovelande *et al.*, 1998, Alan *et al.*, 1999).

*Bidens pilosa* fait partie des plantes médicinales aux vertus multiples dont plusieurs sont dues à son activité sur l'influx calcique transmembranaire. *Bidens pilosa* aux faibles concentrations inhibe la contraction du muscle lisse aortique induite par le calcium en milieu contenant de la noradrénaline et du vérapamil. Ces observations suggèrent que *Bidens pilosa* contient des substances capables d'agir sur l'entrée de calcium récepteur-dépendant. Aux fortes concentrations, *Bidens pilosa* inhibe l'entrée du calcium voltage-dépendant, ce qui le rapproche du vérapamil (Dimo, 2001). L'activité antipaludéenne de *Bidens pilosa* a été démontrée (Brandao *et al.*, 1997). Etant donné que les

Bloqueurs de canaux calciques potentialisent l'activité de la chloroquine sur des souches de *P. falciparum* chloroquino-résistant (Adovelande *et al.*, 1998), l'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets *in vitro* de l'extrait au méthanol des feuilles de *Bidens pilosa* sur la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. Pour atteindre cet objectif, nous allons évaluer :

- La concentration maximale de *Bidens pilosa* tolérée par les globules rouges
- l'activité antipaludéenne des antagonistes calciques, *Bidens pilosa* et vérapamil ;
- l'effet des associations de chloroquine avec le vérapamil ou différentes concentrations de l'extrait au méthanol des feuilles de *Bidens pilosa* sur la croissance de *Plasmodium falciparum* ;
- la nature génétique des souches de *Plasmodium* cultivées.

#### MATERIEL ET METHODE

##### Extrait au méthanol des feuilles de *Bidens pilosa*

La poudre (15 g) des feuilles de *Bidens pilosa* obtenue après séchage et pulvérisation a été macérée dans du méthanol (1 l) pendant 48 heures. L'extrait ainsi obtenu a été débarrassé de la chlorophylle par épuisement au chlorure de méthylène, ce qui a permis d'obtenir une fraction au chlorure de méthylène et un résidu au méthanol. Seul le résidu méthanolique a été utilisé dans cette étude.

##### Tests de sensibilité *in vitro*

Ces tests ont été réalisés sur des cultures de sang parasité, prélevé chez des patients en consultation à l'hôpital d'Etoug-Ebé à Yaoundé. Les parasites ont été maintenu dans milieu de culture conforme à celui décrit par trager et Jensen, avec quelques modifications. Le milieu de culture RPMI 1640 a été supplémenté de 1% de sérum humain AB+, de l'HEPES et du bicarbonate de sodium. La chloroquine(CQ) et le Vérapamil(VR) ont été dissous dans le milieu de culture dépourvu de sérum et de bicarbonate de manière à obtenir des solutions stocks de 500 ng/ml.

ACTIVITE ANTIPALUDEENNE DE CQ, VR ET *B. pilosa* : des plaques de culture de 96 (12X8) puits ont été préparées d'après la méthode décrite par Basco et collaborateurs (2002). Les dilution ont été effectuées à partir de 500 ng/ml pour CQ et VR, et de 100 µg/ml pour *B. pilosa*. Les ont été réalisées au 1/3. Les cultures ont été contrôlées jusqu'à ce que 60% des parasites contenus dans les puits témoins révolus en schizonte. L'identification et le comptage des parasites s'est fait sur des frottis sanguins au microscope optique.

INTERACTION ENTRE LA CQ ET LES ANTAGONISTES CALCIQUES : les plaques ont été préparées comme précédemment, mais uniquement avec de la CQ(40 µl). le volume a été complété à 50µl par les antagoniste calciques par colonne (100µg/ml, 50µg/ml, 1µg/ml, 500ng/ml pour *B. pilosa* et 500ng/ml pour VR).

CARACTERISTION GENETIQUE DES ECHANTILONS CULTIVES : L'extraction de l'ADN des papier filtre s'est faite par la méthode au chelex -100. Les gènes *Pfprt*, *dhps* et *glurp* ont ensuite été amplifiés par deux PCR successives (outer et nested PCR). Les produits de la nested PCR des gènes *Pfprt* et *dhps* ont été précipités à l'éthanol absolu et digérés par les enzymes *ApoI* et *AvaII*

respectivement. Les produits de la nested PCR de *glurp* et de la digestion de *Pfcr1* et *dhps* ont été analysés par migration sur un gel d'agarose à 3%. Le gel a ensuite été visualisé sur UV et filmé.

RESULTATS

Activité antipaludéenne de *B. pilosa* et VR : les pourcentage de croissance ont été calculée par rapport aux puits contrôle et des courbes dose/effet ont été tracées(fig.1)

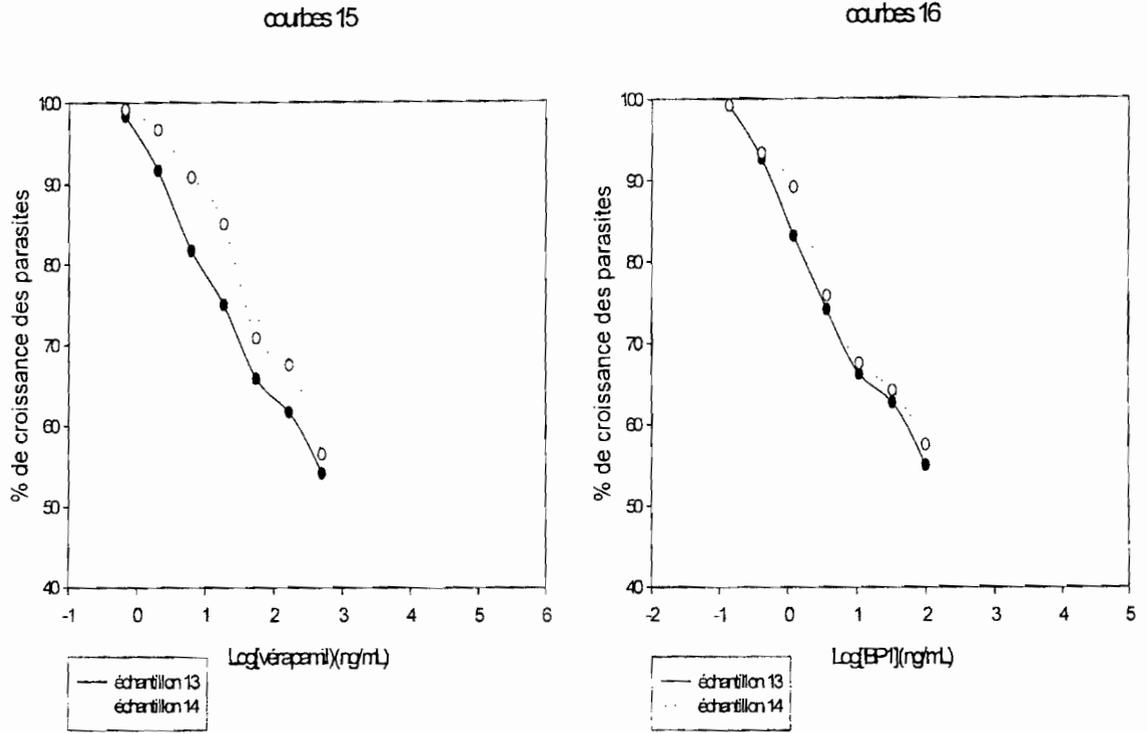


Figure 9 : activité antipaludéenne de *B. pilosa* et du VR

Nous constatons une diminution dose-dépendante de la croissance des parasites, traduisant l'activité antipaludéenne de ces deux produits. Cependant, cette diminution ne nous a pas permis de déterminer les IC<sub>50</sub>.

Effets de *Bidens pilosa* et de VR sur l'activité de la CQ : Les pourcentages de croissance ont également été déterminés comme précédemment et les courbes dose/effet tracées (fig.2). Nous avons alors constaté deux phénomènes, traduisant l'effets de ces associations d'une part sur les souches de *P. falciparum* chloroquino-sensibles(CQS), et d'autre part sur les souches chloroquino-résistantes(CQR). Ces courbes nous ont permis de déterminer les IC<sub>50</sub> que nous avons regroupées dans un tableau.(tableau 1).

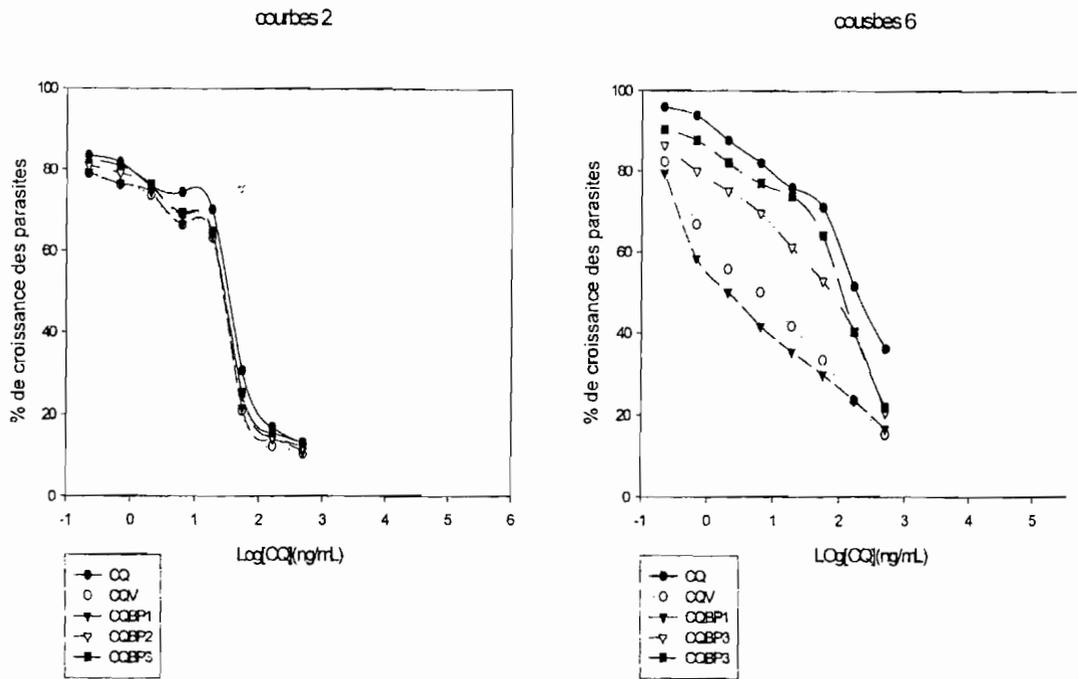


Figure 2 :effet de *B. pilosa* et de VR sur l'activité de laCQ

Tableau 6: Concentration inhibitrice 50 (IC<sub>50</sub>)de la chloroquine seule et des différentes combinaisons avec la chloroquine

N° de l'échantillon	IC <sub>50</sub>				
	CQ	CQV	CQBP1*	CQBP2*	CQBP3
1	125,89	31,62	32,36	33,88	34,67
2	33,11	30,9	31,47	31,62	32,36
3	169,82	19,9	20,6	21,3	49,05
4	155,48	19	19,9	20,6	49,05
5	181,97	28,83	25,01	63,09	125,89
6	177,82	26,3	22,4	63,09	89,12
7	89,12	13,63	13,66	20,47	29,05
8	31,62	18,58	19,49	23,44	31,26
9	17,37	13,8	13,18	14,45	15,13
10	17,37	5,49	5,46	6,91	7,08
11	18,7	0,46	0,43	2,75	12,57

12	17,37	0,87	0,50	5,62	6,91
13	31,62	17,78	16,59	15,84	
14	50,11	25,11	19,95	17,78	

Légende : CQ : chloroquine ; CQV : chloroquine + Vérapamil (500ng/mL) ; CQBP1\* : chloroquine + *Bidens pilosa* (50 µg/mL pour les 8 premiers et 100µg/mL pour les 4 derniers) ; CQBP2\* : chloroquine + *Bidens pilosa* (1µg/mL) ou chloroquine + verapamil (500ng/mL)+*Bidens pilosa* (100mg/mL) pour les deux derniers échantillons ; CQBP3 : chloroquine + *Bidens pilosa* (500ng/mL)

Caractères génétiques des échantillons cultivés : La digestion de *dhps* par l'enzyme *Avall* nous a révélé que les échantillons 4, 5, 7, 10 et 12 étaient résistants au Fansidar® alors que les échantillons 6, 8, et 9 étaient sensibles. la digestion de *Pfcr1* par l'enzyme *ApoI* a révélé que tous les échantillons étaient porteurs du gène de la résistance à la CQ. L'amplification du gène *glurp* a révélé que chaque échantillon était infecté par une seule souche de *P. falciparum*. Nous avons également mis en évidence la présence de 3 allèles de *glurp* :535bp, 577bp et 622pb.

La comparaison entre les tests de sensibilité *in vitro* et la biologie moléculaire pour évaluer la CQR a montré une conformité des deux tests pour les échantillons 4, 5, 6, et 7, alors que les échantillons 8, 9, 10, 11 et 12 sont non conformes.

#### DISCUSSION

Les tests de sensibilité *in vitro* sont souvent utilisés pour tester l'efficacité d'un nouveau produit. *Bidens pilosa* est une plante connue pour ses multiples vertus thérapeutiques. L'évaluation de l'activité antipaludéenne de cette plante a montré une diminution dose-dépendante de la croissance de *P. falciparum*. La concentration maximale utilisée (100 µg/mL) a provoqué une diminution de la croissance du parasite inférieure à 50%. La  $IC_{50}$  de la chloroquine n'a pas été déterminée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Brandao *et al* (1997) avec les extraits de la plante entière et ceux de Oliveira *et al* (2004) avec les extraits des racines. La faible activité antipaludéenne observée dans cette étude pourrait résulter des doses et de la partie du végétal utilisée. Le choix de l'extrait au méthanol des feuilles pour cette étude a été motivé par le fait que les études antérieures (Dimo, 2001) ont montré une activité de cet extrait sur les canaux calciques. Il est connu que la combinaison des antagonistes calciques aux antipaludéens comme la chloroquine est capable de potentialiser l'action de ce dernier (Adovelando *et al.*, 1998). Ces substances n'ont cependant aucun effet sur les souches sensibles. L'évaluation de l'influence de l'association CQ - *B. pilosa* sur la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a montré que cette combinaison diminue la  $IC_{50}$  de la CQ. La diminution de la  $IC_{50}$  de la CQ aussi bien par le vérapamil que par *B. pilosa* sur les parasites sensibles à la CQ serait incompréhensible si l'on considère que les anticalciques n'ont aucun effet sur ce type de parasites (Helmuth *et al.*, 1993). Une faible activité antipaludéenne des anticalciques a été mise en évidence par Adovelando *et al* (1998). Les résultats de cette étude ont confirmé l'activité antipaludéenne de *B. pilosa* et

du vérapamil, substances à activité anticalcique (Dimo, 2001). Ainsi, la faible activité antipaludéenne de *B. pilosa* et du vérapamil pourrait s'additionner à celle de la CQ pour inhiber la croissance du parasite. Il y aurait par conséquent une sommation des effets des produits en association.

L'analyse et la caractérisation génétique des populations de *P. falciparum* par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour établir les caractères génétiques des échantillons cultivés. Les résultats obtenus ont montré que les échantillons étudiés n'étaient pas infectés par la même souche de *P. falciparum*. En effet il a été mis en évidence trois allèles différents du gène *glurp* (535 pb, 577 pb et 622 pb). La présence d'une seule bande pour chaque échantillon suggère que chaque était infecté par une seule espèce de *P. falciparum*. La digestion du gène *dhps* par l'enzyme *Ava II* a confirmé la résistance du clone 7G8 au Fansidar<sup>®</sup>. Notre étude a mis en évidence la présence dans nos échantillons des souches résistantes au Fansidar<sup>®</sup> et des souches sensibles. Il ressort de nos résultats qu'il n'existerait pas de rapport entre les allèles du gène *glurp* et la résistance de *P. falciparum* au Fansidar<sup>®</sup>. La digestion du gène *Pfprt* par l'enzyme *Apo I* a permis de mettre en évidence la résistance du clone 7G8 à la CQ. Un tel clone résistant à plus d'un médicament est qualifié de "multi-drugs" résistant, comme le sont les échantillons 4, 5, 7, 10 et 12. La majorité des parasites cultivés sont chloroquino-résistants (CQR). En effet, l'enzyme de restriction *Apo I* clive le gène *Pfprt* lorsqu'il n'y a pas de mutation au niveau de son site de restriction. Cette absence de digestion suggère qu'il y a eu substitution de la lysine par la thréonine en position 76. Le gène *Pfprt* est connu pour être le meilleur marqueur de la chloroquino-résistance (CQR) (Djimbe *et al.*, 2001). La mutation de ce gène au niveau du codon 76 confère au parasite la résistance à la CQ.

Sur les souches de *P. falciparum* CQR, il y a une réduction remarquable de la IC<sub>50</sub> de la CQ par *Bidens pilosa*. En admettant que *B. pilosa* est un antagoniste calcique type "vérapamil like" (Dimo, 2001), il semble qu'il soit capable de reverser la CQR. Il est connu que le vérapamil restaure complètement la sensibilité à la CQ des souches de *P. falciparum* CQR (Adovelando *et al.*, 1998) et cette action serait proportionnelle au degré de la CQR (Bitondi *et al.*, 1988). L'identification d'un mouvement des ions calcique, uniquement chez les souches de *P. falciparum* CQR a permis à Krogstad et De (1998) de suggérer que les antagonistes calciques agiraient sur ce mouvement de Ca<sup>2+</sup> pour reverser la CQR. L'extrait de *B. pilosa* semble augmenter la sensibilité des souches CQR ; en diminuant considérablement la IC<sub>50</sub> de la CQ. Un phénomène similaire est observé avec l'échantillon 8 qui est pourtant CQR. Cette différence pourrait s'expliquer si on considère que le gène *Pfprt* n'est pas l'unique marqueur de la CQR. Une bonne analyse de la CQR devrait inclure en plus des tests *in vitro* et de la caractérisation génétique, un test *in vivo*. Généralement, la CQR par ce dernier test se traduit par un échec thérapeutique. Il se pourrait alors que cet échantillon bien qu'ayant le gène *Pfprt* muté, ne soit pas totalement CQR.

#### CONCLUSION

L'extrait au méthanol de *Bidens pilosa* inhibe légèrement la croissance de *P. falciparum* en culture. Cette inhibition se fait aussi bien quand *Bidens pilosa* est utilisé seul ou en combinaison avec la CQ. Utilisé seul, *Bidens pilosa* présente une faible activité antipaludéenne. En association avec la CQ, il a été observé sur les souches de *P. falciparum* CQR une potentialisation de l'action de la CQ par *Bidens pilosa*. Sur les isolats CQs, nos résultats ont montré une simple sommation de l'activité de *Bidens*

*pilosa* avec celle de la CQ. Ce porte à croire de *B.pilosa* n'influence pas l'activité de la CQ chez ces dernières. Les résultats de cette étude laisse entrevoir un certain nombre de similitudes d'action entre *Bidens pilosa* et le vérapamil. Une étude sur un échantillon plus large permettrait de mieux caractériser les effets et les mécanismes d'action de cette association..

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adovelande J. , Delèze J. , Schrével J. (1998). **Synergy between two calciums channel blockers, Verapamil and Fantofaron (SR 33557) in reversing chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.** Biochemical Pharmacology (55). 433- 440.
2. Alan F. C. , Morry M. J. , Biggs B. A. , Cross G. A. M. and Foote S. J. (1999). **Amino acid linked to pyrimethamine synthase in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* .** Proceeding of the National Academy of Sciences. (85). 9109 – 9113.
3. Basco L. K. , Samm-Ekobo A. , Fouman Ngale V. , Ndounga N. , Metoh T. , Pingwald T. , Soula J. (2002). **Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine and the sulfadoxine-pyrimetamine-amodiaquine combinaison against uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in young children in Cameroon.** Bulletin of World Health Organization (7). 538 -545.
4. Bitonti A. J. , Sjoedsma A. , McCann P. P. , Kyle D. E. , Jr (1998). **Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Desipramine ;** Science (242). 1301-1303.
5. Brandão M. G. , krettly A. U. , Soares L. S. R. , Nery C. G. C. , Marrinusi H. C. (1997). **Antimalarial activity of extract and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoïd compounds.** Journal of Ethnopharmacology (57). 131 - 138.
6. Dimo T. (2001). **Etude de l'activité antihypertensive de *Bidens pilosa* Linn (asteracées) et de son mécanisme d'action.** Thèse de Doctorat d'Etat. UYI. 193p
7. Helmuth H. G. van Es. , Skamene and Schurr E. (1993). **chemotherapie of malaria: a battle against all odds?** Clinical Investigation Medicine. 16(4). 285 - 293.
8. Krogstad D. J. and De D. (1998). **Chloroquine: Modes of Action and Resistance and the activity of Chloroquine Analogs.** American Sciences and Medicine press, Washington, D.C. chap 23 331-339
9. Mbacham W.F (1998). **Malaria, an ancient scourge : myths, mistakes and management.** Biodiagnostics and Therapy. (2). 4-10.

10. Ministère de la Santé Publique (1999). Plan d'action 1999/2000 du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP).
11. Oliveira F.Q. , Andrade-Neto .V. , Krettli A.U. and Brandão M.G.L. (2004). **New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids.** Available online keywords: Antimalarial; *Bidens pilosa*; Polyacetylene; Flavonoids