

EVALUATION DE L'ACTION COMBINÉE DE LA CHLOROQUINE ET D'OLAX SUBSCORPIOÏDEA SUR DES SOUCHES DE PLASMODIUM FALCIPARUM CHLOROQUINORÉSISTANTES EN CULTURE IN VITRO

[ASSESSMENT OF THE COMBINED ACTION OF CHLOROQUINE AND OLAX SUBSCORPIOÏDEA ON PLASMODIUM FALCIPARUM STRAINS RESISTANT IN VITRO CULTURE]

Gueyraud Rolland KIPRE¹, Moevi AKAKPO-Akué¹, Kouakou Brice BLA¹, and Allico Joseph DJAMAN¹⁻²

¹Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences,
Université Félix Houphouët-Boigny,
Abidjan, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biochimie,
Institut Pasteur de Côte d'Ivoire,
Abidjan, Côte d'Ivoire

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Chloroquine has been widely used in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Unfortunately, because of chemoresistance emergence and its spread worldwide since the 1960's, substitute medicines were compulsory to fight against malaria efficiently. Therefore, current priority of the fight against malaria is to search for substances capable to improve back chloroquine efficacy.

The present work highlights life threatening action of *Olox subscorpioïdea* ethyl acetate fraction, a plant used traditionally against malaria, on *Plasmodium falciparum*. It has been successfully used both on chloroquine sensitive strains and chloroquinorésistant strains with respective IC₅₀ values of 32.47±0.31µg/mL and 28.16±0.5µg/mL, justifying its usage in traditional medicine.

In addition, when 12 µg/mL of *Olox subscorpioïdea* fraction C is associated with chloroquine, resistant strain FCB1 average IC₅₀ diminishes from 105.05±2.87nM to 43.5±1.5nM, thus allowing chloroquine to recover efficiency against *Plasmodium falciparum*.

KEYWORDS: Ethyl acetate, Chloroquine, *Olox subscorpioïdea*, *Plasmodium falciparum*, chloroquino-résistant strains.

RESUME: La chloroquine était autrefois un produit très efficace dans le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum*. Malheureusement, depuis l'apparition des souches résistantes dans les années 60, la chloroquinorésistance s'est étendue dans le monde entier posant un problème, d'autant plus que peu d'autres antipaludiques sont disponibles à l'heure actuelle pour combattre efficacement le paludisme.

Par conséquent, la recherche de substances potentialisant l'action de la chloroquine nous apparaît comme une voie de recherche dans la lutte contre le paludisme.

Le présent travail nous a permis de mettre en évidence l'action antiplasmodiale de la fraction d'acétate d'éthyle d'*Olox subscorpioïdea* (olsu), une plante utilisée traditionnellement contre le paludisme, aussi bien sur la souche chloroquinosensible (F32) que les souches résistantes (FCB1 et K1) avec des CI₅₀ moyennes respectives de 32,47 ± 0,31 µg/ml

et $28,16 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. De plus la Cl_{50} moyenne de la chloroquine sur souche résistante FCB1 de l'ordre de $105,05 \pm 2,87$ nM, est passé à $43,5 \pm 1,5$ nM, lorsqu'on associe une concentration de 12 $\mu\text{g/ml}$ de cette fraction de *olsu* à la chloroquine. La fraction acétalique d'*Olax subscorpioidea* a donc une action potentialisatrice sur la chloroquine.

MOTS-CLEFS: Acétate d'éthyle, Chloroquine, *Olax subscorpioidea*, *Plasmodium falciparum*, souches chloroquinorésistantes.

1 INTRODUCTION

La chimiothérapie du paludisme a commencé avec l'utilisation de l'écorce du quinquina par les indiens du Pérou vers les années 1500. Ne connaissant pas l'agent pathogène, ils avaient observé que certaines fièvres étaient guéries par les écorces de cette plante. C'est en 1820 que Pelletier et Caventou isolent l'alcaloïde actif, la quinine, de l'écorce du quinquina.

La thérapeutique du paludisme a évolué très peu jusqu'à la fin des années 1930 où des recherches conduites simultanément en France, en Grande-Bretagne, en URSS, aux Etats-Unis et en Allemagne, ont permis la synthèse des amino-4-quinoléines [1], [2]. Cette famille de médicaments dont le plus utilisé est la chloroquine a révolutionné le traitement du paludisme.

La chloroquine était autrefois très efficace dans le traitement des accès palustres à *Plasmodium falciparum*. C'était un antipaludique idéal en raison de sa sécurité, de son efficacité par voie orale, son action rapide, sa longue demi-vie et surtout son faible coût.

Malheureusement, depuis l'apparition des souches résistantes dans les années 60, la chloroquinorésistance ne cesse de s'étendre dans tous les pays africains sub-sahariens dont la Côte d'Ivoire [3], [4], [5], [6].

Compte tenu de la place de choix qu'occupait la chloroquine dans la thérapie du paludisme en Afrique sub-saharienne, la recherche d'autres molécules capables de lui donner un regain d'intérêt est devenue une autre voie de recherche [7].

Ainsi s'est développée la recherche des potentialisateurs de la chloroquine. Ces produits appartenant à diverses familles chimiques : bloqueurs calciques, antidépresseurs ou antihistaminiques tricycliques, anthraquinones, sont capables de reverser le mécanisme de la résistance probablement en s'opposant à l'efflux de la chloroquine hors du *Plasmodium* [8], [9], [10].

Notre programme de recherche en chimiothérapie antipaludique comporte deux volets à partir de la flore spécifique de Côte d'Ivoire :

- 1- la recherche de nouvelles molécules antipaludiques à longue durée d'action.
- 2- la recherche de nouveaux potentialisateurs de la chloroquine.

Après la mise en évidence de l'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait méthanolique de *Olax subscorpioidea* (*olsu*) [11], nous nous sommes intéressés aux autres groupes de composés issus de cette plante. En effet, le décocté de cette plante est utilisé par certaines populations du centre de la Côte d'Ivoire soit seule comme fébrifuge, soit comme traitement antipaludique.

Pour vérifier sa deuxième utilisation, nous rapportons dans ce présent travail, l'activité antiplasmodiale *in vitro* de la chloroquine associée à l'ensemble des composés contenus dans la fraction d'acétate d'éthyle de cette plante.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIELS

Le matériel végétal utilisé est constitué de l'extrait éthanolique et des fractions de *O. subscorpioidea*, une plante traditionnellement utilisées dans le traitement du paludisme.

Quant au matériel biologique, il est constitué de sang humain parasité par des souches de *Plasmodium falciparum* de laboratoire : FCB1 et K1 (souches résistantes à la chloroquine) et F32 (souche sensible à la chloroquine).

Le milieu de culture utilisé pour les tests *in vitro* est le RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) complété de 25 mM d'HEPES, d'une solution de bicarbonate de sodium à 5% et de sérum humain à 10%.

2.2 MÉTHODES

2.2.1 PRÉPARATION DE L'EXTRAIT ET DES FRACTIONS DE OLSU

Cinquante grammes (50g) de poudre de feuilles séchées de *olsu* sont macérés pendant 24 h dans 300 ml d'éthanol. Après filtration, évaporation et séchage on obtient l'extrait éthanolique (fraction A). Une partie de l'extrait éthanolique va subir le fractionnement suivant :

dix grammes de l'extrait est dissout dans 100 mL d'eau distillée auquel on ajoute 100 ml de cyclohexane et on laisse décanter 30 min. Après décantation la phase de cyclohexane est séchée pour donner un extrait noté fraction B. La phase aqueuse est reprise dans 100 mL d'acétate d'éthyle suivie d'une nouvelle décantation de 30 min. La phase acétalique est séchée et on obtient la fraction C. La phase aqueuse est de nouveau reprise par 100 mL de n-butanol. Après décantation on obtient deux phases, phase n-butanol et phase aqueuse, qui sont séchées pour donner l'extrait n-butanol (fraction D) et l'extrait aqueux (fraction E).

A partir de l'extrait et des fractions obtenues nous avons préparé par dilution dichotomique des gammes de concentrations variant de 125 à 0,97 µg/mL.

La chloroquine est aussi diluée par dichotomie pour donner une gamme de concentration variant de 1600 à 6,25 nM.

2.2.2 TESTS *IN VITRO*

Pour la culture *in vitro* de *P. falciparum*, nous avons utilisé la variante isotopique du micro-test (plaque de 96 puits) de Rieckmann adopté par l'O.M.S [12]. Elle permet de mesurer et de quantifier la capacité des doses croissantes d'une drogue à inhiber la croissance de *P. falciparum* au stade trophozoïte.

Dans cette technique, les souches diluées dans le milieu de culture sont incubées à 37°C dans un environnement appauvri en oxygène et enrichi en dioxyde de carbone avec une humidité d'environ 95%.

Après 24 heures d'incubation, les plaques sont sorties et l'on ajoute de l'hypoxanthine tritiée concentrée à 0,5 µCi/puits. Les plaques sont à nouveau remises dans l'incubateur pour 24 heures supplémentaires.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur Wallac MicroBeta. Tous les résultats sont exprimés à la fin du comptage et les listings permettent l'exploitation des résultats

2.2.3 RECHERCHE DES EFFETS DE L'ASSOCIATION DE LA FRACTION D'ACÉTATE D'ÉTHYLE DE OLSU SUR L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DE LA CHLOROQUINE

Une série de concentrations la fraction d'acétate d'éthyle sont choisies autour de la Cl_{50} moyenne des souches chloroquinorésistantes.

Chacune de ces concentrations est associée à une gamme de doses de la chloroquine allant de 12,5 à 1600 nM.

Les Cl_{50} résultant de l'association des deux molécules sont recherchées sur des plaques de culture comme précédemment.

Les Cl_{50} résultant de l'association chloroquine-fraction C de *olsu* sont exprimées en pourcentage des Cl_{50} de chaque molécule mesurées isolément.

Ces fractions de Cl_{50} sont reportées sur les axes d'un graphe appelé isobogramme permettant d'exprimer l'activité résultant de l'action simultanée de la chloroquine et des alcaloïdes totaux de *olsu*.

Par convention, on exprime en abscisse les fractions de la chloroquine et en ordonnées celles du produit associé (fraction d'acétate d'éthyle). Sur chaque axe la valeur 1 représente la Cl_{50} de chaque produit isolé.

Pour chaque concentration de l'association, les deux pourcentages obtenus définissent des coordonnées d'un point sur le graphe. La courbe joignant les différents points est comparée à la diagonale joignant les points unité sur les deux axes.

Dans le cas où la courbe suit la diagonale, l'action des deux produits associés est indépendante, chacun agit comme s'il était seul en cause.

Si la courbe est convexe et se situe au-dessus de la diagonale, cela indique la présence d'un antagonisme. Il y a donc suppression mutuelle des activités

Si la courbe est par contre concave et se rapproche des axes, il y a potentialisation ou synergie d'action entre les deux composés.

Ensuite l'index de la potentialisation du pouvoir schizonticide de la chloroquine (ou AEI pour "Activity Enhancement Index") est calculé en divisant la CI_{90} de la chloroquine seul par la CI_{90} de l'association de la chloroquine et de l'agent potentialisateur pour une analyse rapide de l'effet synergique du composé [13]. On considère arbitrairement qu'un agent potentialisateur est efficace à une concentration qui augmente le pouvoir schizonticide de la chloroquine par $AEI \geq 2$.

3 RÉSULTATS

3.1 ACTIVITE ANTIPLASMODIALE INTRINSEQUE DES FRACTIONS DE OLSU

Les CI_{50} des trois souches aux différentes fractions de olsu sont résumées dans le Tableau 1

Tableau 1 : Sensibilité des souches aux fractions de olsu

| Fractions de olsu | CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) n = 3 | | |
|-------------------|---|------------------|------------------|
| | F32 | FCB1 | K1 |
| A | 46,47 \pm 0,25 | 47,72 \pm 0,64 | > 50 |
| B | > 50 | > 50 | > 50 |
| C | 32,47 \pm 0,31 | 28,19 \pm 0,22 | 28,14 \pm 1,01 |
| D | > 50 | > 50 | > 50 |
| E | > 50 | > 50 | > 50 |

*A : extrait éthanolique B : extrait cyclohexane C : extrait acétate d'éthyle
D : extrait n-butanol E : extrait aqueux résiduel*

3.2 EFFETS DE LA FRACTION DE OLSU SUR L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE DE LA CHLOROQUINE

Les concentrations 6, 12, et 30 $\mu\text{g/mL}$, prises au tour de la CI_{50} moyenne de la fraction acétalique sur les souches chloroquinorésistantes (28,16 $\mu\text{g/mL}$) et associées aux différentes gamme de concentrations de la chloroquine (12,5-1600 nM) sur les souches FCB1 dont la CI_{50} moyenne est 105,05 nM, nous a permis de constater que les concentrations de valeur 12 et 30 $\mu\text{g/mL}$ font baisser la CI_{50} de la chloroquine à 43,5 et 21,87 nM respectivement (Tableau 2).

Tableau 2 : Activité in vitro de la chloroquine associée à la fraction acétalique sur la souche chloroquinorésistantes FCB1

| Composés | Activité antiplasmodiale de la chloroquine (nM) n = 3 | | |
|--|--|----------------|------|
| | FCB1 | | |
| | CI_{50} | CI_{90} | AEI |
| Chloroquine (CQ) | 105,5 \pm 2,8 | 380 \pm 1,47 | ---- |
| CQ + 6 $\mu\text{g/mL}$ | 101,5 \pm 1,3 | 350 \pm 0,5 | 1,09 |
| CQ + 12 $\mu\text{g/mL}$ | 43,5 \pm 1,5 | 175 \pm 0,4 | 2,17 |
| CQ + 30 $\mu\text{g/mL}$ | 21,87 \pm 0,8 | 85,3 \pm 0,1 | 4,46 |

n = nombre de tests réalisés

Le tracé de l'isobologramme (figure 2), nous donne une courbe concave se rapprochant des axes.

L'indice de potentialisation (AEI) de la chloroquine comprise entre 1,09 et 4,46 avec une AEI moyenne de 2,57 atteste de la bonne potentialisation de la chloroquine par la fraction acétalique d'olsu à la concentration minimale de 12 $\mu\text{g/mL}$.

4 DISCUSSION

L'efficacité sélective de la chloroquine est liée à sa concentration élevée atteinte dans les érythrocytes parasités par rapport aux érythrocytes non parasités. La chloroquinorésistance est donc étroitement liée à la diminution de l'accumulation de la chloroquine à l'intérieur des érythrocytes parasités par *P. falciparum* résistant [14].

Ce phénomène d'efflux de médicament serait lié à des mutations ponctuelles au niveau des gènes *pfcr* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) situé sur le chromosome 7 dont le produit d'expression est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane digestive de la vacuole du parasite [15], [16].

Il apparaît que dans nos conditions expérimentales, la fraction d'acétate d'éthyle de *olsu* a une action sur les isolats chloroquinosensibles et résistants. En effet il n'y a pas de différence significative entre les CI_{50} moyenne entre les deux types de souche. Ces résultats expliqueraient l'utilisation de cette plante par des populations ivoiriennes dans le traitement des accès palustres.

Mais ce qui paraît particulièrement intéressant concernant cette fraction, c'est son action potentialisatrice des effets de la chloroquine sur *P. falciparum* résistant comme on peut le constater sur le tableau 1. En effet, la CI_{50} de la chloroquine de 105,05 nM en raison de la chloroquinorésistance de FCB1 s'abaisse rapidement par association d'une concentration de 12 et 30 $\mu\text{g/ml}$ de la fraction acétalique pour atteindre les valeurs des souches sensibles 43,5 et 21,87 nM (< 100 nM). En d'autres termes, en présence de cette fraction, il y a donc une restauration de l'efficacité de la chloroquine.

La fraction d'acétate d'éthyle de *olsu* pourrait agir très probablement sur le site d'action de la chloroquine et favoriser son accumulation à l'intérieur de la vacuole en limitant l'efflux. L'ensemble des composés contenus dans cette fraction de *olsu* permettrait d'élever la quantité de la chloroquine à une concentration létale pour le *Plasmodium*. Une fois accumulée, cette amino-4-quinoléine retrouve son activité antiplasmodiale.

Il faut noter que la notion de potentialisation des antipaludiques, plus spécifiquement de la chloroquine, a été conçue par Martin et al. [7] qui ont montré que les bloqueurs calciques associés à la chloroquine reversent *in vitro* la chloroquinorésistance chez *P. falciparum*.

Ces résultats nous ont amenés à calculer l'AEI, afin de pouvoir quantifier et comparer l'effet bloqueur de l'efflux par la fraction d'acétate d'éthyle de *olsu*.

Ainsi, la concentration 12 $\mu\text{g/mL}$ de la fraction d'acétate d'éthyle de *olsu* est la plus petite concentration qui, sur tous les souches résistantes, permet de bloquer l'efflux de la chloroquine avec un AEI égal à 2,17.

5 CONCLUSION

Du fait de leur activité spécifique sur les souches chloroquinorésistantes et de leur action potentialisatrice de la chloroquine, nous pensons que l'utilisation de la fraction d'acétate d'éthyle de *olsu* associée à la chloroquine pourrait redonner à celle-ci la place de choix qu'elle occupait autrefois dans la thérapeutique des pays d'endémie palustre.

RÉFÉRENCES

- [1] Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield DF, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Chimiothérapie du paludisme. Genève, 2^{ème} éd / OMS, 274p, 1984.
- [2] Bryskier A, Labro M T. Paludisme et médicaments. Paris, Arnette, 276p, 1988.
- [3] Guiguemdé TR, Gbary AR, Ouedraogo JB, Gayibor A, Lamizana L, Maiga AS et al. Point actuel sur la chimiorésistance du paludisme des sujets autochtones dans les Etats de l'OCCGE (Afrique de l'Ouest). Annale de la Société Belge de Médecine Tropicale, Vol. 71, pp. 199-207, 1991.
- [4] Penali LK, Koné M, Komenan A, Coulibaly L. Decrease in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in the Abidjan region (Ivory Coast). Médecine Tropicale, Vol. 53, pp. 191-194, 1993.
- [5] Djaman AJ, Basco L, Mazabraud A. Mise en place d'un système de surveillance de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à Yopougon (Abidjan) : Etude *in vivo* de la sensibilité à la chloroquine et évaluation de la résistance à la pyriméthamine après analyse de la mutation ponctuelle du gène de la dihydrofolate reductase (*dhfr*). Cahiers Sante, Vol. 12, pp. 363-367, 2002.
- [6] Henry MC, Niangue J, KONE M. Quel médicament pour traiter le paludisme simple quand la chloroquine devient inefficace dans l'Ouest de la Côte d'Ivoire ? Médecine Tropicale, Vol. 62, pp. 55-57, 2002.
- [7] Martin SK, Oduala AM J, MILHOUS WK. Reversal of chloroquineresistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. Sciences, Vol. 235, pp. 899-901, 1987.
- [8] Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Molecular Cell, Vol. 6, pp. 861-871, 2000.
- [9] LABIE D. Résistance du Plasmodium à la chloroquine : vers un ciblage de l'attaque ? médecine/science, Vol. 5, pp. 463-465, 2005.

- [10] Tran CV, Saler MH. The principal chloroquine resistance protein of *Plasmodium falciparum* is a member of the drug/metabolite transporter family. *Microbiology*, Vol. 150, pp. 1-3, 2004.
- [11] Djaman AJ, Djè KM, Guédé-Guina F. Evaluation d'une action antiplasmodiale de *OLAX SUBSCORPIOIDES* oliv. (OLACACEE) contre des souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum*. *Revue Médecine et Pharmacopée*, Vol. 11-12, pp. 177-183, 1993.
- [12] Rieckmann KH, Campbell GH, Sax 1998LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* : An in vitro microtechnique. *Lancet* 1978 ; i : 22-23.
- [13] Peters W, Ekong R, Robinson BL, Warhurst D.C., Pan XQ. Antihistaminic drugs that reverse chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet*, Vol. ii, pp. 334-335, 1989.
- [14] Verdier F, Le Bras J, Clavier F, Hatin I, Blayo MC. Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes during in vitro culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicro Agents Chemother*, Vol. 4, pp. 561-564, 1985.
- [15] Mayor G, Gomez OX, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M et al. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 183, pp. 1413-1416, 2001.
- [16] Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 184, pp. 770-776, 2001b.