

Analyse CLHP et établissement de signatures chimiques

Par la structure anatomique, les pièces de bois ainsi que les *Bitter-cups* proviendraient de la même espèce. Dans le but d'établir des signatures chimiques, la CLHP va permettre de le confirmer tout en mettant en évidence d'éventuelles différences phytochimiques.

a. Témoin *Q. amara*

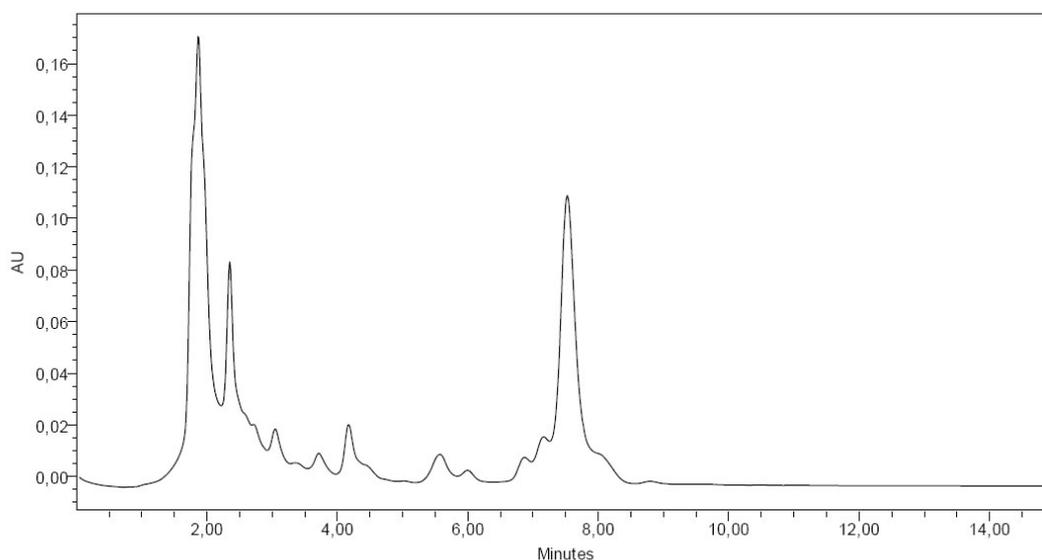


Figure 4. Chromatogramme du macérat aqueux de *Quassia amara* L.

On observe sur la figure 4 un premier groupe de pics entre 1 et 3 minutes, puis une petite série de pics, entre 4 et 6 min, et enfin un pic important à 7,52 min, dont le maximum d'absorption, à 256 nm, laisse supposer qu'il s'agit d'un quassinoïde, vraisemblablement la quassine. Aucun produit n'est élué après dix minutes.

b. Bois

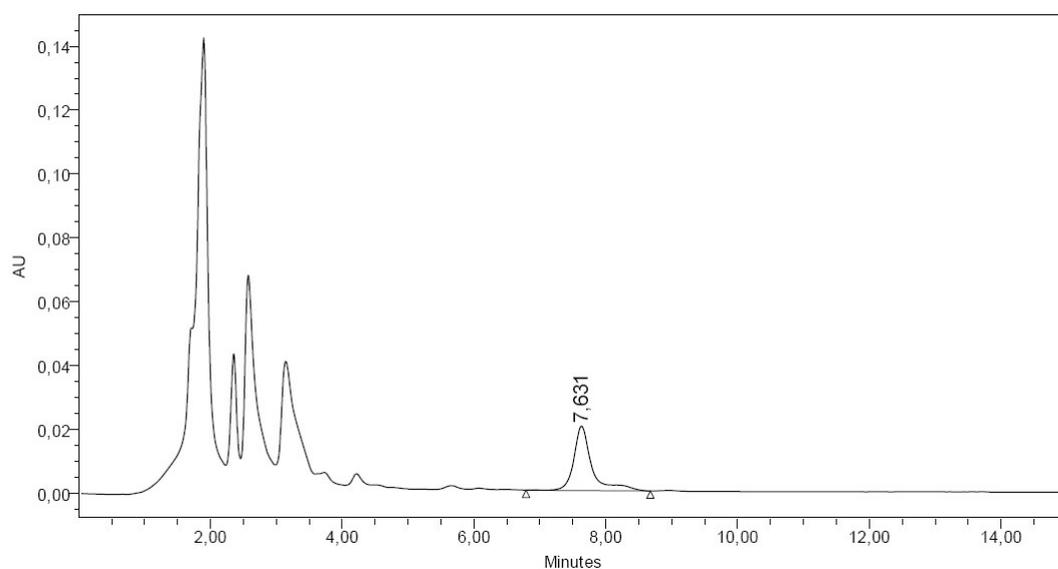


Figure 5.a. Chromatogramme du macérat aqueux du bois A.

Le bois A (figure 5.a) diffère du témoin au niveau du premier groupe de pics, où les produits sortant entre 2,5 et 4 min sont en quantité plus importante. Cependant, entre 4 et 6 minutes, même si leur concentration est assez faible, on note deux petits épaulements qui pourraient correspondre à ceux observés pour le témoin (figure 4). De même, on retrouve à 7,63 min la quassine, bien qu'en concentration moindre, et son épaulement. Cet échantillon peut donc tout à fait correspondre au témoin. Ces plantes ayant poussé à plus de 450 kilomètres de distance, et n'étant pas du même âge, il est raisonnable d'observer des différences dans la composition chimique, notamment au niveau des concentrations des produits.

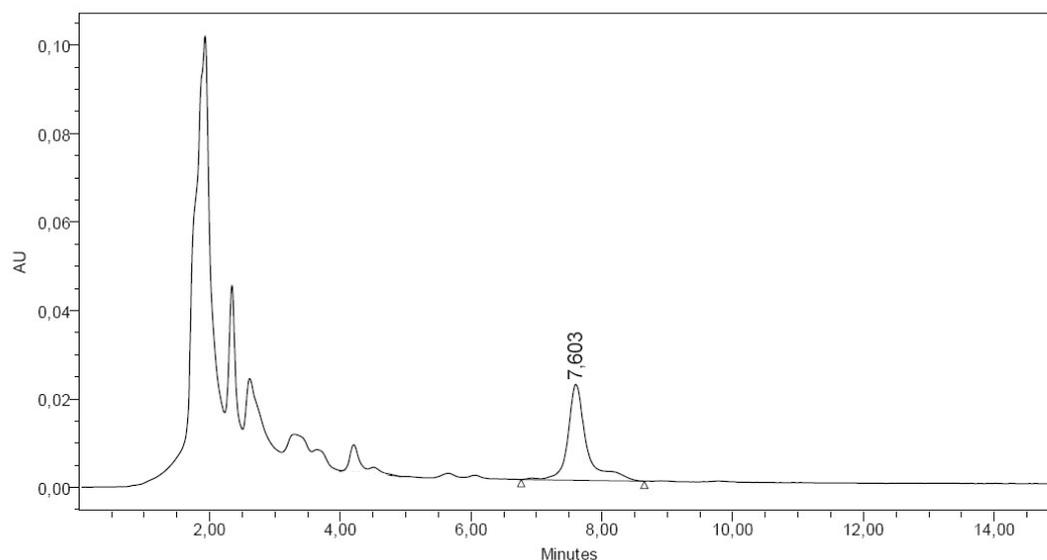


Figure 5.b. Chromatogramme du macérat aqueux du bois B.

Le bois B (figure 5.b) présente des caractéristiques plus semblables au témoin que le bois A.

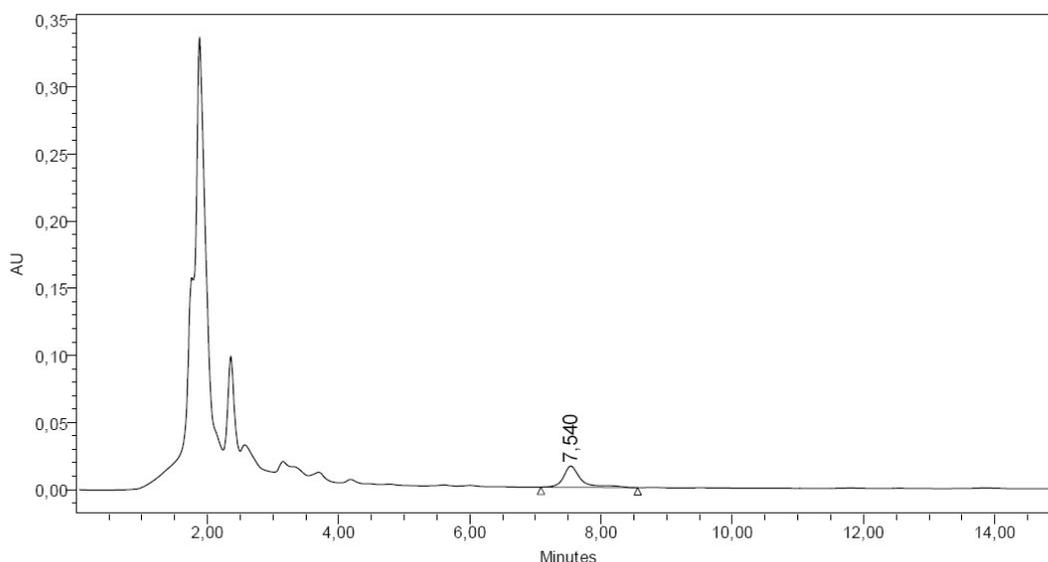


Figure 5.c. Chromatogramme du macérat aqueux du bois C.

Le bois C (figure 5.c) présente également les mêmes caractéristiques que le précédent. Il est intéressant de noter qu'il correspond aux copeaux issus de la taille du gobelet de Sandygron, censé provenir d'un grand arbre à fleurs jaunes !

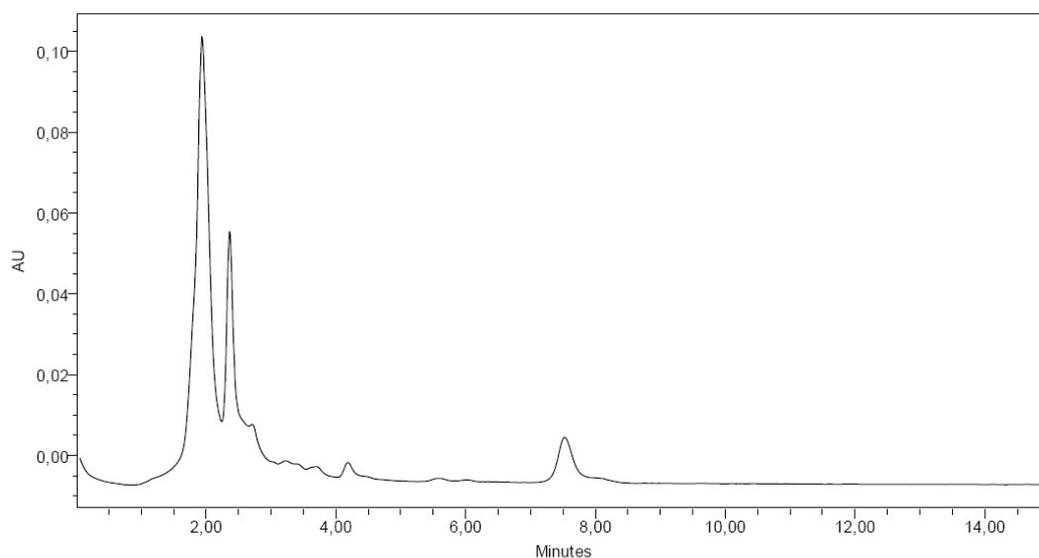


Figure 5.d. Chromatogramme du macérat aqueux du bois D.

Encore une fois, les éléments caractéristiques de *Q. amara* se retrouvent sur le chromatogramme CLHP du bois D (figure 5.d), illustrant la similarité entre les bûchettes et le témoin.

c. Gobelets

Nous avons par la suite réalisé les chromatogrammes des macérats des gobelets amers.

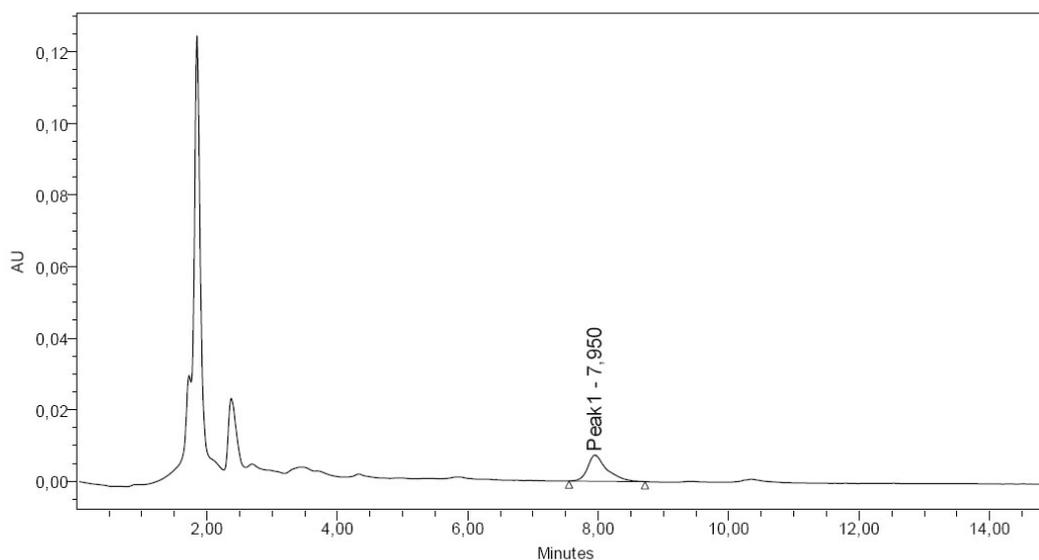


Figure 6.a. Chromatogramme du macérat aqueux du gobelet A1.

Le chromatogramme CLHP du macérat aqueux du gobelet A1 (figure 6.a), est assez similaire aux chromatogrammes précédents. Le pic à 7,95 min est assimilable à la quassine (composé qui sortait précédemment vers 7,6 min) car leurs spectres UV sont identiques. Le glissement du pic vers la droite peut être dû à de nombreux facteurs, dont le fait que les chromatogrammes ont été réalisés sur plusieurs jours ou un encrassement de la colonne.

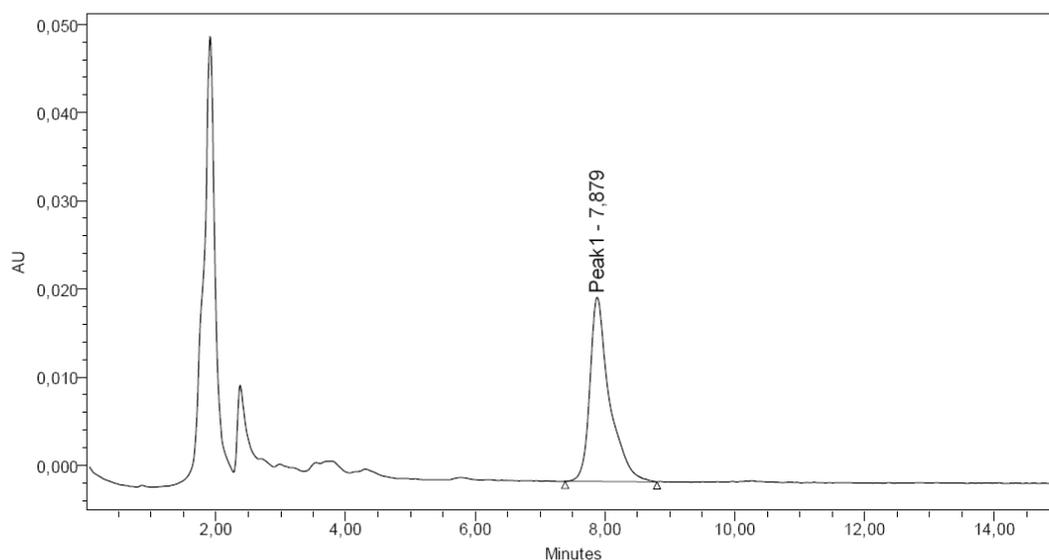


Figure 6.b. Chromatogramme du macérat aqueux du gobelet A2.

L'allure générale du chromatogramme CLHP du macérat aqueux du gobelet A2 (figure 6.b) est bien celle attendue. On note toutefois que la surface du pic de la quassine est ici relativement importante.

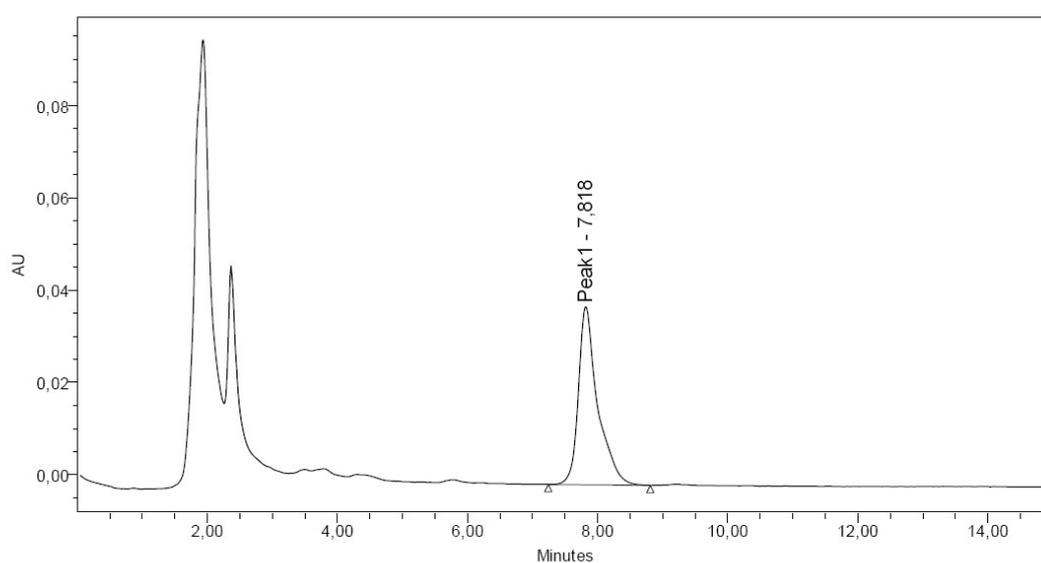


Figure 7. Chromatogramme du macérat aqueux du gobelet B1.

Les deux chromatogrammes CLHP du lot B présentant globalement le même profil, seul celui du gobelet B1 est reporté (figure 7).

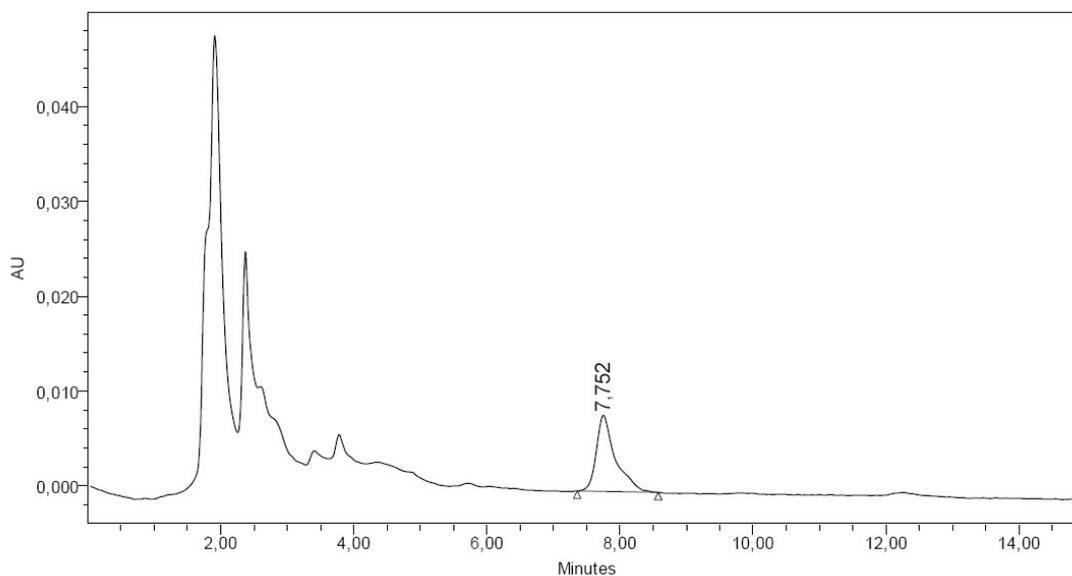


Figure 8. Chromatogramme du macérat aqueux du gobelet C.

Le gobelet amer C, provenant de Sandygron, et soi-disant façonné à partir d'un grand arbre aux fleurs jaune, à un profil similaire au bois C et au témoin. Le chromatogramme (figure 8) permet de mettre en doute la bonne fois du tailleur quant à l'origine botanique.

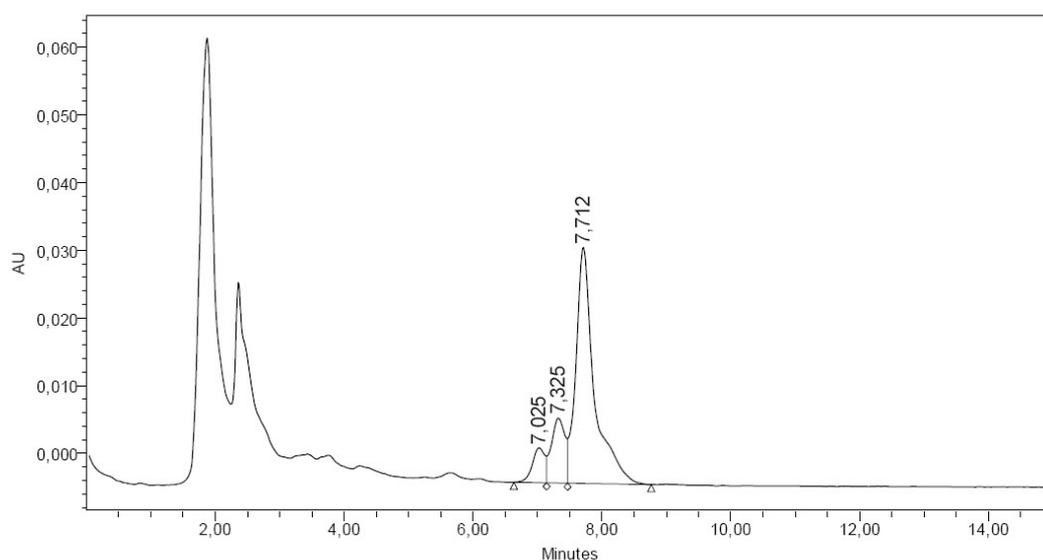


Figure 9. Chromatogramme du macérat aqueux du gobelet D1.

Le chromatogramme CLHP du macérat aqueux du gobelet D1 (figure 9), est légèrement différent des précédents par la présence de deux pics précédant la quassine (7,02

et 7,32 min). Néanmoins, ces deux pics se retrouvent chez le témoin (figure 4). Une nouvelle fois, on peut difficilement contredire l'hypothèse d'une même espèce botanique à l'origine des *Bitter-cups*. Les données apportées par ces différents chromatogrammes CLHP semblent suffisantes, c'est volontairement que les chromatogrammes des gobelets suivants n'ont pas été ajoutés ici, ceux-ci étant similaires aux présents.

d. Témoin négatif *Simarouba amara*

Afin d'avoir un élément de comparaison, et pour parachever cette étude sur l'origine du bois, il était nécessaire d'utiliser un témoin négatif. Nous avons donc choisi de tester *Simarouba amara* Aublet. Cette *Simaroubaceae* est souvent employée par les Saramaka en artisanat traditionnel, notamment pour la confection de petits objets décoratifs (14). De couleur blanc crème, son bois est également peu dense. De par sa grande taille (20 m en moyenne), son diamètre pouvant atteindre 50 cm et ses inflorescences jaune verdâtre, il pouvait s'agir de la plante évoquée par les tailleurs de bois et le guérisseur de Sandygron, d'autant que son bois possède une amertume prononcée (16).

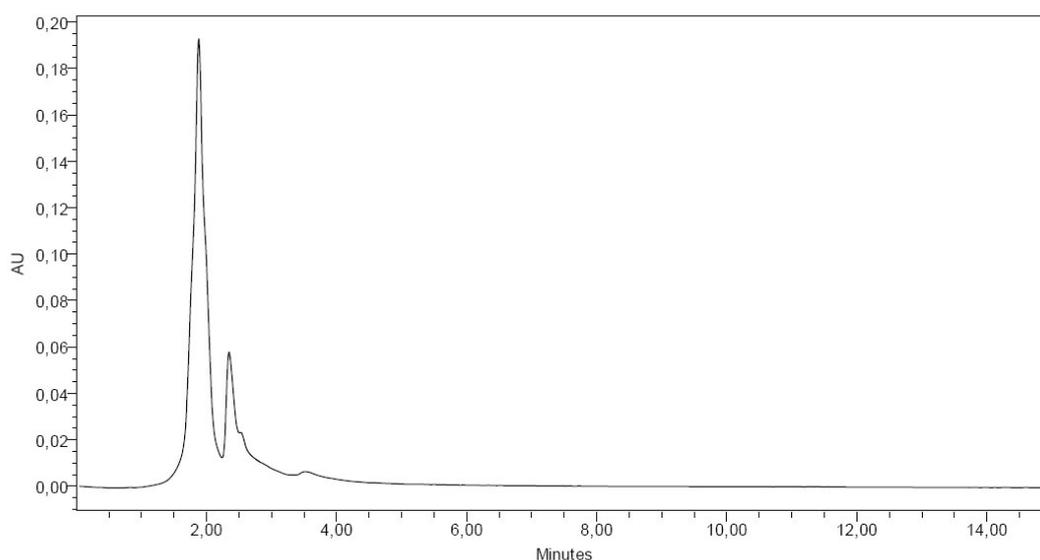


Figure 10. Chromatogramme du macérat aqueux de *Simarouba amara* Aublet.

Le profil chromatographique CLHP du macérat aqueux de *S. amara* (figure 10) présente aussi un groupe de pics entre 1 et 3 minutes, ce qui n'est pas étonnant du fait de la proximité taxonomique des deux espèces. On note cependant l'absence du composé sortant vers 7,6 minutes supposé être la quassine, absente de *S. amara* (17).

e. Discussion

Les signatures chromatographiques par CLHP permettent de confirmer l'hypothèse de départ. La similarité des profils, sur lesquels on voit clairement des éléments communs (notamment un composé supposé être la quassine), associée à l'analyse anatomique rend difficile toute autre interprétation. Le témoin négatif, s'il possède une relative homologie avec les autres échantillons, ne présente pas tous les éléments caractéristiques. Il aurait également été intéressant de tester *Picrasma excelsa* (Swartz) Planch., notoirement confondu avec *Q. amara* lors des exportations en Europe, et qui aurait été signalé sur le bouclier des Guyanes (18). On peut donc conclure que les *Bitter-cups* et les pièces de bois vendus sur les marchés de Paramaribo, ainsi que ceux que l'on trouve plus à l'intérieur du pays, proviennent de *Q. amara*.

Essais biologiques

Face au problème de santé publique posé par le paludisme sur tout le plateau des Guyanes, et puisque les feuilles de *Q. amara* sont connues pour leurs propriétés antimalariques (19), nous avons choisi d'étudier l'activité antipaludique potentielle de ces *Bitter-cups*.

a. Test de la macération aqueuse

Le tableau 2 présente la teneur en matière sèche et l'IC₅₀ sur le test de chimiosensibilité de *P. falciparum* FCB1 du liquide collecté après macération.

Tableau 2. Teneur en matière sèche des macérats et IC 50 sur *Plasmodium. falciparum* FCB1 des différents gobelets après macération aqueuse.

Gobelet	A1	A2	B2	C	D1	D2
Teneur en matière sèche (mg/ml)	0,3	0,2	0,3	0,6	1,5	0,4
IC ₅₀ (µg/ml)	≥30	≥20	≥30	≥60	≥150	≥40

Le gobelet B1 s'est fendu, ne permettant pas la mesure de matière sèche, les gobelets D3 et D4 n'ont pas été testés. Aucune des préparations n'a montré d'activité antimalarique.

b. Test de la macération alcoolique

Le test a été conduit sur un seul *Bitter-cup* (B2), car les gobelets alors disponibles ont malheureusement fait les frais du climat (moisissures, éclatement...). La teneur en matière sèche du macérat alcoolique après évaporation est ici de 0,5 mg, ce qui nous

donne une IC₅₀ de 25 µg/ml, ce qui correspond à une molécule (ici un mélange) inactive au regard des produits utilisés en traitement.

c. Discussion

Les boissons tirées des *Bitter-cups* ne présentent pas d'activité antipaludique. Cela explique, d'une certaine manière, le fait que l'indication majeure de ces objets est stomachique avant d'être antimalarique. Cependant, il se pourrait aussi que l'activité antimalarique des macérats ne soit pas révélée par le test biologique utilisé. En effet, certaines molécules ont besoin d'être métabolisées pour devenir antimalariques. C'est le cas du proguanil inactif qui le devient lorsqu'il est transformé dans l'organisme en cycloguanil (20). De plus, la littérature fait état de l'utilisation de *Q. amara* comme remède traditionnel antipaludique (19, 21) mais, dans ces références, les organes utilisés sont les feuilles (en décoction dans l'eau).

Revue bibliographique : métabolites secondaires du bois de *Q. amara*

S'il est maintenant pratiquement certain que les gobelets sont issus de *Q. amara*, une revue de la littérature s'impose avant de continuer le fractionnement phytochimique. Dans le cas présent, seuls les métabolites secondaires du bois seront ciblés, afin d'anticiper les résultats que nous pourrions obtenir par fractionnement.

Nous avons relevé à travers la littérature 33 métabolites secondaires appartenant à trois familles chimiques : 9 alcaloïdes indoliques (tableau 3), 22 triterpènes (tableau 4) et 2 stéroïdes, la β -sitosténone et le β -sitostérol (22) (formules en annexe 3, tiré à part).

Tableau 3. Alcaloïdes indoliques reportés dans le bois de *Quassia amara*.

Molécules	Références
5-hydroxy-4-méthoxy-3-méthyl-canthin-2,6-dione	Barbetti <i>et al.</i> , 1990 (23)
3-méthyl-canthin-5,6-dione	Barbetti <i>et al.</i> , 1990 (23)
2-méthoxy-canthin-6-one	Njar <i>et al.</i> , 1993 (24), 1995 (25) Raji et Bolarinwa, 1997 (26)
5-hydroxy-4-méthoxy-canthin-6-one	Grandolini <i>et al.</i> , 1987 (27) Barbetti <i>et al.</i> , 1990 (23)
3-N-oxide-5-hydroxy-4-méthoxy-canthin-6-one	Barbetti <i>et al.</i> , 1990 (23)
1-méthoxy-carbonyl- β -carboline	Barbetti <i>et al.</i> , 1987 (28)
1-vinyl-4,8-diméthoxy- β -carboline	Barbetti <i>et al.</i> , 1987 (28)

Tableau 4. Triterpènes reportés dans le bois de *Quassia amara*.

Molécules	Références
Nigakilactone A	Dou <i>et al.</i> , 1996 (29)
Paraïne	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
11-acétyl-païne	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
11- α -acétyl-païne	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
12- α -hydroxy-13,18-déhydro-païne	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
Iso-païne	Grandolini <i>et al.</i> , 1987 (27) Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
Quassialactol	Dou <i>et al.</i> , 1996 (29)
Quassimarine	Kupchan et Streelman, 1976 (31)
Quassine	Clark, 1937 (32) Lavie <i>et al.</i> , 1963 (22) Nestler <i>et al.</i> , 1980 (33) Robins <i>et al.</i> , 1984a (34) et b (35) Grandolini <i>et al.</i> , 1987 (27) Scragg <i>et al.</i> , 1990 (36) Njar <i>et al.</i> , 1993 (24), 1995 (25) Dou <i>et al.</i> , 1996 (29) Raji et Bolarinwa, 1997 (26)

1- α -méthoxy-quassine	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
12-hydroxy-quassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34)
14,15-déhydro-quassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34)
18-hydroxy-quassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34) et b (35) Dou <i>et al.</i> , 1996 (29)
Isoquassine	Clark, 1937 (32) Lavie <i>et al.</i> , 1963 (22) Nestler <i>et al.</i> , 1980 (33) Tateo et Redaelli, 1980 (37) Grandolini <i>et al.</i> , 1987 (27) Dou <i>et al.</i> , 1996 (29)
11-dihydro-12-nor-néoquassine	Grandolini <i>et al.</i> , 1987 (27) Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
16- α -méthoxy-néoquassine	Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
16- α -néoquassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34)
16- β -néoquassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34)
Néoquassine	Robins <i>et al.</i> , 1984 a (34) Barbetti <i>et al.</i> , 1993 (30)
Quassinol	Casinovi <i>et al.</i> , 1969 (38)
Quassol	Duke, 1992 (39)
Simalikalactone D	Kupchan et Streelman, 1976 (31)

Revue bibliographique : activités des extraits de *Quassia amara*

Envisageons les activités d'extraits des différents organes. Les activités antiparasitaires en général et anti-protistes en particulier vont dans le sens d'une activité sur *Plasmodium*.

a. Activité antipaludique

En 1999, Ajaiyeoba *et al.* (40) ont testé un extrait hexanique et un extrait méthanolique de feuilles séchées ainsi qu'un extrait méthanolique de bois *in vivo* sur des souris infestées par *Plasmodium berghei berghei*. L'extrait hexanique s'est avéré actif par voie orale à 100 mg/kg et l'extrait méthanolique de feuilles à 200 mg/kg. L'extrait méthanolique de bois apparaît par contre peu actif.

En 2005, Bertani *et al.* (19) ont évalué l'activité de nombreux remèdes amazoniens utilisés en thérapeutique traditionnelle contre *Plasmodium*. Une infusion de feuilles et une décoction de bois de *Q. amara* ont été testées *in vitro* sur *P. falciparum* W2 et les IC₅₀ sont respectivement de 8,9 et 4,4 μ g/ml. L'infusion de feuilles a de plus été testée *in vivo* sur *P. yoelii*, et par le biais d'un test inhibant la biominéralisation de la ferriprotoporphyrine III. Le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire *in vivo* est de 62 % à 90 mg/kg/jour.

L'IC₅₀ obtenue pour l'infusion de feuilles avec le test inhibant la biominéralisation de la ferriprotoporphyrine III est de 5 µg/ml.

b. Activité antiulcéreuse

L'activité antiulcéreuse s'apparente à l'indication thérapeutique citée en première place lors de notre enquête de terrain.

Badilla *et al.* (1998) (41) ont expérimenté *in vivo* l'activité d'un extrait aqueux de bois sur la sphère gastro-intestinale. Des souris traitées à 500 et 1000 mg/kg par voie orale ont montré une augmentation du transit intestinal. Les doses de 500 et 1000 mg/kg se sont montrées préventives face à des ulcères induits par l'indométacine ou l'éthanol sur des rats. On observe à partir de 1000 mg/kg une réduction de l'acidité gastrique et de l'activité peptique, et à partir de 1500 mg/kg une augmentation de la production de groupements sulfhydryl non protéiques.

Toma *et al.* (2002) (42) ont testé quatre extraits d'écorce (hexane, dichlorométhane, éthanol 100 % et éthanol 70 %) sur des souris. Ces extraits sont actifs à 100 mg/kg *per os* dans l'ulcère gastrique induit par l'indométacine/bétanéchol. Ils sont également efficaces (100 mg/kg) dans la prévention d'ulcères induits par des contraintes hypothermiques.

c. Activité anti-poux

Jensen *et al.* (1978) (43) ont démontré l'activité d'un traitement à base de teinture (extrait éthanolique de feuilles) sur 454 patients infestés par des poux de tête. Deux applications espacées d'une semaine ont été suffisantes dans leur étude.

En 1991, Ninci (44) a également confirmé les effets prophylactiques et thérapeutiques d'extraits éthanoliques dans la pédiculose humaine, les essais ayant été effectués sur 148 enfants scolarisés en Argentine.

d. Activité anti-rétrovirale

Abdel Malek *et al.* (1996) (45) ont démontré une activité anti-rétrovirale d'un extrait aqueux d'écorce par des tests *in vitro* de protection des cellules lymphoblastoïdes-T MT 2.

e. Activité anti-fertilité

Raji et Bolarinwa (1997) (26) font état, après traitement par voie orale (100 mg/kg/jour pendant huit semaines) avec un extrait méthanolique de bois, d'une diminution réversible de la fertilité des rats. Cette diminution s'exprime par une baisse pondérale des testicules, épидидymes et vésicules séminales, et par l'augmentation de la glande pituitaire antérieure. De même, ils ont observé une diminution du nombre de spermatozoïdes, ainsi que des taux de testostérone, d'hormone lutéïnisante (LH) et de folliculostimuline (FSH) dans le sang.

f. Activité anti-appétante pour les insectes phytophages

Bien que cette activité n'intéresse pas à proprement parler la pharmacologie humaine, elle présente un intérêt pharmaceutique certain, tant du point de vue phytosanitaire que pour la répulsion de parasites ou de leurs hôtes. Mancebo *et al.* (2000) (46) ont testé l'activité anti-appétante d'extraits méthanoliques de bois et de feuilles sur *Hypsipyla grandella*. C'est pour le bois que la répulsion est la plus importante (à partir de 0,32 % d'extrait en solution), mais elle est tout de même présente pour l'extrait de feuilles (à partir de 3,16 % d'extrait en solution).

g. Activités antibactériennes et antifongiques

A 5 mg/ml, des extraits méthanoliques et hexaniques de feuilles et de bois ont inhibé la croissance d'*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger* par rapport aux témoins (47). L'extrait méthanolique de feuilles est le plus efficace sur six bactéries et cinq champignons pathogènes chez l'homme, aussi bien par diffusion sur disque d'agar que par dilution dans un milieu liquide.

h. Activités analgésiques et anti-inflammatoires

Toma *et al.* (2003) (48) ont préparé des extraits d'écorce avec l'hexane, le dichlorométhane, l'éthanol 70 % et l'éthanol 100 %. *In vivo* sur des souris mâles par voie orale, ces extraits ne montrent pas d'activité notable. Par voie intrapéritonéale, mode d'administration non traditionnel, l'extrait hexanique présente néanmoins des effets positifs, notamment sur l'œdème induit par des carraghénanes, sur le test de la plaque chauffante et sur la douleur induite par l'acide acétique. Ces auteurs analysent ces propriétés comme sédatives musculaires et relaxantes ou psychomimétiques.

Revue bibliographique : propriétés de molécules du bois de *Q. amara*

Trois molécules extraites de *Q. amara* ou présentes chez cette espèce ont fait l'objet de tests. La plus citée est la simalikalactone D (SKD), suivie de la quassine, puis de la quassimarine.

a. Activités de la simalikalactone D

a.1. Activité anti-parasitaire

Trager et Polonsky (49) ont relevé dès 1981 sur une souche chloroquino-résistante une activité anti-paludique de 5 ng/ml pour la SKD.

En 1986, O'Neill *et al.* (50) ont testé *in vitro* 14 quassinoïdes, notamment sur la souche Thailand-K1 chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum*. L'IC₅₀ obtenue pour la SKD est de 0,9 ng/ml.

En 1993, Cabral *et al.* (51) ont isolé la SKD à partir d'une autre *Simaroubaceae*, *Simaba guianensis*. L'IC₅₀ a été calculée pour deux souches de *Plasmodium* : ils obtiennent 1,6 ng/ml sur la souche Indochina-W2 chloroquino-résistante et 1,5 ng/ml sur la souche Sierra Leone-D6 méfloquino-résistante.

Bertani *et al.* (2006) (52) ont obtenu des résultats positifs tant *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, l'IC₅₀ est de 10 nM sur la souche chloroquino-résistante colombienne FcB1. *In vivo*, la SKD diminue la parasitémie de 50 % pour 3,7 mg/kg/jour par voie orale sur *Plasmodium yoelii yoelii*.

La SKD a aussi un effet sur d'autres parasites. Elle est active (53) sur *Entamoeba histolytica* HM-1 IMSS avec une IC₅₀ de 47 ng/ml. Avec d'autres quassinoïdes, elle a une action importante et durable sur les promastigotes de *Leishmania donovani* (54).

a.2. Activité anticancéreuse et cytotoxique

Xu *et al.* (2000) (55) ont testé la SKD, ainsi que d'autres quassinoïdes sur un certain nombre de lignées de cellules cancéreuses, dont KB (carcinome épidermoïde du nasopharynx), A-549 (carcinome du poumon), HCT-8 (carcinome iléocecal), CAKI-1 (cancer du rein), MCF-7 (cancer du sein) et SK-MEL-2 (mélanome). Les DE₅₀ pour la SKD sont respectivement de 0,018, 0,04, 0,013, 0,26, 0,014 et 0,13 µg/ml.

Apers *et al.* (2002) (56) ont isolé à partir de *Q. africana* deux quassinoïdes également présents chez *Q. amara*, la quassine et la simalikalactone D. Dans le cadre d'un test d'activité

anti-virale, ils ont mesuré la cytotoxicité de la SKD et observé sur des cellules VERO une cytotoxicité à partir de 5 µg/ml.

a.3. Activités antivirale et anti-rétrovirale de la SKD

Toujours chez Apers *et al.* (2002) (56), la SKD n'a pas donné de résultat sur Coxsackie B2 virus (COX B2), Measles (Edmonston A), contrairement aux virus Herpes simplex virus type 1 (HSV 1), Poliomyelitis 1 (POLIO 1), Semliki forest (SF L 10) et Vesicular stomatitis virus (VSV). Pour HSV 1, à 1 à 2 µg/ml, le facteur de réduction (RF) est supérieur ou égal à 10^4 et à 0,2 µg/ml, il est de 10^2 ; pour POLIO, à 1 à 2 µg/ml, le RF est de 10^4 ; pour SF L 10, à 2 µg/ml, le RF est de 10^2 ; enfin pour VSV, à 2 µg/ml, le RF est de 10^4 et à 0,2 µg/ml, de 10^2 . La SKD a aussi été testée sur le virus de l'immunodéficience humaine (HIV IIIB), mais la cytotoxicité élevée ne permet pas d'obtenir une information fiable.

b. Activités de la quassine

La quassine, chef de file des quassinoïdes, montre peu de propriétés antiparasitaires malgré son amertume très marquée. Ainsi, Wright *et al.* (1988) (17) ont démontré son inefficacité contre *P. falciparum* et *Entamoeba histolytica*. Apers *et al.* (2002) (56) n'ont pas trouvé d'effet sur les souches virales citées plus haut, ainsi que sur l'HIV. Ces auteurs font état d'une faible cytotoxicité de la quassine, de 134 µg/ml. Toutefois, une activité larvicide (57) sur *Culex quiquefasciatus* a été relevée à la concentration de 6 ppm en solution aqueuse, ce qui pourrait avoir un intérêt indirect dans la lutte antipaludique.

Raji et Bolarinwa (1997) (26) ont mis en évidence une activité sur l'appareil reproducteur pour l'extrait méthanolique, et, dans le même article, ils ont isolé la quassine comme molécule à l'origine des effets. À 0,1, 1 et 2 mg/kg, celle-ci entraîne une diminution de la fertilité des rats. Cet effet a été mesuré sur les mêmes paramètres (baisse pondérale des testicules, épидидymes et vésicules séminales, augmentation de la glande pituitaire antérieure, diminution du nombre de spermatozoïdes, des taux de testostérone, d'hormone lutéïnisante (LH) et de folliculostimuline (FSH) dans le sang). Un autre article publié par Njar *et al.* en 1995 (25) relate également ces travaux et les mêmes résultats.

c. Activité anti-tumorale de la quassamarine

Kupchan et Streelman (1976) (31) ont isolé, à partir de suc de *Q. amara*, la quassamarine et lui ont trouvé une forte activité anti-tumorale et une cytotoxicité peu élevée

(rapport « inhibition tumorale / cytotoxicité » compris entre 165 et 175 pour des doses allant de 1 à 4 mg/kg) sur des cellules de type PS. L'inhibition tumorale est encore significative à 50 µg/kg (rapport « inhibition tumorale / cytotoxicité » supérieur à 125). La quassimarine présente une cytotoxicité (DE₅₀) sur les cellules KB entre 10⁻² et 10⁻³ µg/ml.

Dans le même domaine, Xu *et al.* (2000) (55), parallèlement à la SKD, ont testé la quassimarine sur des souches variées de cellules tumorales, obtenant les DE₅₀ suivantes : KB, 0,06 µg/ml ; A-549, 0,03 µg/ml ; HCT-8, 0,012 µg/ml ; CAKI-1, 0,05 µg/ml ; MCF-7, 0,006 µg/ml et SK-MEL-2, 0,05 µg/ml.

Fractionnement bioguidé

Dans un chapitre précédent, nous n'avons pas mis en évidence d'activité antipaludique, mais Ajaiyeoba *et al.* (1999) (40) et Bertani *et al.* (2006) (52) ont trouvé une activité antimalarique *in vivo* intéressante pour les feuilles de *Q. amara*. Ces données (notons que les organes traités sont différents) nous ont poussé à essayer de fractionner le macérat aqueux afin d'étudier l'effet sur *Plasmodium*.

a. CLHP semi-préparative

Pour des raisons de qualité du signal, 5,5 ml du macérat du *Bitter-cup* A1 sont injectés en 5 fois (1,1 ; 1,1 ; 1,1 ; 1,3 ; 0,9 ml). La tête et la queue d'éluion n'ont pas été collectées en l'absence apparente de composés à 256 nm.

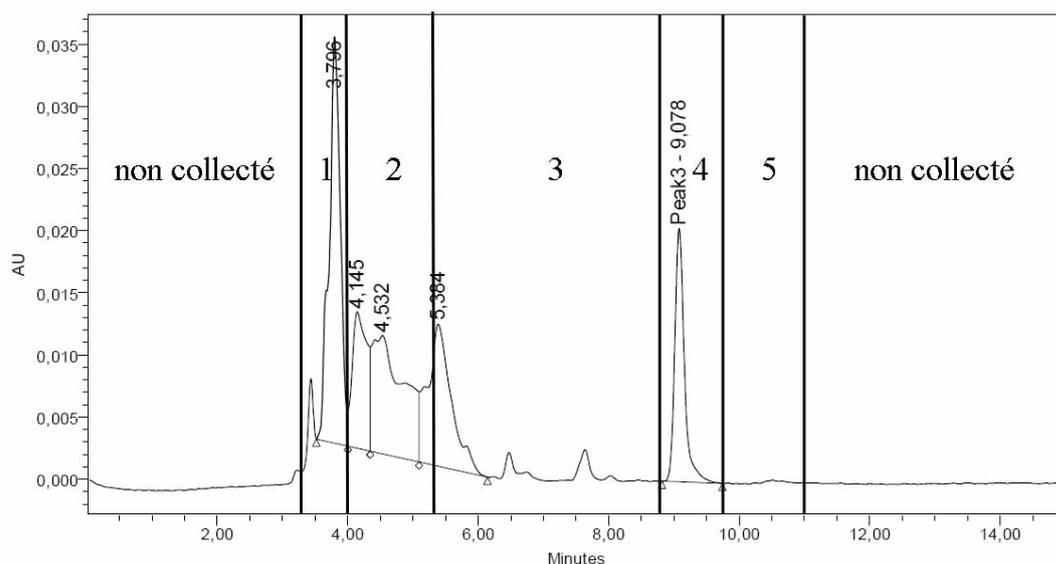


Figure 11. CLHP préparative de A1, avec délimitation des 5 fractions sur le chromatogramme.

L'éluat est récolté en 5 fractions (figure 11) réparties comme suit:

- Fraction 1 : de 3,3 à 4 min.
- Fraction 2 : de 4 à 5,3 min.
- Fraction 3 : de 5,3 à 8,8 min.
- Fraction 4 : de 8,8 à 9,7 min.
- Fraction 5 : de 9,7 à 11 min.

b. Essais biologiques

Tableau 5. Teneur en matière sèche et IC₅₀ des fractions collectées après CLHP semi-préparative de A1.

Fractions	F1	F2	F3	F4	F5
Teneur en matière sèche du pillulier (mg/ml)	4,9	0,5	0,1	≈ 0	≈ 0
IC ₅₀ (μg/ml)	≥490	≤6,25	≤1,25		

On obtient donc (tableau 3) des IC₅₀ performantes pour F2 et F3. Bien que les IC₅₀ de F4 et F5 ne soient pas calculables en raison de la faible teneur en matière sèche, F4 est visiblement efficace (à la cinquième dilution) et F5 est visiblement inactive (les activités sont répertoriées dans le tableau de l'annexe 4).

c. Discussion

Un composé ayant une masse inférieure au seuil de précision de la balance et une bonne activité peut légitimement être considéré comme performant. A l'inverse, pour un composé de masse inférieure à ce même seuil et sans activité, aucune conclusion n'est possible. Ce travail permet de postuler que certaines substances retrouvées dans les gobelets présentent une activité marquée sur *Plasmodium*, mais elles sont masquées par des composés inactifs en quantité non négligeable (F1+F5 = 0,0264 g ; F2+F3+F4 = 0,0267 g).

Si ce fractionnement ne permet pas, de par les quantités obtenues, d'envisager l'isolement de composés purs, il donne cependant un espoir quant aux potentialités du bois de *Quassia* en tant qu'antimalarique (très bonnes activités des fractions 2, 3 et éventuellement 4). Il serait maintenant judicieux de travailler sur de plus grandes quantités de matière afin de séparer les molécules responsables de l'activité. De plus, une extraction par un solvant organique adapté au macérat permettrait éventuellement de concentrer ces molécules, ou de débarrasser l'extrait des molécules inactives.