

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physiologie-Physiopathologie-Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ragomzingba Frank Edgard ZONGO

Thèse dirigée par **Christophe RIBUOT**

codirigée par **Innocent Pierre GUISSOU**

Préparée au sein du laboratoire **d'hypoxie physiopathologie,**
INSERM U 1042

Dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Caractérisation chimique et biologique de *Waltheria indica* L. (Malvaceae), herbacée utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour la prise en charge de l'asthme.

Thèse soutenue publiquement le **Mercredi 27-03-2013,**
Devant le jury composé de :

M. Denis WOUESSIDJEWE

Professeur, Université Joseph Fourier (Président)

M. Luc ROCHETTE

Professeur, Université de Bourgogne (Rapporteur)

Mme Céline DEMOUGEOT

Professeur, Université Franche-Comté (Rapporteur)

M. Achène BOUMENDJEL

Professeur, Université Joseph Fourier (Membre)

M. Innocent P. GUISSOU

Professeur, Université de Ouagadougou 1 (Co-directeur)

M. Christophe RIBUOT

Professeur, Université Joseph Fourier (Directeur)

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



DEDICACE SPECIALE :

A mes parents, Marcel et Agnès

A mon épouse Priscille Fatimata,

A ma fille Rekwendé Marie-Karole,

A ma sœur Léontine,

A Monsieur et Madame RIBUOT.

« La nuit a beau être longue, le jour fini par se lever » **Sagesse
populaire**

« Tout est grâce » Thérèse de Lisieux

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré, soutenu, encouragé et/ou ont contribué de près ou de loin au bon déroulement et à l'évaluation de cette thèse.

Aux Professeurs Luc ROCHETTE et Céline DEMOUGEOT:

Merci pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury en tant que rapporteurs malgré vos impératifs professionnels et vos multiples occupations. Puisse cette générosité se perpétuer dans la générosité d'autres personnes envers vous.

Au Professeur Christophe RIBUOT :

Ma plus profonde gratitude. Merci de m'avoir accordé votre confiance et votre soutien depuis 2010. Vous m'avez accueilli dans votre équipe comme dans votre famille. J'ai pu apprécier vos qualités humaines, votre gentillesse, votre grande générosité, votre disponibilité et l'intérêt que vous accordez au travail bien fait. Nos discussions enrichissantes ont permis à certains moments de recadrer ce travail. Merci pour votre investissement personnel, votre disponibilité permanente et vos conseils. J'implore votre indulgence pour mes maladresses à certains moments. Je n'oublierai pas cet humour constant que vous rayonnez et qui égaie le cœur. Je vous souhaite la longévité de *Adansonia digitata*. Les mots me manquent pour vous traduire ma reconnaissance. Recevez mon témoignage de reconnaissance dans le chant matinal du coq, la brise vespérale du printemps et la magnificence de la blancheur hivernale.

Au Professeur Innocent Pierre GUISSOU :

Ma profonde reconnaissance. Je vous remercie tout particulièrement pour avoir suivi mes pas depuis la 1^{ère} année de pharmacie à Ouagadougou, jusqu'à votre présence dans ce jury de thèse en tant que codirecteur. Votre investissement personnel a été à la base de la conception de ce travail. J'ai toujours été admiratif face à votre rigueur scientifique et l'amour de l'enseignement. Merci pour votre confiance, votre encadrement. « Un vieux assis voit plus loin qu'un jeune debout », dit le proverbe. Je compte encore sur votre soutien permanent.

Au Professeur Ahcène BOUMENDJEL :

Mes plus vifs remerciements. Je vous remercie sincèrement pour l'encadrement scientifique de qualité dont j'ai pu bénéficier, pour l'accueil que vous m'avez réservé dans votre équipe et surtout pour le temps précieux que vous m'avez consacré. Votre investissement personnel et votre disponibilité sans faille sont les fondements dans l'élaboration des différents articles de publication. Profonde estime et sincère reconnaissance.

Au Professeur Denis WOUESSIDJEWE :

Mes plus vifs remerciements. C'est par votre intermédiaire que j'ai pu obtenir l'accueil au laboratoire HP2. « Le veau ne dira jamais assez merci à la prairie ». Il en est de même pour moi à votre égard. Soyez remercié pour tout.

J'adresse également mes remerciements à Pr Patrick LEVY, Directeur du laboratoire HP2 et tout le personnel du laboratoire HP2 pour leur accueil et leur sympathie. Je pense en particulier à Anne Briançon, Claire Arnaud, Dominique, François Mercier, Marie Joyeux-Faure, Gille Faury, Eric, Henry Benoit

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma sympathie aux autres étudiants thésards, aux stagiaires et techniciens que j'ai côtoyés dans le laboratoire : Manue Gras, Laureline Poulain, Perle Totoson, Wassim, Zeinab, Amandine, Emilie Sapin, Emeline, Sandrine Cachot, Marie, Amelle. Merci pour votre agréable compagnie, votre gentillesse et votre soutien.

Je ne saurais oublier les responsables et les membres des autres laboratoires qui m'ont accueilli pour la réalisation de certains essais et avec qui j'ai eu des relations privilégiées. Mes remerciements vont en particulier :

Au Professeur B. Pollack et Docteur R. Marlu du laboratoire d'hématologie du CHU de Grenoble, pour l'appui technique au dosage de l'activité de la PLA2. Merci pour votre disponibilité permanente.

Au Professeur Hans Geisselmann du laboratoire de Bactériologie de l'UJF, pour l'appui technique au dosage de l'activité de la PDE4A1. Merci pour votre précieuse collaboration.

A Docteur Marine Peuchmaur et Mme Chantal Beney, Chacune en ce qui la concerne s'est engagée personnellement pour la réalisation des investigations chimiques.

A Docteur Corine Ravelet du Département de pharmacochimie moléculaire de l'UJF, pour l'appui technique au dosage de l'activité de la LOX.

Je tiens également à remercier certains de mes enseignants du Burkina Faso qui n'ont cessé de me soutenir. Je pense en particulier aux professeurs *Jean-Baptiste NIKIEMA, Issa T. SOME et Rasmané SEMDE*. Merci également aux Docteurs *Moussa OUEDRAOGO, Moustapha OUEDRAOGO et Charlemagne GNOULA*.

Je remercie spécialement la famille RIBUOT qui m'a adopté à Grenoble et qui a contribué à rendre mes séjours français agréables ;

A mon grand frère et "compagnon de lutte" à Grenoble, *Gérard Josias YAMEOGO*, que j'appelle affectueusement « tonton » Merci pour ton soutien et les bons moments passés ensemble ;

Merci à mes frères et sœurs *Germain, Chantal (in memoriam), Léontine, Sidonie, Parfait (in memoriam), Pulchérie*; Vous m'avez soutenu chacun en sa façon, par les encouragements, la pensée, la prière ... Puissions nous rester soudés toute la vie ;

Merci à mes amis et à mes collègues de service de la Direction Générale de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires du Burkina Faso et ceux du CHU Yalgado OUEDRAOGO qui m'ont soutenu et encouragé et qui continuent à le faire, de près ou de loin ;

Un merci ne sera pas de trop pour tous mes amis Grenoblois : *Claudette, Seydou, Jean, Laure, Eric, Marie-Paule, Olivier* ;

Enfin, je ne puis oublier le consulat de France au Burkina qui m'a accompagné financièrement pour la réalisation des travaux. J'ai une pensée toute singulière à *Mme Annick Giraudeau et M. François Gaudeau*.

MERCI à tous ceux à qui j'ai oublié de.....dire *MERCI !!!*

SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	III
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	V
INTRODUCTION GENERALE	1
1. Définition de l'asthme	2
2. Epidémiologie	2
3. Rappels physiologiques de l'arbre bronchique	2
3.1. Trachée et bronches	2
3.2. Régulation du tonus de la musculature lisse et de la sécrétion des bronches.....	3
4. Rappels pathologiques	7
4.1. Les étiologies de l'asthme.....	7
4.2. La réaction allergique	8
4.3. Les formes cliniques et la classification de l'asthme	12
5. Prise en charge thérapeutique de l'asthme	13
5.1. Les éléments de prise de l'asthme.....	13
5.2. La classification des médicaments antiasthmiques	13
6. Notre étude : Problématique, objectifs, démarche expérimentale	19
6.1. Problématique	19
6.2. Objectifs de l'étude	20
6.3. Démarche expérimentale.....	20
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR <i>WALThERIA INDICA</i> L.	23
DEUXIEME PARTIE : RESULTATS	58
1. Publication de résultats	59
2. Résultats non publiés	78
2.1. L'enquête ethnobotanique	78
2.2. La caractérisation histochimique	79
2.3. Les composés isolés à partir de <i>W. indica</i>	80
2.4. L'évaluation de l'interaction de <i>waltheria indica</i> avec la LOX IB de soja.....	83
2.5. L'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait hydro alcoolique de <i>W. indica</i>	84

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE	87
1. Enquête ethnobotanique et caractérisation des groupes chimiques.....	88
2. Evaluation pharmacologique et isolement bioguidé.....	88
2.1. Interaction avec les enzymes : PLA ₂ , 5-LOX, LOX IB, PDE4A1α	88
2.2. Interaction avec la trachée isolée de rat	90
3. Evaluation toxicologique	90
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
ANNEXES.....	94
RESUME.....	112
REFERENCES.....	114

AVANT PROPOS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés en collaboration entre deux universités du Nord et du Sud : l'université Joseph Fourier de Grenoble à travers le laboratoire d'hypoxie et physiopathologie cardiovasculaire (HP2) et Galénique et l'université de Ouagadougou à travers le laboratoire de Pharmacologie et toxicologie.

Cette thèse a notamment permis :

- La formation dans le cadre d'une codirection, d'un docteur en sciences pharmaceutiques, qui à l'issue de la thèse, intégrera le corps des enseignants chercheurs de l'Université de Ouagadougou ;
- Le renforcement des échanges scientifiques entre deux équipes universitaires du Nord et du Sud

La diffusion des résultats issus de ce travail de thèse a été faite à travers la participation à des séminaires et congrès scientifiques nationaux et internationaux ainsi que par les publications dans des revues scientifiques.

Articles soumis ou publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

- F. Zongo, C. Ribuot, A. Boumendjel, I. Guissou. Bioguidage search of active compound(s) from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso. Soumis à Fundamental and clinical pharmacology.
- F. Zongo, C. Ribuot, A. Boumendjel, I. Guissou. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (Syn. *Waltheria americana*): a review. Soumis à Journal of Ethnopharmacology.

Communications orales lors de congrès scientifiques :

- F. Zongo, M. Ouedraogo, C. Ribuot, A. Boumendjel, I. Guissou Effet bronchorelexant *in vitro* de *Waltheria indica* L. (Sterculiaceae) sur la trachée et le fundus de rat. *Congrès international de phytothérapie de Ouagadougou* (CIPO), 9-12 octobre 2012.
- F. Zongo, M. Ouedraogo, JB. Nikiéma, I. Guissou. Méta analyse des résultats de la recherche sur les plantes médicinales au Burkina : de 1990 à 2007. Meeting of WESTERN AFRICA NETWORK OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH SCIENTISTS (WANPRES), Ouagadougou, 2007.

Communications affichées (Posters) lors de congrès scientifiques :

- F. Zongo, C. Ribuo, I. Guissou. *In vitro* inhibition of PDE4A1, PLA2 and LOX I-B by *Waltheria indica* (Sterculiaceae). *Congrès de physiologie, pharmacologie et thérapeutique* (P2T), Grenoble, Mars 2011. Prix de la francophonie de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique, P2T 2011.
- F. Zongo, C. Ribuo I. Guissou. *In vitro* inhibition of phosphodiesterase 4A1 α , phospholipase A2 and lipoxygenase I-B by *Waltheria indica* L. (Sterculiaceae). *1^{ère} Journée Scientifique du Médicament 2011, Grenoble, 23 juin 2011.*

Autre publication :

Onifade Al-fattah Olabissi, Ouedraogo Moussa, Ouedraogo Moustapha, Zongo Frank Edgard, Kafando Eléonore, Lompo Marius and Guissou Innocent Pierre. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(7), pp. 806 - 811, July 2011.

Index des illustrations

LISTE DES FIGURES

Introduction générale

Fig. 1 : Mécanismes de régulation du tonus de la musculature lisse.....	4
Fig. 2 : Mécanismes impliqués dans la réaction allergique.....	9
Fig. 3 : Les voies métaboliques de l'acide arachidonique	10
Fig. 4: Coupes de bronche normale et de bronche pathologique avec les différentes modifications histologiques et fonctionnelles dues à l'asthme	11
Fig. 5 : Structures chimiques de la xanthine et de la théophylline.....	14
Fig. 6 : Structures chimiques des cromones.....	14
Fig. 7 : Structures chimiques du zafirlukast, du montelukast et du zileuton.....	15
Fig. 8 : Mécanisme d'action des anti IgE	18
Fig. 9 : Les différentes étapes expérimentales de la recherche bioguidée.....	21

1^{ère} partie : Revue bibliographique sur *Waltheria indica*

Fig. 1 : <i>Waltheria indica</i> L. (a) <i>Waltheria indica</i> in its natural habitat; (b) roots.....	28
Fig. 2 : Chemical structures of cyclopeptid alkaloids isolated from <i>Waltheria indica</i>	34

2^{ème} partie : Résultats

Publication de résultats

Fig. 1 : Bioactivity-guided fractionation of hydro alcoholic extract from <i>W. indica</i>	64
Fig. 2 : Chemical structure of F36823GB: (-)-epicatechin.....	67
Fig. 3 : 5-LOX activity in absence and in presence of F36823GB.....	68
Fig. 4 : PLA ₂ activity in absence and in presence of hydro alcoholic extract (HA) and fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄	69
Fig. 5 : PLA ₂ activity in absence and in presence of F36823GB.....	70
Fig. 6 : Relaxant effect of fractions derived from F ₃	71

Résultats non publiés

Fig. 1 : Coupes colorées (a, b et c) et non colorée (d) de feuilles de <i>W. indica</i> observées au microscope électronique (x10).....	79
Fig. 2 : Coupes colorées (a, b et c) et non colorée (d) de tige de <i>W. indica</i> observées au	

microscope électronique (x10).....	80
Fig. 3 : Partition du macéré hydro alcoolique et de la fraction F3.....	81
Fig. 4 : Isolement de F368 23GB (a.); F36 83A (b).....	82
Fig. 5 : Activité de la LOX-IB en absence et en présence de l'extrait hydro alcoolique et de ses fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄	83
Fig. 6 : Activité de la LOX-IB en absence et en présence de F36823GB.....	84
Fig. 7 : Courbe de mortalité des souris <i>swiss</i> ayant reçu des doses croissantes d'extrait hydro alcoolique de racines de <i>Waltheria indica</i>	85

Annexes

Fig. 1 : CCM des fractions F36 et F35 (Eluant Acétate d'éthyle/eau 7:3 - UV 254 nm).....	106
Fig. 2 : Profil CCM des fractions groupées F36 83-90 et F36 91-95.....	107
Fig. 3 : CCM préparatives des fractions groupées F36 83-90 et F36 91-95.....	107
Fig. 4 : Vérification de la pureté de F36 83A, F36 83B, F36 95A et F36 95B.....	108
Fig. 5 : RMN proton de F36 83A.....	109
Fig. 6 : RMN carbone 13 de F36 83A	110
Fig. 7 : Spectre de masse de F36 83A.....	111

LISTE DES TABLEAUX

Introduction générale

Tableau I	: Actions du système NANC	6
Tableau II	: Classification des stades de l'asthme selon le niveau de contrôle.....	12

1^{ère} partie : Revue bibliographique sur *Waltheria indica*

Table 1	: Traditional uses of <i>Waltheria indica</i> L.....	30
Table 2	: Chemical groups identified and compounds isolated from <i>Waltheria indica</i>	35
Table 3	: Pharmacological investigations of <i>Waltheria indica</i>	37

2^{ème} partie : Résultats

Résultats non publiés

Tableau I	: Données sur l'usage traditionnel de <i>W. indica</i> collectées auprès de deux tradipraticiens de santé.....	78
Tableau II	: Résultats de l'étude de la toxicité générale aiguë de l'extrait hydro alcoolique des racines de <i>W. indica</i>	84

Annexes

Tableau I	: Résultats du fractionnement de F3.....	105
Tableau II	: Regroupement des fractions issues de F36 d'après leur profil CCM.....	106

INTRODUCTION GENERALE

1. Définition de l'asthme

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, « l'asthme est une maladie chronique qui se caractérise par des crises récurrentes où l'on observe des difficultés respiratoires et une respiration sifflante et dont la gravité et la fréquence varient d'une personne à l'autre. Les symptômes peuvent se manifester plusieurs fois par jour ou par semaine et s'aggravent chez certains sujets lors d'un effort physique ou pendant la nuit ».

Les patients ont habituellement une réduction du volume expiratoire forcé aussi bien qu'une réduction du débit respiratoire. D'autres caractéristiques de l'asthme sont l'inflammation des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique; la réversibilité de l'obstruction des voies respiratoires confirme le diagnostic (Karol, 1994).

2. Epidémiologie

L'asthme affecte approximativement 300 millions de personnes dans le monde et serait responsable de 250.000 décès chaque année (Rapport GINA, 2011). Les études épidémiologiques soulignent une hétérogénéité des chiffres de prévalence récoltés de par le monde, une augmentation de la fréquence et du taux de létalité de l'asthme. Il ressort également de ces études une modulation de l'évolution des symptômes par des facteurs environnementaux notamment la pollution (Bouvenot et coll., 1994). En France, la prévalence cumulée de l'asthme était de 10 % en 2010 chez l'enfant âgé d'au moins dix ans et une prévalence de l'asthme actuel de 6 à 7 % chez l'adulte (Delmas et coll., 2010).

Au Burkina Faso, des études parcellaires donnent une prévalence de l'asthme de 9,6 % chez les sujets âgés de 15 à 64 ans dans la deuxième ville du pays, Bobo Dioulasso (Miningou et coll., 2002) ; 0,5 % chez les enfants de 0 à 15 ans hospitalisés dans le service de pédiatrie du Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo durant la période de janvier 1990 à décembre 1994 (Sanou et coll., 1995).

3. Rappels physiologiques de l'arbre bronchique

3.1. Trachée et bronches

La trachée est un tube semi-rigide donnant naissance à deux bronches souches qui se subdivisent plusieurs fois à l'intérieur des poumons. La trachée et les bronches sont formées

d'une tunique fibro-cartilagineuse renfermant des anneaux cartilagineux. En dedans de la tunique, on observe une muqueuse et une sous muqueuse et en dehors, la périfronche dans laquelle cheminent des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. La muqueuse comprend superficiellement un épithélium formé de cellules ciliées et de cellules mucipares, un tissu conjonctif renfermant une couche musculaire lisse. La sous-muqueuse renferme des glandes.

3.2. Régulation du tonus de la musculature lisse et de la sécrétion des bronches

L'arbre bronchique assure la conduction et la filtration de l'air inhalé. La compliance des bronches est assurée par une régulation nerveuse et hormonale qui permet une adaptation physiologique du diamètre des bronches : c'est le tonus musculaire de base.

Les sécrétions bronchiques assurées par les glandes sous-muqueuses permettent une humidification des voies respiratoires et participent à la défense muco-ciliaire.

Le contrôle neuro-humoral des voies respiratoires est assuré par :

- des voies efférentes parasympathiques excitatrices,
- des fibres sympathiques inhibitrices,
- des fibres non-adrénergiques non-cholinergiques (NANC), qui peuvent être soit excitatrices (e-NANC), soit inhibitrices (i-NANC).

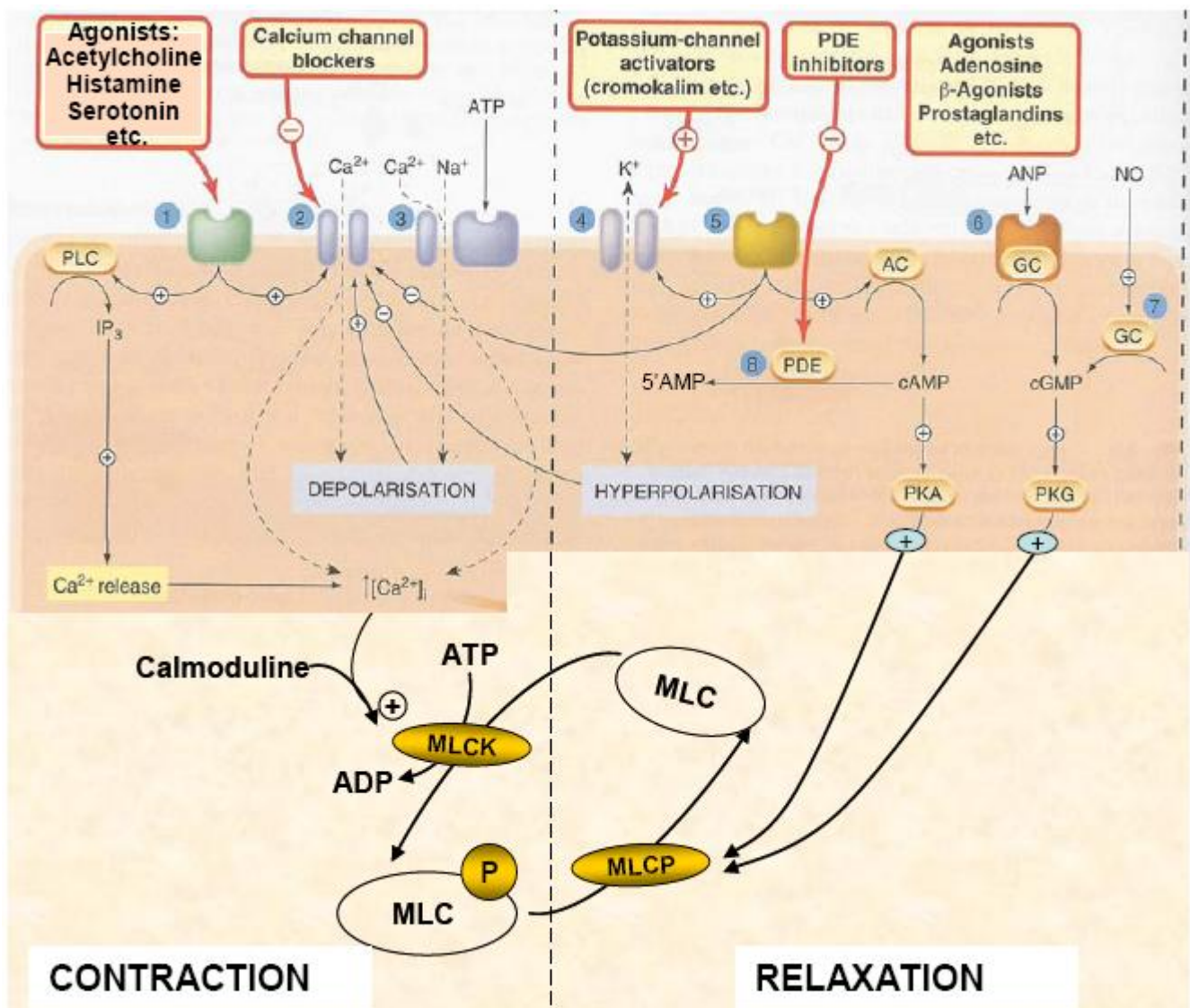


Fig. 1 : Mécanismes de régulation du tonus de la musculature lisse (adapté de Rang et coll., 2003)

Les cibles de certains agents pharmacologiques sont répertoriées dans la figure 1 : ADP (Adenosine diphosphate), AC (Adenylcyclase), cAMP (Cyclic Adenosine monophosphate), ANP (Atrial Natriuretic peptid), ATP (Adenosine triphosphate), PKA (Proteine kinase A), PKG (proteine kinase G), GMPc (Cyclic Guanosine monophosphate), MLC (Myosin light Chain), MLCK (Myosin Light Chain Kinase), MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase), PDE (Phosphodiesterase) (Rang et coll., 2003).

L'activation des supports d'action couplée à une mobilisation du calcium intracellulaire (exemples : Récepteurs muscarinique, histaminergique ou sérotoninergique) ou à une

dépolarisation entraîne une contraction musculaire, tandis que la stimulation des supports couplée à une augmentation d'AMPc (exemple : PDE), de GMPc (exemples : Récepteur beta-2, à l'adénosine) ou une hyperpolarisation membranaire provoque une relaxation musculaire.

Les médiateurs chimiques libérés par les cellules en particulier inflammatoires jouent un rôle important dans la régulation des fonctions bronchiques uniquement dans les conditions pathologiques (Rang et coll., 2003).

3.2.1. L'innervation parasympathique

Les afférences débutent par un réseau de terminaisons libres situées dans l'épithélium bronchique. Ce sont des récepteurs d'irritation et les terminaisons des fibres C. Elles aboutissent dans le tronc cérébral. Les voies efférentes empruntent le nerf vague (qui prend naissance dans le tronc cérébral) jusqu'au relais ganglionnaire situé dans la paroi bronchique. Des fibres post ganglionnaires courtes rejoignent les effecteurs cibles que sont les cellules musculaires lisses, les glandes et les vaisseaux (Gilhodes et coll., 1994).

Deux types de récepteurs cholinergiques sont présents à la surface des cellules neuronales et non-neuronales (macrophages, lymphocytes, mastocytes, cellules musculaires lisses, cellules épithéliales) : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques. Trois (3) sous types de récepteurs muscariniques (M1, M2, M3) sont décrits au niveau de l'innervation bronchique.

Les récepteurs M1 sont localisés dans les ganglions, sur les cellules post synaptiques et leur stimulation facilite la neurotransmission assurée par l'acétylcholine.

Les récepteurs M2 sont des autorécepteurs régulant la libération de l'acétylcholine par les neurones cholinergiques post ganglionnaires.

Les récepteurs M3 sont localisés sur le muscle lisse bronchique et les glandes. Ils servent d'intermédiaire dans la contraction musculaire et la sécrétion glandulaire (Rang et coll., 2003).

L'activation des récepteurs nicotiniques a un effet relaxant sur le muscle lisse trachéal de souris et bronchique de chien, ainsi qu'un effet anti-inflammatoire dans un modèle d'asthme murin. Ce qui fait d'eux des cibles potentielles dans le traitement de l'asthme (Dorion, 2005).

Au niveau des voies respiratoires saines, un tonus vagal de base est entretenu par une libération constante et physiologique d'acétylcholine.

3.2.2. L'innervation sympathique

Des fibres sympathiques innervent les vaisseaux sanguins et les glandes. La noradrénaline libérée provoque une vasoconstriction et une inhibition des sécrétions (Rang et coll., 2003). Il n'y a pas de terminaisons nerveuses sympathiques à proximité des cellules musculaires lisses chez l'humain. Cependant, il y existe des récepteurs adrénergiques β_2 (Gilhodes et coll., 1994). Au niveau de la voie respiratoire, les récepteurs β_2 sont présents, sur les muscles lisses, l'épithélium, les glandes et les cellules mastocytaires. Leur stimulation entraîne une relaxation du muscle lisse, une inhibition de la libération de médiateurs par les mastocytes et un accroissement de la clairance muco-ciliaire.

Une modulation de la neurotransmission cholinergique s'observerait en cas d'accroissement du tonus cholinergique (Barnes, 2007). Les catécholamines circulantes par stimulation des récepteurs β_2 des muscles lisses, régulent la bronchoconstriction cholinergique.

3.2.3. Le système non adrénergique non cholinergique (NANC)

Le système NANC est constitué de fibres afférentes non myélinisées suivant le trajet des fibres parasympathiques. Sa stimulation libère des neuropeptides bronchodilatateurs tel que le VIP (Vaso intestinal peptide) ou bronchoconstricteurs telles que les tachykinines (substance P, neurokinines A et B respectivement notées NKA / NKB) (Gilhodes et coll., 1994).

Ces deux (2) groupes de médiateurs permettent de définir deux (2) systèmes NANC, l'un inhibiteur (i-NANC) et l'autre excitateur (e- NANC). Les actions des deux (2) systèmes sur le muscle lisse, les vaisseaux et les sécrétions glandulaires sont résumées dans le tableau ci-dessous (Widdicombe, 1998).

Tableau I : Actions du système NANC

		Muscle lisse vasculaire	Sécrétion glandulaire	Muscle lisse des voies respiratoires
i-NANC	VIP	-	-, +	-
	NO	-	-	-
	NPY	+	-	-
e-NANC	SP/NKA	-	+	+

+ : excitation ; - : inhibition

NPY : neuropeptide Y ; NO : monoxyde d'azote ; SP : substance P ; NKA : neurokinine A ;

VIP : Vaso intestinal peptide

4. Rappels pathologiques

4.1. Les étiologies de l'asthme

Bien que l'asthme soit d'origine multifactorielle, l'atopie semble être le paramètre le plus fortement corrélé à son développement. Plus de 50% des asthmatiques présentent de l'atopie, c'est-à-dire un taux élevé d'immunoglobulines de type E (IgE), des anticorps allergènes-spécifiques, ainsi qu'une réponse positive à divers allergènes lors de tests cutanés (Peat et coll., 1996). Deux sous types d'asthme sont ainsi clairement identifiés: l'asthme allergique et l'asthme non allergique. Tous les deux sont caractérisés par une infiltration importante d'éosinophiles au niveau de la muqueuse bronchique, par la présence de lymphocytes T activés, et par un taux élevé de chimiokines et de cytokines (Busse et coll., 2001). Dans l'asthme allergique, les études épidémiologiques montrent une corrélation forte avec l'augmentation des taux d'IgE (Brunton et coll., 2005). Les asthmatiques non-allergiques se distinguent par l'absence dans le sérum d'IgE allergènes-spécifiques ainsi que par des tests d'allergie cutanés négatifs (Romanet-Manent et coll., 2002) et une accumulation de macrophages alvéolaires au niveau de la muqueuse bronchique.

Quelque soit le type d'asthme, l'inflammation associée à une hyperréactivité bronchique des voies respiratoires reste une caractéristique commune (Rang et coll., 2003). Elle peut être déclenchée par des réponses immunitaires innées et/ou adaptées. Chez les sujets présentant un asthme allergique, il est établi que l'exposition aux allergènes initie ou favorise le processus inflammatoire (Brunton et coll., 2005).

L'hyperréactivité bronchique correspond à une sensibilité anormale à des stimuli tels que : les allergènes, les infections respiratoires, le reflux gastro-oesophagien, certains médicaments comme l'acide acétyl salicylique (Gilhodes et coll., 1994), l'air froid et sec inhalé au cours d'exercice, certains produits irritants inhalés au cours d'activités professionnelles, une perturbation psychoaffective (Bouvenot et coll., 1994).

Chez le sujet asthmatique, l'hyperréactivité vagale intervient pour une large part dans l'hyperréactivité bronchique. Une diminution du nombre et de la sensibilité des récepteurs β_2 a été aussi observée (Gilhodes et coll., 1994). Il en résulte un déséquilibre du tonus des muscles lisses bronchiques.

4.2. La réaction allergique

La réaction allergique a lieu en deux temps : une première phase qui consiste en une sensibilisation des cellules présentatrices de l'antigène (macrophages et cellules dendritiques). L'activation des lymphocytes T-helper type 2 (TH2) par la cellule présentatrice de l'antigène conduit à la production d'interleukine 4 (IL-4), IL-5 et IL-13. L'interleukine 4 libéré à partir des lymphocytes TH2 (et des basophiles) stimule la synthèse et la production des IgE par les lymphocytes B ainsi que l'expression des récepteurs aux IgE sur les mastocytes et les éosinophiles. L'interleukine 5 (IL-5) participe à la survie des éosinophiles. Par ailleurs, La réponse immunitaire déclenche la production additionnelle de cytokines et de chémokines qui vont promouvoir la migration de cellules sanguines (eosinophiles, basophiles, neutrophiles et lymphocytes) vers les tissus des voies respiratoires. Ces cellules génèrent une variété de cytokines et de substances autacoides.

Dans la deuxième phase de la réaction allergique, l'introduction d'un allergène se liant aux IgE fixés sur les mastocytes entraîne la dégranulation mastocytaire et la libération de médiateurs de l'inflammation (fig.2). Les mastocytes activés libèrent deux (2) types de médiateurs : des médiateurs préformés comme l'histamine et la sérotonine responsables d'une réaction immédiate avec bronchoconstriction, d'une augmentation de la perméabilité capillaire et de la sécrétion de mucus ; puis des médiateurs inflammatoires synthétisés à partir de la membrane plasmique (fig.3). Les éosinophiles activés libèrent des protéines inactivant certains médiateurs (PAF, histamine) et des produits altérant la structure de l'épithélium bronchique. Le taux d'éosinophiles sanguins et tissulaires est augmenté chez les patients asthmatiques allergiques ou non (Gilhodes et coll., 1994).

L'allergie initie ou potentialise le processus inflammatoire dans l'asthme. L'inflammation chronique des bronches entraîne un remodelage pathologique marqué par une hypertrophie de la musculature lisse, une infiltration cellulaire, une hypersécrétion des bronches et une destruction de l'épithélium (fig. 4).

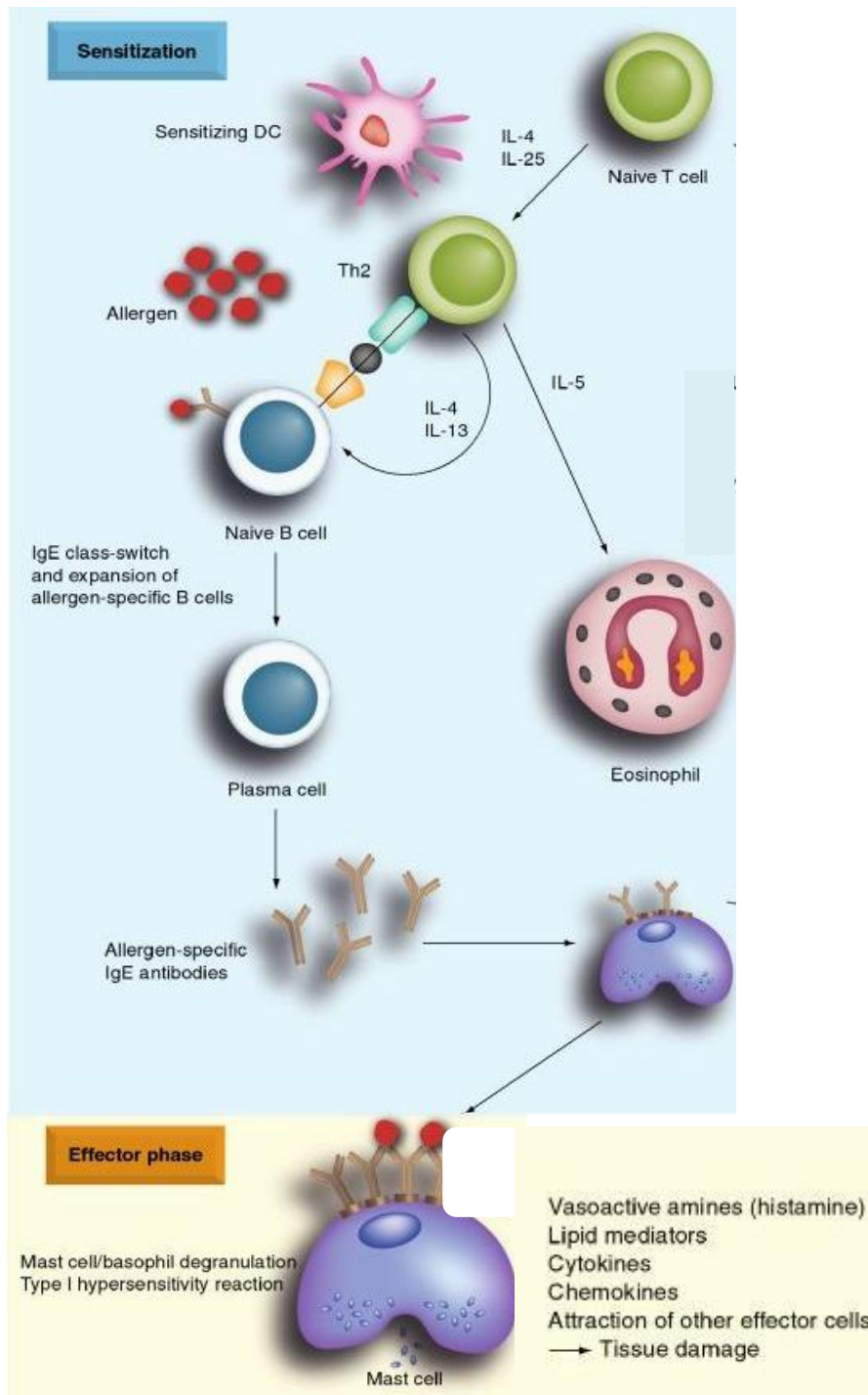
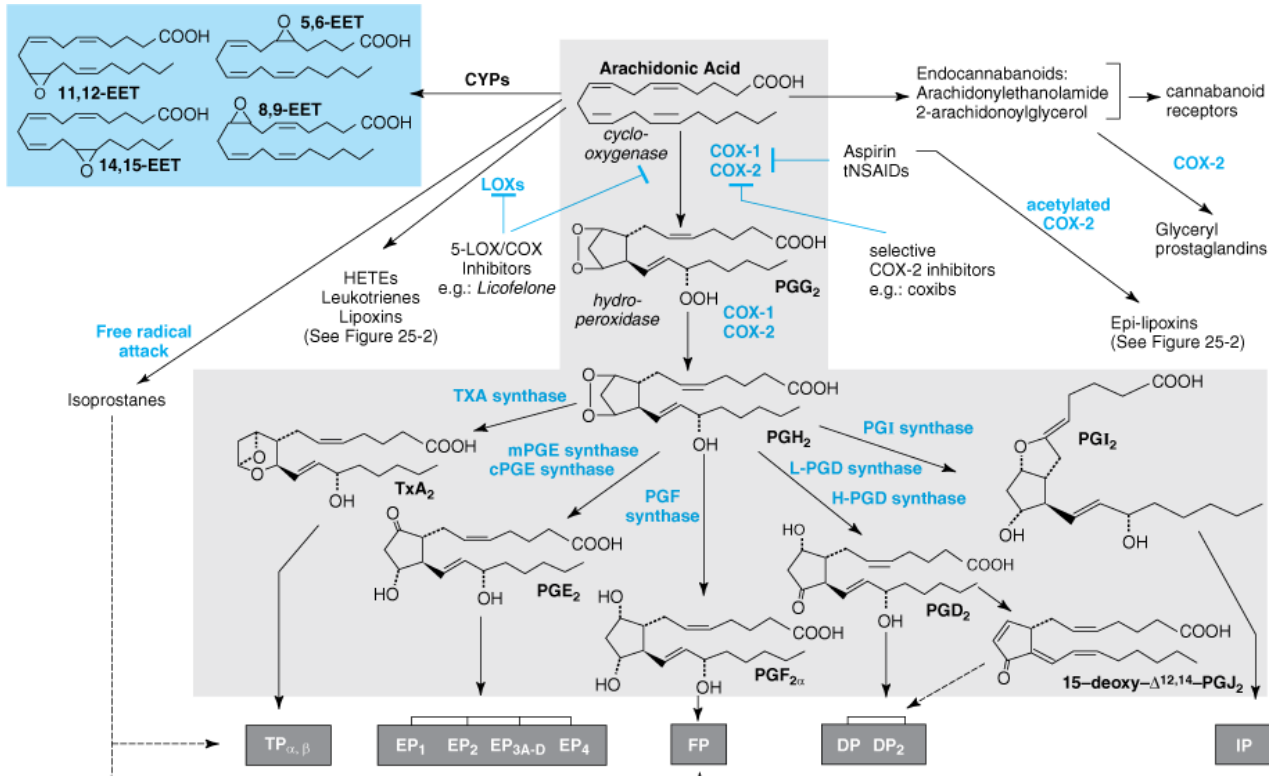
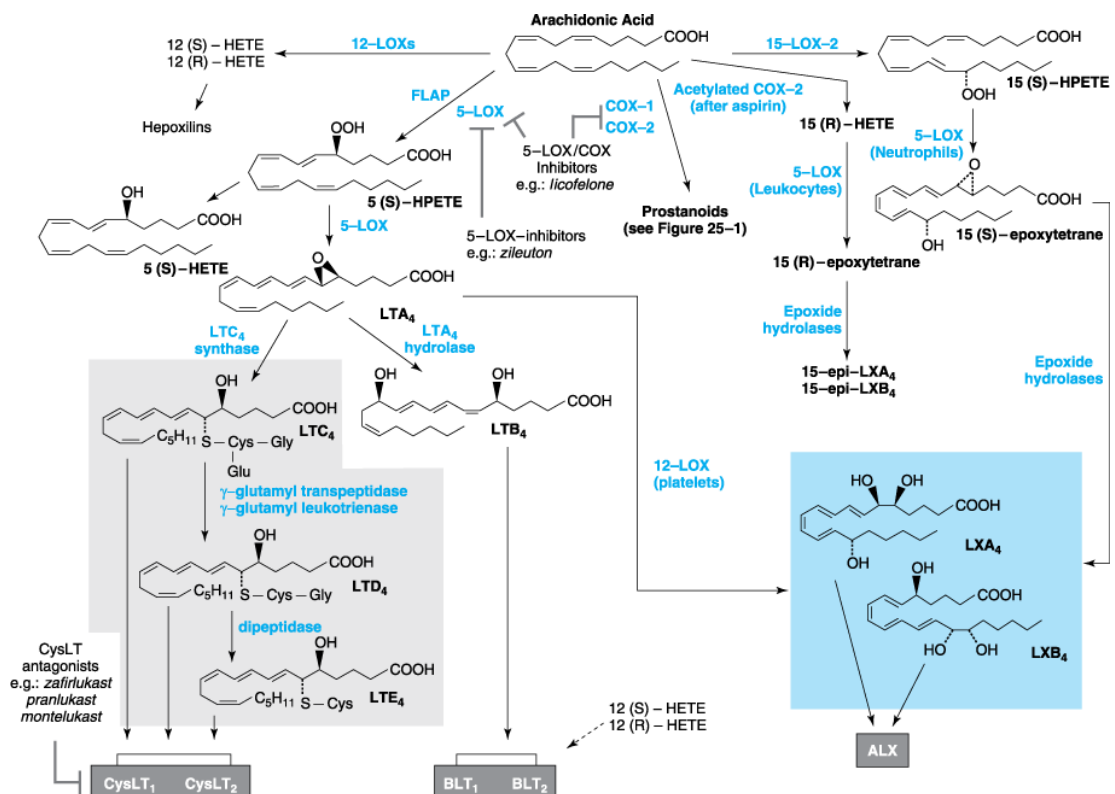


Fig. 2 : Mécanismes impliqués dans la réaction allergique (Soyka et coll., 2012)



a.



b.

Fig. 3 : Les voies métaboliques de l'acide arachidonique (a) Voie des COX ; (b) Voie des LOX (Brunton et coll., 2005)

tel-00949223, version 1 - 19 Feb 2014

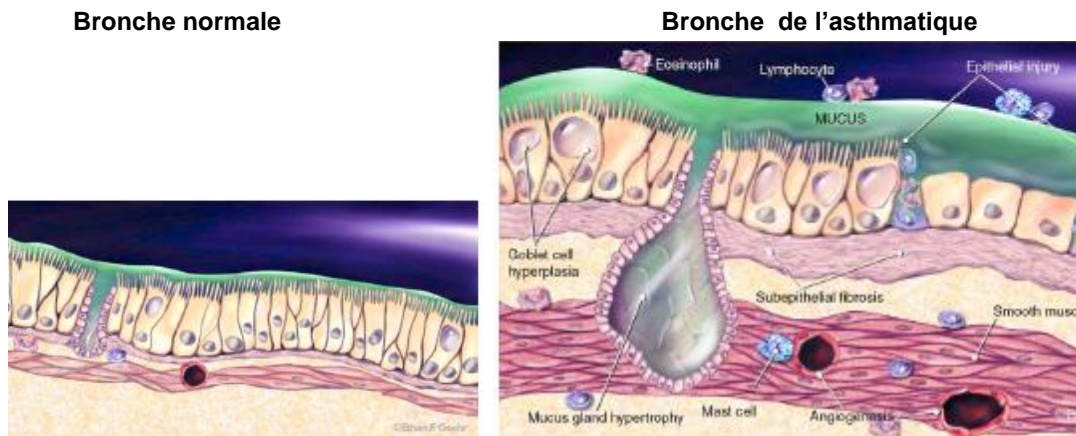


Fig. 4 : Coupes de bronche normale et de bronche pathologique avec les différentes modifications histologiques et fonctionnelles des bronches dues à l'asthme (Lazaar et coll., 2004)

Finalement, l'asthme réalise une situation dans laquelle on observe une obstruction réversible et récurrente des voies respiratoires en réponse à des stimuli (hormonal, chimique, physique) qui n'affectent pas le sujet non asthmatique (Rang et coll., 2003) ainsi qu'une inflammation chronique des bronches caractérisée par une infiltration cellulaire, une hypersécrétion et une hypertrophie des bronches.

4.3. Les formes cliniques et la classification de l'asthme

L'asthme peut être de manifestation aiguë ou chronique. L'asthme chronique se caractérise par des attaques (crises) intermittentes de dyspnée, de sibilances et de toux. La dyspnée est réversible. Cependant, les modifications pathologiques sous jacentes peuvent ne pas l'être et s'aggraver. L'asthme aigu sévère ou état de mal asthmatique n'est pas facilement réversible et peut être fatal (Rang et coll., 2003).

Selon la fréquence des symptômes, de recours au traitement, la limitation de l'activité quotidienne et l'atteinte de la fonction respiratoire, on distingue l'asthme contrôlé, l'asthme partiellement contrôlé et l'asthme incontrôlé (Tableau II).

Tableau II : Classification des stades de l'asthme selon le niveau de contrôle (Rapport GINA, 2011)

Caractéristique	Contrôlé	Partiellement contrôlé	Incontrôlé
Symptômes diurnes	Non (≤ 2 fois / semaine)	> 2 fois/semaine	3 ou plusieurs critères de l'asthme partiellement contrôlé
Limitation des activités	Non	Quelques activités	
Symptômes nocturnes/réveil	Non	Quelque fois	
Besoin de prise en charge/recours au traitement	Non (≤ 2 fois / semaine)	> 2 fois/semaine	
Fonction pulmonaire (DEP, Débit Expiratoire de Pointe et le VEMS, Volume Expiratoire Maximal Seconde)	Normale	$< 80\%$ du meilleur niveau individuel (si connu)	

5. Prise en charge thérapeutique de l'asthme

5.1. Les éléments de prise en charge de l'asthme

Les éléments de la prise en charge de l'asthme comportent l'éviction de l'allergène (si cela est possible), les médicaments, l'immunothérapie spécifique, la kinésithérapie et l'éducation du patient. Le traitement de l'asthme aura pour objectifs de rompre la crise, prévenir l'état de mal, prévenir les récurrences, l'aggravation ou le passage à la chronicité.

L'immunothérapie spécifique consiste en une désensibilisation après s'être assuré de la responsabilité de l'allergène dans la symptomatologie. Les tests cutanés, le dosage des IgE spécifiques sont utilisés à cet effet. Cependant, l'asthme atopique est bien souvent multiallergique. La kinésithérapie et la réhydratation permettent de fluidifier les sécrétions bronchiques et d'évacuer les bouchons muqueux (Gilhodes et coll., 1994).

La pharmacothérapie de l'asthme fait appel à des médicaments qui réduisent l'inflammation des voies respiratoires (c'est-à-dire des anti-inflammatoires) et des médicaments qui agissent en réduisant les bronchospasmes, (c'est-à-dire des bronchodilatateurs). Plusieurs classes pharmacologiques de médicaments sont indiquées actuellement dans le traitement de l'asthme. Il s'agit des agonistes des récepteurs adrénergiques, des inhibiteurs des phosphodiesterases, des anticholinergiques, des inhibiteurs des leucotriènes, des glucocorticoïdes, des cromones et des inhibiteurs d'immunoglobulines E (IgE) (Brunton et coll., 2005).

5.2. La classification des médicaments antiasthmiques

La classification peut se faire selon plusieurs critères : chimique, pharmacologique.

5.2.1. La classification selon le critère chimique

D'après le critère chimique, on distingue :

- les analogues de la Noradrénaline : salbutamol, salmétérol.
- les analogues de l'acétylcholine : ipratropium, oxitropium
- les xanthines : théophylline, aminophylline (fig.5)

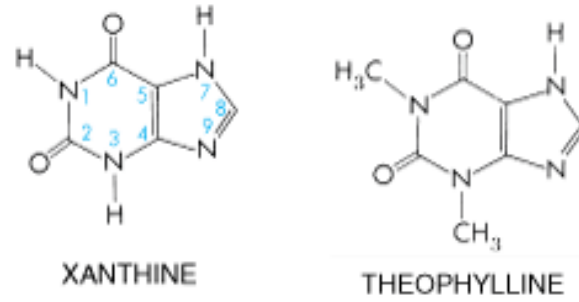


Fig. 5 : Structures chimiques de la xanthine et de la théophylline

- les cromones : cromoglycate de sodium (fig.6)

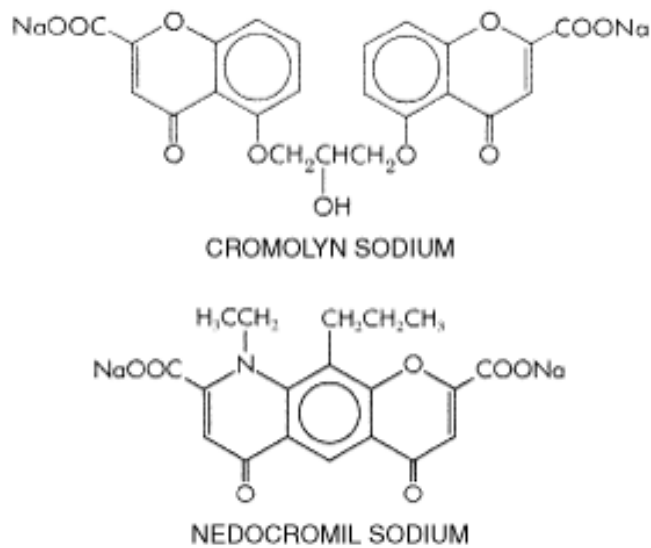


Fig. 6 : Structures chimiques des cromones

- les corticoïdes : prednisolone, betaméthasone
- les lukasts : zafirlukast, montelukast (fig.7)
- le zileuton (fig.7)

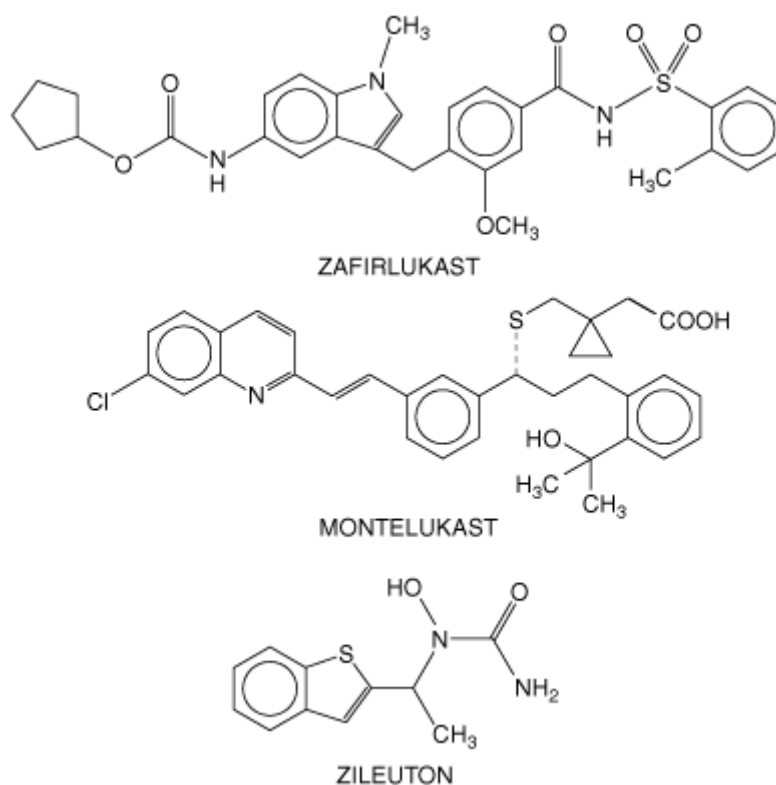


Fig. 7: Structures chimiques du zafirlukast, du montelukast et du zileuton

5.2.2. La classification selon le critère pharmacologique

D'après le critère pharmacologique, on peut distinguer les bronchodilatateurs, les anti-leucotriènes, les anti-dégranulants mastocytaires, les anti-inflammatoires stéroïdiens et les inhibiteurs d'immunoglobulines E.

5.2.2.1. Les bronchodilatateurs

Ce groupe comprend les bêta-2 mimétiques, les anticholinergiques et les inhibiteurs des phosphodiésterases.

- Les bêta-2 adrénergiques provoquent par activation des récepteurs bêta 2 une relaxation du muscle lisse bronchique par la production d'AMPc et une diminution de la dégranulation mastocytaire. On distingue deux groupes selon la durée d'action :
 - Les bêta-2- adrénergiques de courte durée d'action (4-6 heures)

Exemples de médicaments : Salbutamol (aérosol, comprimé, sirop, solution injectable), Terbutaline (aérosol, poudre pour inhalation buccale, comprimé, solution injectable), Fénotérol (aérosol)

- Les bêta-2-adrénergiques de longue durée d'action (>12 heures)

Exemples de médicaments : Formotérol (poudre pour inhalation buccale), Salmétérol (aérosol, poudre pour inhalation buccale), Salbutamol (comprimé LP)

➤ Les anticholinergiques

Le récepteur cholinergique impliqué dans la contraction du muscle lisse bronchique est le récepteur muscarinique M3. Bien que l'ipatropium et ses composés dérivés aient une affinité similaire vis à vis des différents types de récepteurs muscariniques, il est probable que le blocage du récepteur M3 soit le seul responsable de l'effet bronchodilatateur. L'effet bronchodilatateur induit par l'ipatropium chez les sujets asthmatiques se développe plus lentement et est moins intense que l'effet des agonistes adrénergiques.

➤ Les inhibiteurs des phosphodiésterases (PDE4)

La théophylline et ses dérivés provoquent une bronchodilatation en augmentant le taux de l'AMPc au niveau du muscle lisse par inhibition des phosphodiésterases. Les xanthines ont une action directe sur le calcium intracellulaire. Au niveau épithélial, ils améliorent le transport muco-ciliaire et empêchent la libération de médiateurs de l'inflammation par les cellules inflammatoires (éosinophiles, macrophages et lymphocytes).

5.2.2.2. Les anti- dégranulants mastocytaires

Les antidégranulants mastocytaires sont représentés par les cromones. Ils ont un effet stabilisant de membrane des basophiles et des mastocytes par blocage de l'entrée du calcium dans la cellule. Leur action est préventive.

5.2.2.3. Les anti- leucotriènes

Les anti-leucotriènes incluent des antagonistes des récepteurs CysLT1 (Zafirlukast, ACCOLATE[®], montelukast, SINGULAIR[®]) et les inhibiteurs de la synthèse des leucotriènes (Zileuton, ZYFLO[®]).

Tous les Cysteinyl leucotriènes C4 (LTC4), D4 (LTD4) et E4 (LTE4) sont de puissants bronchoconstricteurs. Le récepteur cyst-LT1 est impliqué dans l'effet bronchoconstricteur bien que chaque type de leucotriène soit un agoniste de ce récepteur, LTE4 est moins puissant que LTC4 et LTD4. Le zafirlukast et le montelukast sont des antagonistes sélectifs du récepteur

cyst-LT1. Les effets des leucotriènes ne sont pas limités à la contraction du muscle lisse. Ils peuvent augmenter la perméabilité capillaire, la sécrétion de mucus et la stimulation de l'infiltration d'éosinophiles et de basophiles dans les voies respiratoires.

La synthèse des cys-leucotriènes se fait grâce à l'action des lipoxygénases dont la 5-lipoxygénase (5-LOX). Le zileuton est un inhibiteur puissant et sélectif de l'activité de la 5-LOX (Brunton et coll., 2005).

5.2.2.4. Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes

L'action des glucocorticoïdes passe par l'inhibition de la synthèse de protéines pro-inflammatoires, cytokines, chimiokines. Les glucocorticoïdes induisent la synthèse de la lipocortine qui inhibe la phospholipase A₂, enzyme clé de la synthèse des écosanoïdes. Les glucocorticoïdes inhibent l'infiltration cellulaire, réduisent l'hyperactivité bronchique non spécifique. On distingue selon la voie d'administration :

- les corticoïdes par voie générale (voie orale, parentérale) ; exemples : prednisolone, betaméthasone, dexaméthasone.
- les corticoïdes inhalés ; exemple: beclométhasone.

5.2.2.5. Les inhibiteurs d'immunoglobulines E

L'omalizumab (XOLAIR[®]) est le premier inhibiteur d'IgE à être approuvé pour le traitement de l'asthme. C'est un anticorps monoclonal recombinant humain dérivé de l'ADN et dirigé contre les IgE. Les IgE liés à l'omalizumab ne peuvent plus se fixer aux récepteurs des IgE localisés sur les mastocytes et les basophiles. Cette action prévient la réaction allergique dans sa phase précoce (Brunton et coll., 2005).

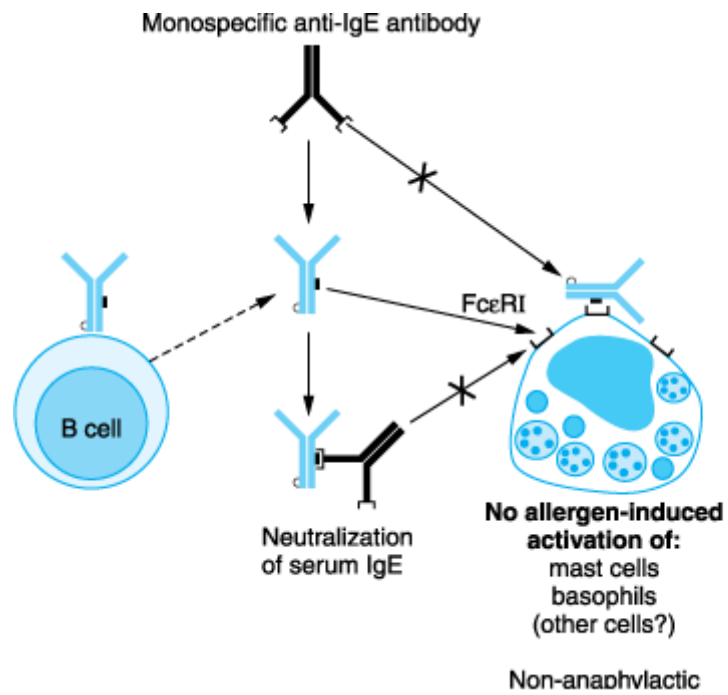


Fig. 8 : Mécanisme d'action des anti IgE (Brunton et coll., 2005)

6. Notre étude : Problématique, objectifs, démarche expérimentale

6.1. Problématique

La pharmacothérapie de l'asthme fait appel à des médicaments qui réduisent l'inflammation des voies respiratoires et des médicaments qui agissent en réduisant les bronchospasmes. Bien que les médicaments essentiels au traitement de l'asthme soient disponibles, leur coût demeure un obstacle quant à la prise en charge de la maladie. Une enquête internationale sur l'accès aux médicaments essentiels de l'asthme (salbutamol et beclométhasone) dans 46 pays en voie de développement, faisait ressortir que l'un des principaux obstacles au traitement adéquat de l'asthme était le coût élevé des médicaments pour la majorité des patients. Au Burkina Faso, le traitement annuel d'un cas d'asthme modéré est estimé à 192 \$ US, soit le double du salaire mensuel d'un infirmier (Karen, 2005). Ceci explique en partie le recours de la majorité des populations des pays en voie de développement à la médecine traditionnelle.

Au Burkina Faso, *Waltheria indica* L. syn. *W. americana* L., une herbacée tropicale est utilisée en médecine traditionnelle dans la prise en charge aussi bien curative que préventive de l'asthme (Nacoulma, 1996; Traoré D., 1983). La recherche scientifique sur les plantes médicinales constitue alors une approche prometteuse, d'une part pour le développement de phytomédicaments accessibles financièrement à ces populations, et d'autre part pour la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives dans le traitement de l'asthme.

Basée sur une approche ethnopharmacologique, notre étude vise, à la lumière des actions biologiques, à rechercher les composés qui seraient responsables des propriétés antiasthmatiques et fournir des preuves expérimentales validant ou invalidant l'utilisation de *W. indica* en médecine traditionnelle contre l'asthme.

6.2. Objectifs de l'étude

6.2.1. Objectif général

W. indica utilisé traditionnellement pour la prise en charge de l'asthme pourrait contenir des principes chimiques possédant des propriétés anti asthmatiques c'est-à-dire bronchodilatatrice et/ou anti inflammatoire et/ou anti allergique. Ainsi, l'objectif général de cette étude était de caractériser *W. indica* sur le plan chimique et pharmacologique en relation avec l'usage traditionnel contre l'asthme.

6.2.2. Objectifs spécifiques

- Vérifier l'usage traditionnel de *W. indica* dans la prise en charge de l'asthme ;
- Déterminer les effets bronchorelaxant et anti inflammatoire sur le plan moléculaire ;
- Evaluer l'effet bronchorelaxant de *W. indica* sur la trachée de rat ;
- Isoler la ou les molécules bioactives de *W. indica* sur la base des effets pharmacologiques ;
- Déterminer la toxicité générale aiguë de *W. indica*.

6.3. Démarche expérimentale

Les données ethnobotaniques recueillies dans la littérature indiquent l'usage de *W. indica* pour la prise en charge traditionnelle de l'asthme. Après avoir confirmé ces données par un entretien avec des tradipraticiens de santé, une recherche bioguidée a été réalisée. Des investigations chimiques à type d'extraction, de purification et de détermination structurale ont été conduites en alternance avec les investigations biologiques de laboratoire. Les études biologiques ont porté sur l'interaction de *W. Indica* avec des enzymes impliquées dans le processus inflammatoire (PLA2 et différents types de LOX) et dans la relaxation du muscle lisse bronchique (PDE4A1 α) et l'étude de l'effet de *W. indica* sur la trachée de rat.

La figure 9 décrit les différentes étapes expérimentales de la recherche bioguidée qui a porté sur les racines de la plante. En outre, une caractérisation *in situ* des groupes chimiques a été réalisée dans différentes parties de la plante notamment les feuilles et les tiges par histochimie. Elle visait à vérifier la présence des principaux groupes de métabolites secondaires dans les parties aériennes de la plante. Enfin, une évaluation de la toxicité

générale aigüe de l'extrait hydro alcoolique des racines de la plante a été réalisée chez la souris par voie intra péritonéale.

La description complète de la technique de caractérisation histochimique et de la méthode d'étude de la toxicité générale aigüe se trouve en annexe.

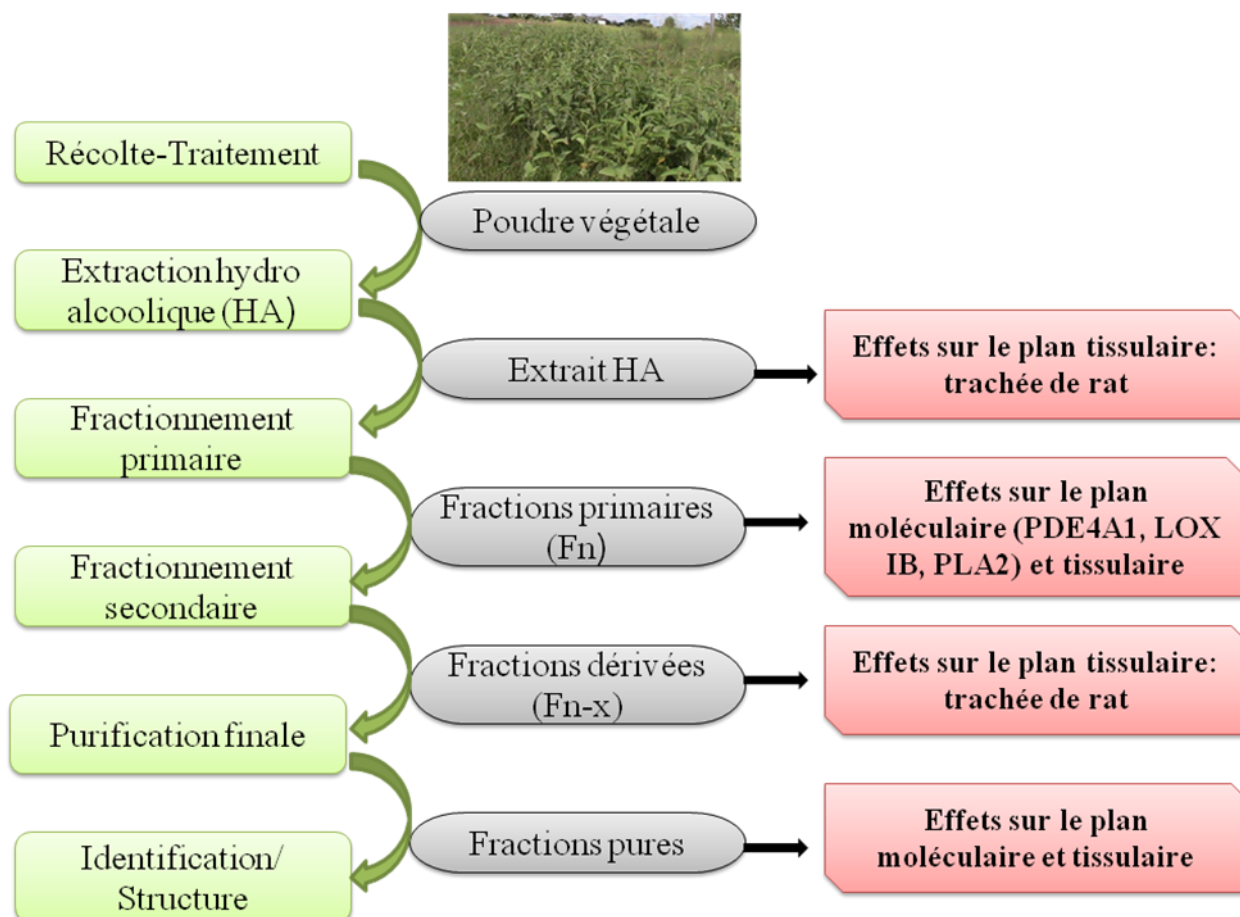


Fig. 9 : Les différentes étapes expérimentales de la recherche bioguidée

Le présent document de thèse présente l'ensemble des travaux réalisés ainsi que les résultats obtenus. Il est subdivisé en trois parties.

La première partie est une revue bibliographique, présentée sous la forme d'un article de publication dans lequel nous développons le potentiel et l'intérêt thérapeutique de *W. indica*.

La deuxième partie est consacrée aux résultats publiés et ceux non publiés. Les résultats publiés portent sur la recherche bioguidée de composés actifs contre l'asthme et l'inflammation. Les résultats non publiés se rapportent aux interviews ethnobotaniques, à une caractérisation histochimique de groupes de métabolites secondaires (technique décrite en

annexe 1), à l'évaluation de l'activité de la plante vis-à-vis de la lipoxygénase de soja type IB (méthode de dosage en annexe 2) et à l'étude de toxicité générale aiguë de l'extrait hydro alcoolique brut de *W. indica* (protocole en annexe 3).

Dans la troisième partie, une discussion générale porte sur l'ensemble des résultats obtenus. En fin de manuscrit, une conclusion générale permet de dresser un bilan des objectifs atteints et présenter quelques perspectives à ce travail de thèse.

**PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE
SUR *WALTHERIA INDICA* L.**

Revue sur *Waltheria indica* syn *W. americana* (Malvaceae): aspects botanique, ethnobotanique, phytochimique et pharmacologique.

Dans cet article review, soumis à *Journal of ethnopharmacology* nous avons collecté à partir de sources variées et analysé les données sur les usages médico-traditionnels, les données botaniques, pharmacologiques et toxicologiques sur *Waltheria indica*. Le but est de fournir d'une part les bases pharmacologiques pouvant justifier ou invalider les différents usages traditionnels et d'autre part, d'identifier les besoins en investigations qui constitueront des perspectives de recherche. Cette review sur *W. indica* montre que la plante possède un potentiel thérapeutique dans la prise en charge de l'inflammation, du paludisme, de certaines infections bactériennes et fongiques et la prévention du stress oxydatif. Toutefois, la plupart des usages traditionnels tels que l'anémie, l'épilepsie, la douleur, l'asthme, la lèpre, la dysentérie, l'ulcère gastrique nécessitent d'être validés ou invalidés par les futures investigations.

Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L.

(*Syn. Waltheria americana*) : a review

F. Zongo^{1,2,*}; C. Ribuot¹; A. Boumendjel³; I. Guissou²

¹Laboratoire HP2 - U1042, Inserm, Grenoble, France, Joseph Fourier University, Grenoble, France;

²Laboratory of Pharmaco-Toxicology, University of Ouagadougou I; ³Department of Medicinal Chemistry, UMR CNRS 5063- Université Joseph Fourier, Grenoble I- France

*Corresponding author:

Frank ZONGO

Université Joseph Fourier – Grenoble I

Faculté de Pharmacie

Laboratoire HP2

INSERM U1042

38706 La Tronche

France

Tel: 04 76 63 71 72

E-mail: frapether@yahoo.fr

Contents

1. Introduction

2. Vernacular names, taxonomy and botanical aspects

2.1. Vernacular names

2.2. Taxonomy

2.3. Botanical aspects

3. Traditional uses

4. Chemical constituents

5. Pharmacological and toxicological reports

5.1. Pharmacological reports

5.2. Toxicological reports

6. Conclusion

Acknowledgements

References

Abbreviations: WCSP, World Checklist of Selected Plant Families; GRIN, Germplasm Resources Information Network; US, United States; NO, Nitric Oxide; TNF, Tumor Necrosis Factor; IL, Interleukin, LPS, Lipopolysaccharide; IFN, Interferon; DMSO, Dimethylsulphoxide; MTT, 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl- formazan; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ; LD, Lethal Dose; LOX, Lipoxidase or lipoxygenase; PDE, Phosphodiesterase; PLA, Phospholipase; COX, Cyclooxygenase; GABA, Gamma-amino butyric acid.

ABSTRACT

Background: *Waltheria indica* L. (*syn. Waltheria americana*) is commonly used in traditional medicine in Africa, South America and Hawaii, mainly against pain, inflammation, conditions of inflammation, diarrhea, dysentery, conjunctivitis, wounds, abscess, epilepsy, convulsions, anemia, erectile dysfunctions, bladder ailments and asthma.

Aim of the review: To provide an up-to-date overview of the botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacological activities and toxicity data of *Waltheria indica*. Additionally, studies providing an evidence for local and traditional uses of *Waltheria indica* are discussed. Further phytochemical and pharmacological potential of this species are suggested for future investigations.

Materials and methods: The information was collected from scientific journals, books, theses and reports via academic libraries and electronic search. These sources include Pubmed, Web of Science, Portal de Portales-Latindex, Science Research.com and Google scholar. These studies about the medical botanical, traditional uses, chemical, pharmacological and toxicological data on *Waltheria indica* were published in English, Portuguese, Spanish, German and French.

Results: Crude extracts and isolated compounds from *Waltheria indica* were investigated and showed analgesic, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antimalarial, anti-anemic, anti-oxidant, sedative and anticonvulsant activities. The phytochemical investigations showed the presence of cyclopeptid alkaloids, flavonoids (e.g., (-)-epicatechin, quercetin, kaempferol, Kaempferol-3-O- β -D-(6'-E-p-coumaryl)-glucopyranoside), tannins, sterols, terpenes, saponins, anthraquinones. Studies of acute toxicity in animal indicated that *Waltheria indica* can be toxic.

Conclusion: *Waltheria indica* possess therapeutic potential in the treatment of inflammation, malaria, infectious diseases (e.g., lungs infection due to *K. pneumoniae*, diarrhea due to *C. albicans* or *E. coli*) and prevention of oxidative stress. Further studies are necessary to explore pure compounds responsible for the pharmacological effects and the mechanisms of action. Further investigations are also needed to provide an evidence base for traditional uses of this species against pain, anemia, convulsions and epilepsy. In addition, there is a pressing need to investigate the other traditional uses such as dysentery, syphilis, erectile dysfunctions and asthma.

Keywords: *Waltheria indica*, *Waltheria Americana*, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antimalarial, alkaloid, flavonoid.

1. Introduction

Waltheria indica L. is a plant growing in many regions of the world. It has been used in traditional medicine for the treatment of several pathologies in Hawaii (Neal, 1965; Abbott and Shimazu, 1985), West Africa (Traoré, 1983); East Africa (Kokwaro, 1976), South Africa (Mathabe, 2006), South America (Dimayuga et al. 1987; Leonard, 2010; Olajuyigbe et al. 2011) and India (Bapuji et al., 2009). Considered as indigenous plant in the Hawaii Islands, *Waltheria indica* has been used to treat asthma, neuralgia and pain (Reginald, 2009; Leonard, 2010). In Burkina Faso, this plant is used in traditional medicine for management of respiratory affections, such as cough and asthma (Nacoulma, 1996). To the best of our knowledge, no previous reviews are available regarding the traditional uses, the phytochemistry and the pharmacological studies of *Waltheria indica*. The aim of this review is to provide an up-to-date and comprehensive overview of the botany, phytochemistry, traditional uses, pharmacological activities and toxicity data of *Waltheria indica*, as it has been performed for many other plants (e.g., Patel et al., 2011; Rokaya et al., 2012). Additionally, we aim to discuss the studies providing an evidence for local and traditional uses of *Waltheria indica* and to suggest the future research opportunities for this plant.

2. Vernacular names, taxonomy and botanical aspects

2.1. Vernacular names

Waltheria indica, is commonly called sleepy morning, monkey bush, velvet leaf, marsh-mallow, boater bush, guimauve (Web 1), “hankufah” in *Hausa* (Traoré, 1983), “kafafi” in *Fulfulde*, “matum kevel” in *Wolof* (Kerharo and Adam, 1974), “yar-yamde” in *moore* (Nacoulma, 1996), “kiaza” or “kerza” in *bissa* (Sita, 1978), “güinar” in Mexico (Rojas et al., 2010), “barulad” in Philippines (Aguilar et al., 2001), “hi’aloo”, “uhaloo” or “kanakaloo” in Hawaii (Scheuer et al. 1962), “Nallabenda” in India (Jain et al., 2009). The Germplasm Resources Information Network (GRIN) of the US Department of Agriculture indicates other Spanish common names: basora prieta, escobillo blanco, malvavisco and hierba del soldado (Web 2).

2.2. Taxonomy

The genus *Waltheria* L includes 60 species (Saunders, 2011). According to the botanical information system of the Missouri Botanical Garden (Tropicos), *Waltheria indica* was reported by Linnaeus in species plantarium by 1753. In their article review of 1975, Fosberg and Sachet, mentioned that *Waltheria indica* and *Waltheria americana* were reported simultaneously. The two species were

combined by Robert Brown under the name “*Waltheria indica* var. *americana*”. Guillemain made the reverse reduction, making “*Waltheria americana* β *indica* Linn.”. Robert Brown proposed the synonymy of *Waltheria indica* var. *indica*; Var. *americana* as a densely hairy form and var. *indica* as a thinly pubescent. *Waltheria indica* presents many local forms distinguishable by other characters, without influencing taxonomic recognition (Fosberg and Sachet, 1975).

Currently, Genus *Waltheria* belongs to the family of *Malvaceae* Juss., Order Malvales Juss. GRIN suggests that *Waltheria indica* could be included in *Sterculiaceae* family. The followings scientific names are accepted: *Waltheria indica* L. by WCSP in review and *Waltheria indica* var. *prostrata* (K. Schum.) M. Gomez by Tropicos. *Waltheria indica* var. *americana* (L.) R. Br. ex Hosaka is considered as a synonymy by Tropicos. Research on this species have been conducted and published mainly under the two Latin names: *Waltheria indica* and *Waltheria americana*.

2.3. Botanical aspects

Waltheria indica (Fig. 1) is a woody plant with a hardy or annual stump. The plant is widespread in subtropical and tropical regions (Saunders, 2007; Païs et al., 1963). For example, among ten species of *Waltheria* identified in Venezuela, *Waltheria indica* L. is the most widely distributed (Baudilio, 2008). *Waltheria indica* grows on disturbed areas, roadside weed, old pastures, cotton fields, rock crevices on top of plains, inundated savannas, riverbanks, forests borders or slopes, impoverished soils, on limestone or basalt rock outcrops (Saunders, 2007). Perennial growth is observed in permanent moist habitat (Web 1).

It is a short-lived shrub reaching approximately 2 m in height and 2 cm in stem diameter. The roots are brown and flexible and have a single, strong stem emerging from the ground. The leaves are densely to sparsely pubescent, tomentose, or velutinous. The limb has 3 to 5 basal ribs and 4 to 5 pair of lateral ribs and axillary inflorescences are usually dense. The plant begins flowering at about 6 months old and blooms more or less continuously until its death. Glomerulus contains yellow to orange flowers and reproduction is insured by seeds (Saunders, 2011; Kerharo and Adam, 1974; Web 1). *Waltheria indica* flowers year-round and the flowers are a source of nectar for bees and wasps and can be useful for pollination in disturbed areas or agro-ecosystems (João and Martins, 1998; 1999).



Fig.1. *Waltheria indica* L. (a) *Waltheria indica* in its natural habitat; (b) population of *Waltheria indica*; (c) roots of *Waltheria indica*

3. Traditional uses

Sometimes, sleepy morning is considered as a weed (Sanchez et al., 1993). However, it is used for the treatment of simple ailments (e.g., sore throat, cough) and complicated ailments (e.g., inflammation, asthma). Table 1 lists the ethnomedical uses of *Waltheria indica*. In Hawaii, the root is chewed to relieve sore throat (Neal, 1965) and in Burkina Faso, it is used to treat gum and teeth disease by *mossi* community (Sita, 1978). *Waltheria indica* is considered to be one of the ten most recognized and locally used in Hawaii as an anti inflammatory for aspirin-like qualities (Saunders, 2007).

Various extracts, decoction or maceration, are used in inflammation (Abott and Shimazu, 1985; Neyres et al., 2009) or conditions of inflammation: rheumatism in Mexico (Dimayuga et al., 1987), gingivitis in Brazil (Garcia et al., 2010), asthma in Hawaii (Judd, 1998; Leonard, 2010) and Burkina Faso (Nacoulma, 1996). *Waltheria indica* is used to treat diarrhea by traditional healers in Nigeria (Zailani et al., 2010), Burkina Faso (Kerharo and Bouquet, 1950), Mexico (Rojas et al., 2010) and Panama (Leonard, 2010).

In addition, it is traditionally used to treat malaria, dysentery, hemorrhoids, cancers, leprosy, epilepsy, syphilis, infertility, erectile dysfunction and impotence. However, the relevant pharmacological bases for these indications are often absent.

Table 1
Traditional uses of *Waltheria indica* L.

Traditional use	Part used	Mode of use	Population or geographic zone	References
<i>Skin disorders</i>				
Wounds	Roots	Unspecified	Unspecified	Kerharo and Adam (1974)
	Roots, branches, Leaves	Decoction, washing the wounds	Mexico	Dimayuga et al. (1987)
	Roots	Decoction, powder	Mali (<i>Dogon</i> community)	Inngjerdingen et al. (2004)
	Leaves	Powder local application	Tanzania (<i>Bunda</i> district)	Maregesi (2007)
Skin eruptions	Roots	Powder	South-eastern Sudan	Musa et al. (2011)
	Unspecified	Decoction	Venezuela, Mexico	Morton (1981)
	Unspecified	Decoction	Central America	Aguilar et al. (2001);
Skin brown spots				
Chloasma and freckles	Whole plant	Extract and other substances	Unspecified	Web 1; Maeyama (2002)
Alopecia areata	Roots	Powder with other plants	Senegal	Kerharo and Adam (1974)
Skin ulcers	Roots, branches, Leaves	Decoction	Mexico	Dimayuga et al. (1987)
Leprosy	Roots	Unspecified	Hawaii	Olajuyigbe et al. (2011)
Abscess	Unspecified	Unspecified	Gambia	Dragendorff (1967)
<i>Body as a whole - general disorders</i>				
Fever	Roots	Unspecified	Unspecified	Kerharo and Adam (1974); Kerharo (1967)
Pain	Roots	Aqueous extract	Nigeria, West Africa	Mohammed et al. (2007); Burkill (2000)
Swelling of body	Roots	Powder	Ethiopia	Flatie et al. (2009)
Inflammation	Roots, stem, leaves	Unspecified	Hawaii	Abbott et al. (1985), Saunders (2007)
	Leaves	Form of tea	Brazil	Neyres et al. (2009)
Rheumatism	Roots, branches, Leaves	Decoction, as tea	Mexico	Dimayuga et al. (1987)
Tiredness	Unspecified	Unspecified	Hawaii	Gbadamosi et al. (2012), web 1
Malaria	Aerial parts	Decoction	Burkina Faso	Jansen et al. (2010)

Table 1 (*continued*)

Traditional use	Part used	Mode of use	Population or geographic zone	References
<i>Vision disorders</i>				
Ophthalmia	Leaves	Juice	Unspecified	Kerharo and Adam (1974)
Desorder unspecified	Roots	Maceration	Burkina Faso (<i>mossi</i> community)	Kerharo and Bouquet (1950)
Conjunctivitis	Leaves	Juice, instilling	Madagascar	Bost (1961) ; Kokwaro (1976)
Night blindness (vitamin A deficiency)	Roots	Maceration (with <i>Piliostigma thonningii</i>), local application	Burkina Faso	Fernandez de la Pradilla (1985)
<i>Central and peripheral nervous system disorders</i>				
Neuralgia	Whole plant	Unspecified	Hawaii	Leonard (2010); Borokini and Omotayo (2012)
Convulsion	Leaves	Decoction	Tanzania	Hedberg et al. (1983)
Epilepsy	Roots	Unspecified	Cayor	Kerharo and Adam (1974)
	Stem	Unspecified	Guinee (<i>Bossou</i> region)	Sugiyama and Koman (1992)
<i>Digestive system disorders</i>				
Gum and teeth diseases	Roots	Decoction and gargling	Burkina Faso	Sita (1978)
		Chewing	(<i>Bissa</i> community)	
		Decoction with roots of <i>Securidaca longepedunculata</i>	Burkina Faso (Mossi community)	Tapsoba and Deschamps (2006)
		Infusion, gargling	Brazil	Garcia et al. (2010)
Gingivitis	Leaves			
Visceral pain	Roots	Unspecified	Unspecified	Kerharo and Adam (1974)
Stomachaches	Roots, branches, Leaves	Decoction	Mexico	Dimayuga et al. (1987)
Gastric ulcer	Leaves	Topical baths (oral route)	Brazil	Neyres et al. (2009)
Laxative (pediatric aid)	Buds	Chewed by mother and given to infants	Hawaii	Moerman (1998)

Table 1 (continued)

Traditional use	Part used	Mode of use	Population or geographic zone	References
<i>Digestive system disorders</i>				
Diarrhea	Whole plant	Maceration	Nigeria	Zailani et al. (2010)
	Roots	Infusion	Mexico	Rojas et al. (2010), Hernández et al. (2009), Torres et al. (2005), Morton (1981)
Infant diarrhea	Unspecified	Decoction	Burkina Faso (<i>mossi</i> community)	Kerharo and Bouquet (1950), Baba-Moussa et al. (1998)
Bleeding diarrhea	Roots	Decoction	Panama	Leonard (2010)
	Leaves	Crushed	Tanzania	Chhabra et al. (1993)
Dysentery	Roots	Decoction	Senegal	Kerharo (1967)
	Roots	Unspecified	Mexico	Leonti et al. (2001)
	Whole plant	Decoction	Afrique du Sud (<i>Limpopo</i> District)	Mathabe et al. (2006)
Hemorrhoids	Stem, roots	Decoction	Nigeria	Hussain and Karatela (1989)
<i>Respiratory system disorders</i>				
Cough	Roots	Decoction, maceration	Tanzania	Kokwaro (1976)
Sore throat	Roots	Decoction, chewing	<i>Mossi</i> community	Nacoulma (1996)
	Roots bark	Chewing	Hawaii	Borokini and Omotayo (2012); Leonard (2010); Wagner et al. (1990); Neal (1965); Moerman (1998)
Asthma	Whole plant	Juice	Hawaii	Leonard (2010); Gbadamosi et al. (2012); Borokini and Omotayo (2012), Judd (1998)
	Roots, whole plant	Decoction, maceration	<i>Mossi</i> community	Nacoulma (1996)
	Buds, leaves	Pounded and mixed with water	Hawaii	Moerman (1998)
	Whole plant	Decoction with other plants	Hawaii	Moerman (1998)
Lung infections	Whole plant	Decoction, Powder	Unspecified	Traoré (1983)
	Whole plant	Juice	Hawaii	Leonard (2010)

Table 1 (continued)

Traditional use	Part used	Mode of use	Population or geographic zone	References
<i>Blood disorders</i>				
Internal hemorrhage	Roots, stem	Aqueous extract	Nigeria (<i>Yorubas</i> community)	Mohammed et al. (2007)
	Roots	Chewing	India	Bapuji et al. (2009)
			Jamaica	Mitchell et al. (2006)
Anemia	Leaves	Infusion	Nigeria	Gbadamosi et al. (2012)
Hemoptysis	Unspecified	Unspecified	Panama	Olajuyigbe et al. (2011); Morton (1981)
^a<i>Cancers</i>				
	Roots, branches, Leaves	Decoction	Mexico	Graham et al. (2000); Dimayuga et al. (1987)
	Unspecified	Unspecified	Dominican Republic	Ososki et al. (2002)
<i>Reproductive disorders</i>				
Syphilis	Roots, stem	Aqueous extract	Nigeria (<i>Yorubas</i> community)	Mohammed et al. (2007)
	Leaves and roots	Juice	Tanzania	Haerdi (1964)
Infertility	Roots, stem	Aqueous extract	Nigeria (<i>Hausas</i> community)	Mohammed et al. (2007)
	Roots	Infusion	Zimbabwe	Gelfand et al. (1985)
Aphrodisiac	Roots, stem	Aqueous extract	Nigeria (<i>Hausas</i> community)	Mohammed et al. (2007)
	Roots	Decoction	Côte d'Ivoire	Adjanohoun and Ake Assi (1979)
Impotence	Roots, stem	Aqueous extract	Nigeria (<i>Hausas</i> community)	Mohammed et al. (2007)
Erectile dysfunction	Roots	Decoction	Côte d'Ivoire	Bekro et al. (2007)
Contraceptive	Roots	Decoction	South Africa	Morton (1981)
<i>Urinary disorders</i>				
Bladder ailments	Leafy stems	Decoction	Cuba	Aguilar et al. (2001); Morton (1981)

^a Cancer type unspecified

4. Chemical constituents

Waltheria indica contains different chemical groups including alkaloids, flavonoids, sterols, terpenes, cardiac glycosides, saponins, anthraquinones and carbohydrates. Loustalot and Pagan (1949) showed the presence of alkaloids in the leaves and roots (Loustalot and Pagan, 1949). Later, Pais et al. (1963, 1968) identified and named them adouetins X, Y, Y1 and Z (Fig. 2) and they were considered among the first cyclopeptid alkaloids reported in plants. Several flavonoids were isolated from *Waltheria indica*, including (-)-epicatechin, tiliroside (Rao et al., 2005), quercetin (Rao et al., 2005; Maheswara et al., 2006) and kaempferol (Petrus, 1990; Maheswara et al., 2006). A rare acylated flavonol glycoside - Kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaryl)-glucopyranoside was isolated from the whole plant (Maheswara et al., 2006).

It is noteworthy that the occurrence of the chemical groups mentioned above was described in all parts of *Waltheria indica* by using specific chemical reactions. However, the isolated pure compounds were mostly obtained by extraction of the whole plant, except for 5,2',5'-trihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone and 5,2'-dihydroxy-3,7,4',5'-tetramethoxyflavone that were isolated from leaves of *Waltheria indica*. More details about the occurrence, the chemical group and pure compounds isolated from *Waltheria indica* are shown in Table 2.

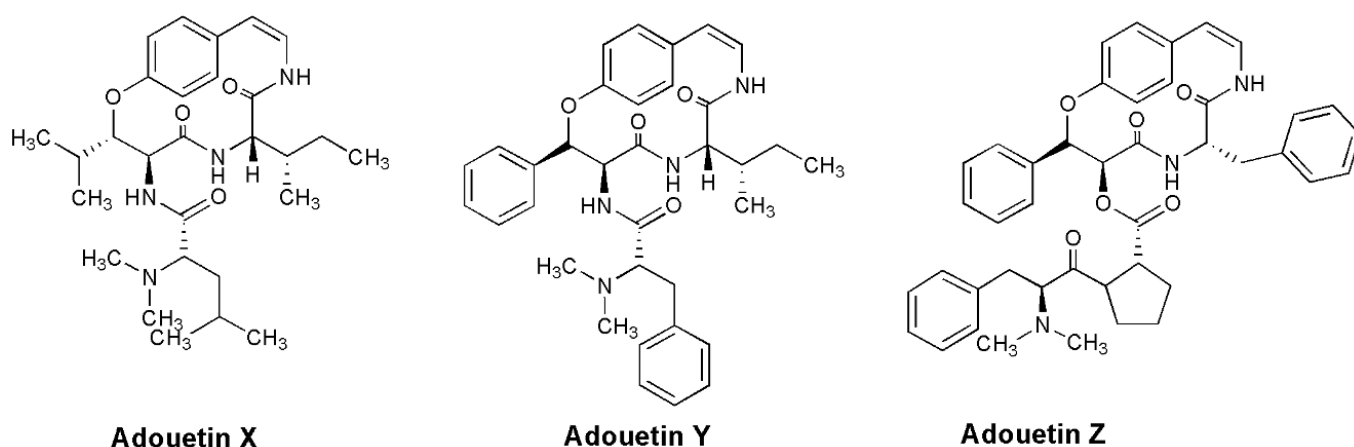


Fig.2. Chemical structures of cyclopeptid alkaloids isolated from *Waltheria indica*

Table 2

Chemical groups identified and compounds isolated from *W. indica* L.

Phytochemicals	Part of plant	References
Alkaloids	Leaves	Borokini and Omotayo (2012) ; Zailani et al. (2010)
	Leaves, stem, roots	Mohammed et al. (2007); Olajuyigbe et al. (2011)
	Leaves, flowers, bark	Scheuer et al. (1962)
Adouetins X, Y, Y1, Z	Whole plant	Pais et al. (1963, 1968)
Flavonoids	Leaves, stem, roots	Mohammed et al. (2007) ; Olajuyigbe et al. (2011)
	Leaves	Watt and Breyer-Brandwijk (1962)
(-)-Epicatechine	Leaves	Borokini and Omotayo (2012)
Tiliroside	Whole plant	Rao et al. (2005)
Quercetin	Whole plant	Rao et al. (2005), Maheswara et al. (2006)
Kaempferol	Aerial parts	Petrus (1990)
	Whole plant	Maheswara et al. (2006)
quercetin 3-O-	Whole plant	Maheswara et al. (2006)
glucopyranoside		
Kaempferol-3-O-	Aerial parts	Petrus (1990)
galactoside		
Kaempferol-3-O- β -D-(6''-	Whole plant	Maheswara et al. (2006)
E-p-coumaryl)-		
glucopyranoside		
Kaempferol-3-O- α -L-	Whole plant	Maheswara et al. (2006)
rhamnoside		
Kaempferol-3-O- β -D	Whole plant	Maheswara et al. (2006)
glucopyranoside		
Herbacetin	Aerial parts	Petrus (1990)
Herbacetin-8-O-	Aerial parts	Petrus (1990)
glucuronide		
Gossypetin	Aerial parts	Petrus (1990)
Gossypetin-8-glucuronide	Aerial parts	Petrus (1990)
2''-O-Glucosylvitexin	Aerial parts	Petrus (1990)
5,2',5'-trihydroxy-3,7,4'-	Leaves	Ragasa et al. (1997)
trimethoxyflavone		
5,2'-dihydroxy-3,7,4',5'-	Leaves	Ragasa et al. (1997)
tetramethoxyflavone		

Table 2 (continued)

Chemical groups identified and compounds isolated from *W. indica* L.

Phytochemicals	Part of plant	References
<i>Caffeic acid</i>	Aerial parts	Petrus (1990)
<i>Tanins</i>	Leaves, stem, roots	Mohammed et al. (2007) ; Zailani et al. (2010);
	Leaves	Olajuyigbe et al. (2011)
		Borokini and Omotayo (2012)
<i>Sterols</i>	Leaves, stem, roots	Mohammed et al. (2007) ; Zailani et al. (2010)
	Leaves	Borokini and Omotayo (2012)
<i>Terpenes</i>	Leaves	Zailani et al. (2010) ; Borokini and Omotayo (2012)
<i>Cardiac glycosides</i>	Leaves	Gbadamosi et al. (2012)
	Leaves, stem, roots	Zailani et al. (2010) ; Olajuyigbe et al. (2011)
<i>Saponines</i>	Leaves	Gbadamosi et al. (2012)
	Leaves, stem, roots	Mohammed et al. (2007) ; Olajuyigbe et al. (2011)
	Roots	Oladiji et al. (2005)
<i>Anthraquinones</i>	Leaves	Olajuyigbe et al. (2011) ; Gbadamosi et al. (2012)
<i>Carbohydrates</i>	Leaves, stem, roots	Dalziel (1937); Mohammed et al. (2007)
<i>Mucilage</i>	Whole plant	Dalziel (1937)

5. Pharmacological and toxicological reports

5.1. Pharmacological reports

The literature survey reveals that *Waltheria indica* was investigated in different pharmacological areas, including analgesia, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antidiarrheal, antimalarial, antiviral, anticonvulsant, anti-anemic and anti-oxidant activities. Table 3 lists the available pharmacological studies with detailed conditions.

Table 3
Pharmacological investigations of *Waltheria indica*

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Analgesic activity	Leaves, stem, root Maceration in water (24h)	Acid acetic-induced writhes in Swiss-albino mice	Leaves: 50 and 100 mg/Kg body weight, oral route Stem: 25 and 100 mg/Kg body weight, oral route Root: 10 and 25 mg/Kg body weight, oral route	Negative Control: distilled water, oral route Positive control: aspirin 150 mg/Kg body weight, oral route	% inhibition Leaves extract: 33.3 (50mg/Kg) and 35.5 (100mg/Kg) Stem extract: 55.2 (25mg/Kg) and 54.7 (50mg/Kg) Root extract: 70.8 (10mg/Kg) and 86.3 (25mg/Kg)	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Mohammed et al. (2007)
	Aqueous ethanol extract from aerial parts, partitioned with petroleum ether, n-butanol, acetone and ethyl acetate	Acid acetic-induced writhes in albino mice	n.r.	n.r	Protection (%) against acetic acid induced-writhes for different fractions Ethyl acetate: 69 ; n-butanol: 54 ; acetone: 50 and aqueous residue : 38	Inconclusive evidence base.	Hamidu et al., 2008)
Anti-inflammatory activity	Ethanol (50%) whole plant extract, maceration for 10 days	Carrageenan induced inflammation (edema) in albino rats	1000 mg/kg body weight, oral route	Negative control: distilled water. Positive control: phenyl butazone 100mg/kg weight	Inhibition of edema was 64 % and 60% at the first and the second phase of carrageenan inflammation respectively	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Vedavathy and Rao (1995)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Anti-inflammatory activity	Three flavonoids isolated from whole plant : (-)-epicatechin, quercetin and tiliroside	lipopolysaccharide (LPS) and interferon (IFN) activated murine peritoneal macrophages <i>in vitro</i> . Measurement of NO production by Griess reaction; TNF- α and IL-12 by ELISA	(-)-epicatechin: 25 to 100 μ M Quercetin: 2.5 to 12.5 μ M Tiliroside: 20 to 50 μ M	Control cells treated by DMSO without to exceed 0.1% (v/v)	Inhibition of NO and cytokines production was evident for 12.5 μ M of quercetin, 50 μ M of tiliroside and 200 μ M of (-)-epicatechin:	dose-dependent study Positive evidence base	Rao et al. (2005)
Effect on central nervous system	Adouetin Z isolated from <i>Waltheria indica</i>	Shaking cage method in mice	One dose of adouetin Z tested: 10mg/Kg body weight, intra-peritoneal route	n.r.	Sedative effect : reduction of spontaneous motor activity, prostration, dizziness augmented	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base	Blanpin et al. (1963)
	Aqueous ethanol extract from aerial parts, partitioned with petroleum ether, n-butanol, acetone and ethyl acetate.	Amylobarbitone sodium sleeping time in mice; Elevated plus maze test in mice (exploratory activities); Pentylentetrazole (leptazol)-induced convulsion in mice; Strychnine –induced convulsion	100 and 200 mg/kg body weight, intra-peritoneal route	Negative control: vehicle; Positive control: chlorpromazine (1mg/kg) for Elevated plus maze test. Statistical analysis : student t-test vs vehicle control	Ethyl acetate fractions significantly increased the sleeping time of Amylobarbitone (p<0.05) and significantly decrease exploratory activities (p<0.05) Extract at doses, 100 and 200 mg/kg, reduced the duration of convulsion (p<0.05) and protected the mice from death due to leptazol seizures.	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base	Hamidu et al., (2008)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antibacterial activity	n-hexane shoot extract	Liquid dilution method Species: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,	n.r.	Positive control: ampicillin rifampicin	<i>B. cereus</i> MIC: 500 µg/mL (1 µg/mL for ampicillin) MBC: 1000 µg/mL <i>S. aureus</i> MIC: 1000 µg/mL (0.1. µg/mL for ampicillin and rifampicin) MBC: >1000 µg/mL MIC and MBC were above 1000 µg/mL for <i>K. pneumoniae</i>	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Maregesi et al. (2008)
	Distilled water leaves, stem and root extracts (overnight)	Diffusion method on Agar plate Species: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i>	n.r.	Negative control: distilled water Positive control: not recorded	Diameter of inhibition zone Distilled water: 4 mm Leaves: 14 mm (<i>E.coli</i>), 10 mm (<i>P. aeruginosa</i>), 12 mm (<i>S. typhi</i>) Stem : 10 mm (<i>E.coli</i>), 10 mm (<i>P. aeruginosa</i>), 8 mm (<i>S. typhi</i>) Root: 11 mm (<i>E.coli</i>), 12 mm (<i>P. aeruginosa</i>), 10 (<i>S. typhi</i>)	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Zailani et al. (2010)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antibacterial activity	95% ethanol leaves, stem and root extracts (48h)	Diffusion method on Agar plate Species: <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus morganella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus aerogenes</i> , <i>Enterococcus intermedius</i> , <i>Klebsiella edwardskii</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .	One dose tested: 40 mg/mL	Positive control: Ciprofloxacin 5 µg	Diameter of inhibition zone Ciprofloxacin: 18 to 27 mm Root extract: 10 to 20 mm Stem extract: 10 to 14 mm Leaves extract: 10 to 13 mm	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Olajuyigbe et al. (2011)
	^a Flavonoids isolated A, B, C, D, E and F	Diffusion method on Agar plate Species: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	500 ppm ; 5 mm of filter paper disks was impregnated with compound	Positive control: Tetracycline Gentamycine	Diameter of inhibition zone <i>S. aureus</i> Tetracycline, 14-18 mm A-D-E, 11-13 mm B-C-F, 8-10 mm <i>E. coli</i> Gentamycine, 14-18 mm A-B-C-E, 11-13 mm D, 8-10 mm F, 5-7 mm	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Maheswara et al., 2006

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antibacterial activity	ethanol branches extract, maceration, 8 days	Diffusion method on Peptone Agar plate (15-20% Agar, pH 7.0-7.4) Species: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	7 mm of filter paper disks was impregnated with 140 µL of each solution at 20mg/mL	Negative control: disks impregnated with evaporated ethanol Positive control: Chloramphenicol and Nalidixic acid for 30 µg/disk Erythromycin for 15 µg/disk	with <i>Waltheria indica</i> , inhibition was observed only against <i>S. aureus</i> Inhibition zone: 10-15 mm. Inhibition zone with <i>Lippia formosa</i> (Verbenaceae) > 20 mm	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Dimayuga et al.(1991)
	Ethanol leaves and stem extracts, Obtained by percolation, 7 days n-hexane from ethanol extract filtrate by liquid-liquid extraction	Diffusion method on Agar plate Species: <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococci</i> , <i>Salmonella typhi</i>	5 mm of filter paper disks was impregnated with solution at various concentration: 400-500-600-700 µg/cm ³	Negative control: Disks impregnated with evaporated n-hexane or ethanol Positive control not recorded	Inhibition zone for 700 µg/cm ³ : Ethanol stem extract: <i>E. coli</i> (25 mm); <i>B. subtilis</i> (25 mm); <i>Streptococci</i> (26 mm); <i>S. typhi</i> (22 mm). Ethanol leaves extract : <i>E. coli</i> (13 mm); <i>B. subtilis</i> (21 mm); <i>Streptococci</i> (15 mm); <i>S. typhi</i> (17 mm).	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Garba et al. (2012)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antibacterial activity	Water, methanol, ethanol and acetone root extracts (48h)	Diffusion method on Agar plate Micro plate broth dilution assay for MIC and MBC determination Species: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus viridians</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Salmonella spp.</i>	Diffusion method on Agar plate: 5-10-20 mg/mL MIC and MBC assay: serial dilution	Negative control: DMSO Positive control: Streptomycin sulphate	Lowest MIC values were observed with methanol extract: 0.65 mg/mL against <i>K. pneumoniae</i> ; 0.52 mg/mL against <i>B. cereus</i> ; and ethanol extract: 1.04 mg/mL against <i>K. pneumoniae</i> ; 0.65 mg/mL against <i>B. cereus</i> ; 1.04 mg/mL against <i>E. faecalis</i> . MIC for streptomycin: 0.01 to 0.04 mg/mL according to the bacterial strain. Lowest MBC were observed with methanol extract: 0.65 mg/mL against <i>B. cereus</i> ; and ethanol extract: 2.08 mg/mmL against <i>P. vulgaris</i> and <i>B. cereus</i> . MBC for Streptomycin: 0.02 to 0.05 mg/mL according to the bacterial strain	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Mongalo et al. (2012)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antifungal activity	ethanol branches extract, maceration, 8 days	Diffusion method on Peptone Agar plate (15-20% Agar, pH 7.0-7.4) Species: <i>Candida albicans</i>	7 mm of filter paper disks was impregnated with 140 µL of each solution at 20mg/mL	Negative control: disks with evaporated ethanol	Extract: No inhibition was observed with <i>Waltheria indica</i>	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Dimayuga et al.(1991)
	Ethanol leaves and stem extracts, Obtained by percolation, 7 days n-hexane from ethanol extract filtrate by liquid-liquid extraction	Diffusion method on Agar plate <i>Aspegillus niger, A. flavus, Candida albicans</i>	5 mm of filter paper disks was impregnated with solution at various concentration: 400-500-600-700 µg/cm ³	Negative control: Disks impregnated with evaporated n-hexane or ethanol Positive control not recorded	Inhibition zone for 700 µg/cm ³ : <i>C. albicans</i> Hexane Leaves extract: 21 mm. Hexane stem extract: 15 mm Ethanol leaves and stem extracts were found to be inactive against <i>C. albicans</i> <i>A. niger</i> Ethanol leaves extract: 18 mm Hexane leave extract: 16 mm Ethanol stem extract: 9 mm Hexane stem extract: 16 mm	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Garba et al. (2012)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antifungal activity	Chloroform leaves extract, soxhlet, 24h	Sabouraud dextrose agar medium was mixed with extract and fungal suspension Species: <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Tested dose: 0.5 mL of extract	Negative control: chloroform	Extract inhibited the growth of <i>C. albicans</i> and <i>A. niger</i>	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Almagboul et al. (1988)
	Compound 1: 5,2',5'-trihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone	Diffusion method on Peptone Agar plate. Wells were made on the plate to put the compound, the negative control and the positive control.	Dose range tested : 20, 25 and 30µg/well	Negative control: acetone Positive control: clotrimazole 30 µg/well	Compound 1 was active against <i>C. albicans</i> with antimicrobial index (AI) of 0.2, 0.5 and 2.0 at doses of 20, 25 and 30 µg/well respectively. Its activity was the same than clotrimazole at 30 µg/well against this microbe.	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Ragasa et al. (1997)
	Compound 2: 5,2'-dihydroxy-3,7,4',5'-tetramethoxyflavone n-hexane shoot extract	Liquid dilution method Species: <i>Candida albicans</i>	n.r.	Positive control: flucytosine	MIC = 1000 µg/mL (0.06 µg/mL for flucytosine) MFC: >1000 µg/mL	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Maregesi et al. (2008)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antimalarial activity	Dichloromethane/methanol (1:1) and water whole plant extracts	<i>in vitro</i> antiplasmodial activity method based on the measurement of parasite lactate dehydrogenase (pLDH) activity. IC ₅₀ < 10 µg/mL was classified as promising activity Species: chloroquine –sensitive strain (D10) of <i>Plasmodium falciparum</i>	100 to 0.2 µg/mL	Negative control: DMSO	IC ₅₀ > 100 µg/mL	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Clarkson et al. (2004)
	Dichloromethane, methanol, water roots and aerial parts extracts	<i>in vitro</i> antiplasmodial activity method based on the measurement of parasite lactate dehydrogenase (pLDH) activity Species: chloroquine-sensitive strain <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	100 to 0.8 µg/mL	Negative control: DMSO Positive controls: artemisinin, chloroquine	Dichloromethane extract (IC ₅₀ = 33.73 µg/mL) was more active than the methanol extract (57.21 µg/mL) and water extract (> 100 µg/mL) 15 µg/ml < IC ₅₀ < 50 µg/ml was classified antiplasmodial moderate activity	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Jansen et al. (2010)
	80% methanol shoot extract	Measurement of pLDH activity of chloroquine-sensitive strain – <i>Plasmodium falciparum</i> K1	n.r.	DMSO and Chloroquine controls	Plant extract: IC ₅₀ = 125-250 µg/mL Chloroquine control: 0.18 ± 0.03 µM	Positive evidence base	Maregesi et al. (2010)

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Antidiarrheal activity	Hexane, chloroform, methanol, water whole plant extracts (4h)	Cathartic agent (castor oil) induced diarrhea in CD1 strain male mice	50 and 100 mg/Kg <i>per os</i> of each extract	Positive control: diphenoxylate (2.5 mg/Kg)	Significant inhibition of number of feces and diarrheic feces was not found	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Zavala et al. (1998)
Antiviral activity	n-hexane shoot extract	Method of 50% end point titration technique Species: <i>Herpes simplex Virus type 1 (HSV-1)</i> , <i>Vesicular Stomatitis Virus (VSV) T2</i> , <i>Semliki forest A7 (SFA7)</i> , <i>Coxsackie B2</i>	n.r.	Positive control for <i>HSV-1</i> : Acyclovir	<i>Waltheria indica</i> showed no activity against tested viruses (RF < 10) RF = 10 ⁴ for Acyclovir	dose-dependent study; Negative evidence base.	Maregesi et al. (2008)
	Water and methanol branch extracts	Recombinant HIV-1 protease activity was measured by cleavage of a synthetic substrate	n.r.	n.r.	Inhibition of HIV-1 protease was observed	Inconclusive evidence base	Miyashiro et al. (1994) ^b

Table 3 (continued)

Activity investigated	Tested material	Model used	Tested doses and mode of administration	Controls	Minimal concentration active and others results	Experimental evidence assessment	Reference
Anti-anemic activity	Water root extract (Boiling for 5 min)	Albino rats maintained for 6 weeks on iron sufficient diet or iron deficient diet received extract for seven days. Serum and tissue homogenate (liver and kidneys) were used to estimate hematological parameters.	0.39 and 0.78 mg/Kg body weight of extract	Negative control: Group of rats receiving distilled water	Compared with the control, extract significantly increases liver-body weight rate, hemoglobin concentration, packed cell volume, red blood cells and mean corpuscular hemoglobin.	Not dose-dependent study; Inconclusive evidence base.	Oladiji et al. (2005)
Anti oxidant activity	Ethanol leaves and stem extracts, Obtained by percolation, 7 days n-hexane from ethanol extract filtrate by liquid-liquid extraction	DPPH free-radical scavenging activity	0.25-0.5-1.0 mg/cm ³ Extracts were dissolved in ethanol.	Negative control: Ethanol Positive control: Ascorbic acid α -tocopherol; Concentration not recorded.	n-hexane leaves extract (1.0 mg/cm ³) showed a higher potency than ascorbic acid and α -tocopherol % inhibition Hexane leaves extract: 92.8 ascorbic acid: 90.2 α -tocopherol: 15.4	Dose-dependent study; Positive evidence base.	Garba et al. (2012)

^a A : Kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaryl)- glucopyranoside ; B : quercetin 3-O-glucopyranoside ; C : Kaempferol-3-O- α -L- rhamnoside ; D : Kaempferol-3-O- β -D glucopyranoside, E : Quercetin, F : Kaempferol. ^b meetings abstract

n.r.: not recorded; i.p.: intraperitoneal MIC: minimum inhibitory concentration (the lowest concentration that completely inhibited macroscopic growth of the microorganism); MBC: minimum bactericidal concentration (the lowest concentration showing no bacteria growth); MFC: minimum fungicidal concentration; RF: reduction factor (the ratio of the virus titer in the absence and the presence of the maximal non-toxic dose of the extract).

5.1.1. Analgesic and anti-inflammatory activities

The aqueous root extract showed analgesic activity in mice (86.3% at 25 mg/Kg body weight) (Mohammed et al., 2007). However, the number of tested doses is not sufficient to highlight properly a dose-dependent effect. Hamidu et al. (2008) shown that the ethyl acetate fraction provided the highest protection (69%) against the acetic acid induced-writhes, compared to n-butanol fraction (54%) and acetone fraction (50%). Owing to a lack of tested doses and negative control, it is difficult to draw conclusions from this later study. Further investigations are needed to provide an evidence for traditional use against pain.

Vedavathy and Rao (1995) reported that the hydro alcoholic extract (1g/Kg) induces an inhibition of edema in rat comparable to phenyl butazone action (0.1g/Kg) at the second phase of carrageenan inflammation. Flavonoid derivatives from *Waltheria indica* were evaluated *in vitro* and showed that tiliroside, (-)-epicatechin and quercetin induced a dose-dependent inhibition of the production of the inflammatory mediators, including nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF α) and interleukin (IL)-12 (Rao et al., 2005). Taken together, these results are in favor of the traditional use of *Waltheria indica* against inflammation. The evaluation of fractions and pure compounds on the activity and genes expression of enzymes involved in inflammatory processes (PLA₂, COX and LOX) could be useful.

5.1.2. Antidiarrheal and antibacterial activities

The investigation of different extracts from *Waltheria indica* against diarrhea symptoms did not provide significant inhibition of number of feces and diarrheic feces in mice at 50 and 100 mg/Kg (oral route) (Zavala et al. 1998). High doses of extracts could have been tested to ascertain or not the pharmacological response.

Recently, a series of *in vitro* studies were reported regarding the antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts from *Waltheria indica* (Mongalo et al., 2012; Garba et al., 2012; Olajuyigbe et al., 2011; Zailani et al., 2010; Dimayuga et al., 1991).

Garba et al. (2012) reported a zone of inhibition diameter of 25 mm and 22 mm toward *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* respectively (sometimes responsible for diarrhea in humans). Monagalo et al. (2012) found a MIC of 0.65 and 1.04 mg/mL against *Klebsiella pneumoniae* respectively for methanol and ethanol roots extracts. Used as a control, streptomycin exhibited a MIC of (0.01 mg/mL). These results are in favor of the use of *Waltheria indica* to treat some lungs infections that can be caused by *K. pneumoniae*.

Moreover, the traditional uses against conjunctivitis could be validated by investigation of the antibacterial activity of *Waltheria indica* against intracellular bacteria such as *Chlamydiae* and *Mycoplasma*, known to be involved in conjunctivitis.

Except for the reports of Garba et al. (2012) and Mongalo et al. (2012), mentioned above, the other studies don't provide evidences for traditional medicines against bacterial infections. Indeed, a dose-dependent study was not performed, making it difficult to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Therefore, the antibacterial activity of *Waltheria indica* cannot be compared objectively with modern antibiotics.

The possible mechanisms explaining the antibacterial activity deserve to be investigated and could deal with the precipitation of bacterial nutritional proteins by tannins, inhibition of wall glycoprotein, proteins or deoxyribonucleic acid synthesis by other active substances.

5.1.3. Antifungal activity

A series of studies on the antifungal activity of *Waltheria indica* have been reported (Almagboul et al., 1988; Dimayuga et al., 1991; Ragasa et al., 1997; Maregesi et al., 2008; Garba et al., 2012). 5,2',5'-Trihydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone, a flavonoid isolated from *Waltheria indica* exhibited a dose-dependent inhibition of *Candida albicans* (sometimes responsible for diarrhea in humans) (Ragasa et al., 1997). Although, no mention from the above studies about the mechanism of action, fungus membrane permeabilization can support the antifungal activity of *Waltheria indica* extracts.

5.1.4. Antiviral activity

Miyashiro et al. (1994) investigated the activity of the aqueous and methanol extracts of several tropical plants against retrovirus HIV-1 virus. It was shown that extracts from branch of *Waltheria indica* had significant inhibition effect on HIV-1 protease (Miyashiro et al., 1994). The lack of the tested doses and the negative control make it difficult to conclude about the antiviral activity of *Waltheria indica*.

In recent studies, Maregesi et al. (2008, 2010) reported that water-methanol shoot extract of *Waltheria indica* inhibited HIV 1 (strain IIIb) and HIV 2 (strain ROD) with an IC₅₀ of 36 µg/mL (HIV-1) and > 125 µg/mL (HIV-2). In this study, Azidothymidine was used as a control and exhibited an IC₅₀ of 0.0015 and 0.00061 µg/mL for HIV 1 and HIV 2 respectively. The evaluation of *Waltheria indica* extracts on other virus, including *Herpes simplex Virus type 1 (HSV-1)*, *Vesicular Stomatitis Virus (VSV) T2*, *Semliki forest A7 (SFA7)* and *Coxsackie B2* did not reveal significant activity.

5.1.5. Antimalarial activity

Water and dichloromethane:methanol (1:1) extracts from the whole plant were investigated on antiplasmodial activity and were found poorly active (Clarkson et al., 2004). However, dichloromethane extract from roots and aerial parts of *Waltheria indica* was found to exhibit a moderate antiplasmodial

activity (Jansen et al., 2010). In an independent study, Maregesi et al. (2010) reported an IC₅₀ of water-methanol (80%) shoot extract ranging from 125 to 250 µg/mL.

Antiplasmodial properties studies used a model based on the measurement of parasite lactate dehydrogenase (pLDH). *Plasmodium falciparum* chloroquine-sensitive strains were used to perform these tests. pLDH is an oxydoreductase enzyme that catalyzes the conversion of pyruvate to lactate. It is an essential *Plasmodium* protein for energy production and parasites survival during erythrocytic stages where a functional Krebs cycle is lacking (Sessions et al., 1997; Chaikuad et al., 2005). Compounds that control negatively its function also kill the parasite and can represent a target for new therapeutic agents against malaria.

In light of the obtained results, it is worthy to investigate the antiplasmodial activity of pure compounds for further characterization of the antimalarial activity.

5.1.6. Effect on central nervous system

Blanpin et al. (1963) investigated the properties of the cyclopeptid, adouetin Z isolated from *Waltheria indica* on central nervous systems. Adouetin Z showed sedative effect in mice with reduction of spontaneous motor activity. More recently, Hamidu et al. (2008) found that aqueous ethanol extract blocked leptazole-induced convulsion, potentiated amylobarbitone sleeping time and decreased exploratory activity, indicating an anticonvulsant and sedative actions. However, in both studies, the absence of dose range and/or positive control used suggest that more pharmacological data is needed in order to validate or invalidate the traditional use of *Waltheria indica* against epilepsy and convulsions.

5.1.7. Antioxidant activity

In a very recent study, Garba et al. (2012) reported that hexane extract from leaves of *Waltheria indica* (1.0 mg/mL) exhibited higher antioxidant activity (92.8%) than ascorbic acid (90.2%) and α -tocopherol (15.4%). The antioxidant activity could be attributed to phenolic compounds such as flavonoids and tannins present in *Waltheria indica* that act as free radicals scavengers. The antioxidant activity could be of therapeutic potential in preventing oxidative stress involved in the development of many diseases such as cardiovascular and neurological disorders.

5.2. Toxicological reports

The acute toxicity studies showed that *Waltheria indica* should be used with caution. Dhar et al. (1972) studied extracts from the entire plant and reported a LD₅₀ of 500 mg/kg body weight in mice (intra-peritoneal administration). Mohammed et al. (2007) investigated the toxicity of *Waltheria indica*

by using the method of Lorke and showed that the aqueous extracts had an intra-peritoneal LD₅₀ of 363 mg/kg, 141 mg/kg and 69 mg/kg body weight in mice for the leaves, stem and root respectively. Hamidu et al. (2008) found an intra-peritoneal LD₅₀ of 875 mg/kg body weight in mice for aqueous ethanol extract from aerial parts of *Waltheria indica*.

The toxicity of the cyclopeptid alkaloid, adouetin Z sulfonate was evaluated and showed an intra-peritoneal LD₅₀ of 52.5 mg/mL in mice and a minimal lethal dose of 75 mg/mL (Blanpin et al., 1963). However, the aqueous extract of leaves showed a minimum toxic concentration of 5000 ppm against miracidia of *Shistosoma mansoni* (Elsheikh et al., 1990).

No toxicity was observed by MTT assay with flavonoids (tiliroside, quercetin, (-)-epicatechin) isolated from the plant and tested at doses of 2.5 to 100 µM (Rao et al., 2005). Toxicological investigations did not provide specific toxicity data, i.e, the organs affected and consequences on biological parameters.

Up to date, no relevant information was reported on the adverse effects or toxicity resulting from uses of *Waltheria indica* in humans except cautions about its use during pregnancy (Leonard, 2010).

6. Conclusion

This review shows that *Waltheria indica* is a medicinal plant used in several ethnomedical treatments, mainly for pain: inflammation, conditions of inflammation (e.g., rheumatism, gingivitis, neuralgia and sore throat), diarrhea, dysentery, conjunctivitis, wounds, cough, asthma, malaria, syphilis, anemia, hemoptysis, cancers, gastric ulcer, infertility and erectile dysfunction. *Waltheria indica* contains alkaloids, flavonoids, sterols, terpenes, cardiac glycosides, saponins, anthraquinones, carbohydrates and mucilages. The frequently occurring chemical constituents of *Waltheria indica* belong to flavonoids. A rare acylated flavonol glycoside, Kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaryl)-glucopyranoside was isolated from the whole plant. Four cyclopeptid alkaloids were isolated and identified (adouetin X, Y, Y1 and Z). Studies of acute toxicity in mice showed that *Waltheria indica* can be toxic. However, there is no available report regarding the evaluation of the toxicity of *Waltheria indica* in human.

The pharmacological studies performed on *Waltheria indica* revealed therapeutic potential in the treatment of inflammation, malaria, infectious diseases (e.g., diarrhea due to *C. albicans*, *S. typhi* or *E. coli*) and prevention of oxidative stress. Further investigations are needed to provide more evidence bases for traditional uses of this species against pain, anemia and epilepsy. In addition, there is a pressing need to investigate and to validate or invalidate the ethnomedical treatments in asthma, dysentery, leprosy, syphilis, night blindness, hemoptysis, internal hemorrhage, hemorrhoids, gastric ulcer, bladder ailments, infertility and erectile dysfunctions.

Acknowledgements

The authors are thankful to François KABORE (Georgetown University) and Jean Paul OUEDRAOGO (Leiden University) for their useful comments on the previous version of the manuscript. We are also grateful to the France consulate at Burkina Faso for financial assistance (François GAUDEAU, Annick GIRAUDEAU).

References

- Abbott, I.A., Shimazu, C., 1985. The geographic origin of the plants most commonly used for Medicine by Hawaiians. *Journal of Ethnopharmacology*. 14, 213-222.
- Aguilar, N.O., van Valkenburg, J.L.C.H., 2001. *Waltheria indica* L., In: van Valkenburg, J.L.C.H., Bunyapraphatsara, N. (Eds), *Plant Resources of South-East Asia 12: Medicinal and poisonous plants 2*. Backhuys Publisher, Leiden, pp. 585-587.
- Adjanohoun, E., Ake Assi, L., 1979. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre National Floristique, Abidjan.
- Almagboul, A.Z., Bashir, A.K., Karim, A., Salih, M., Farouk, A., Khalid, S.A., 1988. Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antifungal activity (VI). *Fitoterapia*. 59, 393-396.
- Bapuji, J.L., Ratnam, V.S., 2009. Traditional uses of some medicinal plants by tribals of Gangaraju Madugula Mandal of Visakhapatnam District, Andhra Pradesh. *Ethnobotanical Leaflets*. 13, 388-398.
- Baudilio, J., 2008. Revision taxonomica del género *Waltheria* L. (Sterculiaceae) en Venezuela. *ERNSTIA*. 18, 7-36.
- Bekro, Y-A., Mamyrbekova Bekro, J.A., Boua, B.B., Fézan, H., Éhilé, E.E., 2007. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences & Nature*. 4, 217-225.
- Burkill, H.M., 2000. The useful plants of west tropical Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Bost, R., 1961. Pharmacopée Malgache. Mémoire de l'Institut scientifique de Madagascar, série B, Tome 10. 2, 159 – 234.
- Baba-Moussa, F., Nacoulma, O., Ouattara, A., Nguyen, H.P., Akpagana, K., Bouchet, P., 1998. Activité antibactérienne des extraits aqueux totaux de *Combretum micranthum*, *Lawsonia inermis* et *Waltheria indica* plantes de la pharmacopée Ouest Africaine. *Revue de Médecines et Pharmacopées Africaines*. 11, 197—203.
- Borokini, T.I., Omotayo, F.O., 2012. Phytochemical and ethnobotanical study of some selected medicinal plants from Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6, 1106-1118.
- Blanpin, O., Pais, M., Quevauviller, M.A., 1963. Pharmacodynamic study of adouetin Z, alkaloid of *Waltheria americana* L. (Sterculiaceae). *Annales Pharmaceutiques Française*. 21, 147-50.
- Chhabra, S.C., Mahunnah, R.L.A., Mshiu, E.N., 1993. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania, VI. Angiosperms (Sapotaceae to Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 39, 83-103.

- Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. 92, 177-191.
- Chaikuad, A., Fairweather, V., Connors, R., Tim, J-H., Turgut-Balik, D., Brady, R.L., 2005. Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH. *Biochemistry*. 44, 16221-16228.
- Dimayuga, R.E., Murillo, R.F., Pantoja, M.L., 1987. Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico) II. *Journal of Ethnopharmacology*. 20, 209-222.
- Dragendorff, G., 1967. *Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten*. Werner Fritsch, München.
- Dalziel, J.M., 1937. *The useful plants of West Africa*. The Crown Agency for the colonies, London.
- Dimayuga, R.E., Garcia, S.K., 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 31, 181-192.
- Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., 1973. Screening of Indian plants for biological activity, Part IV. *Indian Journal Experimental Biology*. 11, 43-54.
- Elsheikh, S.H., Bashir, A.K., Suliman, S.M., Wassila, M.E., 1990. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercariae and miracidia of *Schistosoma mansoni*. *International Journal Crude Drug Research*. 28, 241-245.
- Fosberg, F.R., Sachet, M-H., 1975. *Polynesian plant studies 1-5*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Flatie, T., Gedif, T., Asres, K., Gebre-Mariam, T., 2009. Ethnomedical survey of Berta ethnic group Assosa Zone, Benishangul-Gumuz regional state, mid-west Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 5.
- Fernandez de la Pradilla, C., 1985. *Des plantes qui nous ont guéris*. Jeunesse d'Afrique, Ouagadougou.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2000. Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology*. 73, 347-377.
- Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R.B., Ndemera, B., 1985. *The traditional medicinal practitioner in Zimbabwe*. Mambo Press, Gweru.
- Garcia, D., Domingues, M.V., Rodrigues, E., 2010. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 6.
- Gbadamosi, I.T., Moody, J.O., Yekini, A.O., 2012. Nutritional composition of ten ethnobotanicals used for the treatment of anaemia in Southwest Nigeria. *European Journal of Medicinal Plants*. 2, 140-150.
- Garba, S., Salihu, L., Ahmed, M.U., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and n-hexane extracts of *Waltheria indica* and *Mucuna pruriens*. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 1, 5-8.
- Hussain, H.S.N., Karatela, Y.Y., 1989. Traditional medicinal plants used by Hausa tribe of Kano State of Nigeria. *Crude Drug Research*. 27, 211-216.
- Hedberg I., Hedberg, O., Madati, P.J., Mshigeni, K.E., Mshiu, E.N., Samuelsson, G., 1983. Inventory of plants used in traditional medicine in Tanzania. III. Plants of the families Papilionaceae - Vitaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 9, 237 - 260.

- Hernández, N.M.R., Saucedo, S.A., Cuéllar, A.C., Álvarez, B.R., Moya, D.L., 2009. Actividad antimicrobiana de *Waltheria indica* y *Acacia farnesiana*. Revista CENIUC Ciencias Biológicas. 40, 129-134.
- Haerdi, F., 1964. Afrikanische Heilpflanzen. Die Eingeborenen-Heilpflanzen des Ulanga- Distriktes Tanganjikas (Ostafrika). Acta tropica, Suppl. 8, 1-278.
- Hamidu, L.J., Ayo, J.O., Adelaiye, A.B., Abubakar, M.S., 2008. Sedative and anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction of *Waltheria indica* in Mice. Journal of Pharmacology and Toxicology. 3, 261-266.
- Inngjerdingen, K., Nergard, C.S., Diallo, D., Mounkoro, P.P., Paulsen, B.S., 2004. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. Journal of Ethnopharmacology. 92, 233-244.
- Jain, S.C., Jain, R., Singh, R., 2009. Ethnobotanical survey of Sariska and Siliserh regions from Alwar district of Rajasthan, India. Ethnobotanical Leaflets. 13, 171-188.
- João, F.M., Martins, P.R., 1998. Potencial da Erva Daninha *Waltheria americana* (Sterculiaceae) no Manejo Integrado de Pragas e Polinizadores: Visitas de Abelhas e Vespas. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 27, 29-40.
- João, F.M., Martins, P.R., 1999. A Estrutura da Guilda de Abelhas e Vespas Visitantes Florais de *Waltheria americana* L. (Sterculiaceae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 28, 617-633.
- Judd, N., 1998. Laau Lapaau: Herbal among healing contemporary Hawai'ian healers. Pacific Health Dialog. 5, 239-245.
- Jansen, O., Angenot, L., Tits, M., Nicolas, J-P., De Mol, P., Nikiéma, J-B., Frédérick, M., 2010. *In vitro* antiplasmodial activity of ethnobotanically selected plants from Burkina Faso. Journal of Ethnopharmacology. 130, 143-150.
- Kokwaro, J.O., 1976. Medicinal plants of East Africa. East african literature bureau, Dar Es Salaam.
- Kerharo, J., Adam, J.G., 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Vigot et Frères, Paris.
- Kerharo, J., Bouquet, A., 1950. Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire –Haute-Volta. Vigot et Frères, Paris.
- Kerharo, J., 1967. La pharmacopée sénégalaise: catalogue des plantes médicinales et toxiques des wolof et des serer. Annales pharmaceutiques françaises. 25, 385-438.
- Leonard, D.B., 2010. Medicine at your feet: Healing plants of the Hawaiian Kingdom, volume 1. Roast Duck Productions, US.
- Leonti, M., Vibrans, H., Sticher, O., Heinrich, M., 2001. Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 53, 1653-1669.
- Loustalot, A.J., Pagan, C., 1949. Local "fever" plants tested for presence of alkaloids. El Crisol Puerto Rico. 3, 3-5.
- Mathabe, M.C., Nikolova, R.V., Lall, N., Nyazema, N.Z., 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province, South Africa. Journal of Ethnopharmacology. 105, 286-293.
- Morton, J.F., 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatan. Springfield, Illinois.

- Maregesi, S.M., Ngassapa, O.D., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2007. Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 457-470.
- Musa, M.S., Fathelrhman, Abdelrasool, F.E., Elsheikh, E.A., Ahmed, L.A.M.N., Mahmoud, A.L.E., Yagi, S.M., 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, South-eastern Sudan. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5, 4287-4297.
- Maeyama, L., 2002. Whitening complex with *Waltheria indica* extract and ferulic acid. *Cosmetics and toiletries*. 117, 69-74.
- Mohammed, Z., Shok, M., Ilyas, N., Musa, K.Y., Yaro, A.H., 2007. Analgesic Activity of *Waltheria Indica* Linn. *European Journal of Scientific Research*. 16, 6-9.
- Moerman, D.E., 1998. *Native American Ethnobotany*. Timber Press, Portland.
- Mitchell, S.A., Ahmad, M.H., 2006. A Review of Medicinal Plant Research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948–2001. *West Indian Medical Journal*. 55, 243-269.
- Maheswara, M., Rao, K.Y., Ra, V.M., Rao, C.V., 2006. Antibacterial activity of acylated flavonol glycoside from *Waltheria indica*. *Asian journal of Chemistry*. 18, 2761-2765.
- Mongalo, N.I., Opoku, A.R., Zobolo, A.M., 2012. Antibacterial and antioxidant activity of the extracts of *Waltheria indica* Linn. collected from Capricorn District, Limpopo Province, South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6, 5593-5598.
- Miyashiro, H., Lim, J.A., Nakabayashi, T., Miyaji, M., Hattori, M., Shimotohno, K., 1994. Inhibitory effects of tropical plants on HIV-protease. *Abstracts of International Conference on AIDS*. 10, 112.
- Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., 2008. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 119, 58-66.
- Maregesi, S., Van Miert, S., Pannecouque, C., Feiz Haddad, M.H., Hermans, N., Wright, C.W., Vlietinck, A.J., Apers, S., Pieters, L., 2010. Screening of Tanzanian medicinal plants against *Plasmodium falciparum* and Human Immunodeficiency Virus. *Planta medica*. 76, 195-201.
- Neal, M.C., 1965. *In gardens of Hawaii*. Special publication 50. Bernice P. Bishop Museum Press, Honolulu.
- Nacoulma, O.G., 1996. *Medicinal plants and traditional medical practices at Burkina Faso: case of central plateau*, Tomes 1 and 2. Thesis. University of Ouagadougou.
- Neyres, Z.T.J., Corsino da Silva, L.J., Matos da Silva, R., Espinosa, M.M., Tabajara de Oliveira, M.D., 2009. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e anti-inflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19, 130-139.
- Olajuyigbe, O.O., Babalola, A.E., Afolayan, A.J., 2011. Antibacterial and phytochemical screening of crude ethanolic extracts of *Waltheria indica* Linn. *African Journal of Microbiology Research*. 5, 3760-3764.
- Ososki, A.L., Lohr, P., Reiff, M., Balick, M.J., Kronenberg, F., Fugh-Berman, A., O'Connor, B., 2002. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *Journal of Ethnopharmacology*. 79, 285–298.
- Oladiji, A.T., Abdullahi, S.A., Yakubu, M.T., 2005. Evaluation of haematinic potentials of aqueous extract of *Waltheria indica* (L.) root on rats reared on iron sufficient and iron deficient feeds. *Nigeria journal of biochemistry and molecular biology*. 10, 1115-1122.

- Patel, J.R., Tripathi, P., Sharma, V., Chauhan, N.S., Dixit, V.K., 2011. *Phyllanthus amarus*: ethnomedical uses, phytochemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 138, 286–313.
- Païs, M., Mainil, J., Goutarel, R., 1963. Les adouétines X, Y, Z, alcaloïdes du *Waltheria americana* L. (sterculiacées). *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 21, 139-146.
- Païs, M., Marchand, J., Jarreau, F.X., Goutarel, R., 1968. Peptid alkaloids. V. Structures of adouetins X,Y,Y1, and Z, the alkaloids of *Waltheria americana* L. (Sterculiaceae). *Bulletin Société Chimique de France*. 3, 1145-1148.
- Petrus, A.J.A., 1990. Polyphenolic components of *Waltheria indica*. *Fitoterapia*. 61, 371.
- Reginald, E.D., 2009. Biological Surveys Conducted on the Kapulena Production Well and Reservoir Site, Hmkua District, Island of Hawai'i. U.S. FISH and Wildlife service letter and biological survey report. Kapulena Production Well Biological Surveys.
- Rokaya, M.B., Münzbergová, Z., Binu Timsina, B., Bhattarai, K.R., 2012. *Rheum australe* D. Don: A review of its botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 761–774.
- Rojas, H.N.M, Avellaneda, S.S., Cuéllar Cuéllar, A., 2010. Plantas empleadas en medicina tradicional en Tierra Caliente, Guerrero, Mexico, para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Revista Colombiana ciencia Animal*. 2, 124-136.
- Rao, Y.K., Fang, S-H., Tzeng, Y-M., 2005. Inhibitory Effects of the Flavonoids Isolated from *Waltheria indica* on the Production of NO, TNF α and IL-12 in Activated Macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28, 912-915.
- Ragasa, C.Y., Cruz, C.A., Chiong, I.D., Tada, M., Rideout, J.A., 1997. Antifungal flavonoids from *Waltheria Americana*. *Philippine Journal of Science*. 126, 243-250.
- Sita, G., 1978. Traitement traditionnel de quelques maladies en pays Bissa (République de Haute-Volta). *Bulletin agricole du Rwanda*. 11, 24 – 34.
- Scheuer, P.J., Horigan, L.P., Hudgins, W.R., 1962. A survey for alkaloids in Hawaiian plants, III. *Pacific science*. 16, 63-69.
- Saunders, J.G., 2011. Resurrection of the Maui endemic *Waltheria pyrolifolia* (Sterculiaceae, Hermannieae). *Darwiniana*. 49, 76-85.
- Saunders, J.G., 2007. Sterculiaceae of Paraguay. II. *Waltheria*. *Bonplandia*. 16, 143-180.
- Sugiyama, Y., Koman, J., 1992. The flora of Bossou: its utilization by chimpanzees and humans. *African study monographs*. 13, 127-169.
- Sessions, R.B., Dewar, V., Clarke R.C., Holbrook, J.J., 1997. A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia. *Protein engineering*. 10, 301-306.
- Traoré, D., 1983. Médecine et magie Africaine ou comment le noir se soigne t-il? *Présence Africaine*, Paris.
- Tapsoba, H., Deschamps, J.P., 2006. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*. 104, 68-78.
- Torres, L.O., Pérez, M.E.T., Aguilar, A.C., 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional Mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Tan, N-H., Zhou, J., 2006. Plant cyclopeptides. *Chemical Reviews*. 106, 840-895.
- Vedavathy, S., Rao, N.K., 1995. Anti-inflammatory activity of some indigenous medicinal plants of Chittoor district, Andhra Pradesh. *Indian Drugs*. 32, 427-432.

- Web 1. “*Waltheria indica* L. Sleepy morning” (PDF). International Institute of Tropical forestry. United States Forest Service. URL: http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland_shrubs.htm (accessed 06.12.2012).
- Web 2. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?447684> (accessed 27.10.12).
- Wagner, W.L., Herbst, D.R., Sohmer, S.H., 1990. Manual of the flowering plants of Hawai'i. 2 vols. Bishop Museum Special Publication 83. University of Hawaii Press and Bishop Museum Press, Honolulu.
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G., 1962. The medicinal and poisonous plants of Southern and Western Africa, Second edition. Livingstone, London.
- Zailani, A.H., Jada, S.M., Wurochekke, U.A., 2010. Antimicrobial Activity of *Waltheria Indica*. Journal of American Science. 6, 1591-1594.
- Zavala, M.A., Pérez, S., Pérez, C., Vargas, R., Pérez, R.M., 1998. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. Journal of Ethnopharmacology. 61, 41–47.

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS

1. Publication de résultats

Recherche bioguidée de composés actifs à partir de *Waltheria indica* L. (Malvaceae), plante utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de l'asthme et l'inflammation au Burkina Faso.

Dans cet article en préparation pour soumission à *Fundamental and Clinical Pharmacology*, nous présentons les investigations phytochimiques et pharmacologiques visant à isoler des molécules bioactives en relation avec l'usage anti asthmatique et anti inflammatoire de *W. indica*.

Des investigations chimiques à type d'extraction, de purification et de détermination structurale ont été conduites en alternance avec les investigations biologiques.

Les études biologiques ont porté sur l'interaction de *W. Indica* avec des enzymes impliquées dans le processus inflammatoire (PLA₂ et 5-LOX) et dans la relaxation du muscle lisse bronchique (PDE4A1 α) et l'étude de l'effet *W. indica* sur la trachée de rat.

Nous avons extrait et purifié plusieurs composés, puis identifié la structure d'un des composés.

Le composé isolé, (-)-épicatéchine, montre une activité inhibitrice intéressante vis à vis de l'activité des enzymes investiguée, notamment la PLA₂ et la 5-LOX.

Les résultats pharmacologiques fournissent une preuve pharmacologique expérimentale de l'usage traditionnel de *W. indica* contre l'asthme et l'inflammation et démontrent la participation au moins d'un composé, (-)-épicatéchine aux propriétés antiasthmatiques. La poursuite des investigations pourrait révéler la contribution d'autres molécules bioactives à ces différentes propriétés pharmacologiques.

**Bioguidage search of active compounds from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used
for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso**

F. Zongo^{1,2,*}; C. Ribuo¹; A. Boumendjel³; I. Guissou²

¹Laboratoire HP2 - U1042, Inserm, Grenoble, France, Joseph Fourier University, Grenoble, France,; ²Laboratory
of Pharmacology-Toxicology, University of Ouagadougou I; ³Department of Medicinal Chemistry, UMR CNRS
5063- Université Joseph Fourier, Grenoble I- France

*Corresponding author:

Frank ZONGO

Université Joseph Fourier – Grenoble I

Faculté de Pharmacie

Laboratoire HP2

INSERM U1042

38706 La Tronche

France

Tel: 04 76 63 74 77

E-mail: frapether@yahoo.fr

ABSTRACT

Waltheria indica Linnaeus (Malvaceae) is a tropical herbaceous used in traditional pharmacopeia in Burkina Faso for treatment of various respiratory diseases including asthma and general disorders as inflammation.

With the objective to evaluate its pharmacological properties and isolate the active compounds, a study through a bioguided phytochemical approach was conducted. This search was guided by a two level investigation. First, we evaluated the impact of various fractions on the activity of enzymes involved in smooth muscle contraction (PDE4A1 α) and inflammatory processes (PLA₂ and 5-LOX). Second, we investigated the inhibitory effect of fractions on isolated rat trachea.

The initial hydro alcoholic extract from roots of *W. indica* (HA), n-hexane fraction (F₁), dichloromethane fraction (F₂), ethyl acetate fraction (F₃), residuary fraction (F₄) reduced enzyme activity of PDE4A1 α (inhibition of 22 to 42% at 50 μ g/mL), 5-LOX (60 to 80% at 10 μ g/mL) and PLA₂ (42 to 94% at 100 μ g/mL). HA, F₃ and F₄ were more active than indometacin used as positive control for PLA₂ at concentration of 500 μ g/mL (p<0.05).

On isolated rat trachea, only HA, F₃ and fractions obtained from F₃ by chromatography on silica gel column, using dichloromethane/methanol solvents system, dose-dependently inhibited contraction induced by acetylcholine. IC₅₀ was 1051 μ g/mL for HA and comprised between 181 and 477 μ g/mL for F₃ and its fractions. The most active fractions were purified and led to the identification of (-)-epicatechin by means of spectrometric methods. The contribution of (-)-epicatechin to the pharmacological properties of *W. indica* was confirmed by description of dose-dependent inhibition of PLA₂ (IC₅₀ = 154.7 μ M) and 5-LOX (IC₅₀ = 15.8 μ M).

In conclusion, both inhibition of PDE4A1 α , 5-LOX and PLA₂ activities and rat trachea relaxation by *W. indica* validate its use in traditional management of asthma and others conditions of inflammation. These effects should be, at least in part, attributed to the presence of (-)-epicatechin in roots of *W. indica*.

Keywords: *Waltheria indica*, (-)-epicatechin, phosphodiesterase, phospholipase, lipoxygenase, asthma.

LIST OF ABBREVIATIONS

¹³C-NMR: Nuclear magnetic resonance of carbon; ¹H-NMR: Nuclear magnetic resonance of proton; AMP: Adenosine monophosphate; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; COSY: Correlation spectroscopy; ATP: Adenosine triphosphate; EDTA: Ethylene diamine tetra acetic; DMSO: dimethylsulfoxide; HA: Hydro alcoholic extract; HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation;

HSQC: Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy; LOX: Lipoxidase or lipoxygenase; MS: Mass spectroscopy ; PDE: Phosphodiesterase; PLA: Phospholipase; TLC : Thin layer chromatography; WHO: World Health Organization; HpETE: Hydroperoxy-6E, 8Z, 11Z, 14Z- eicosa-tetraenoic; HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

INTRODUCTION

Asthma affects approximately 300 million people worldwide. It would be responsible for 250,000 deaths each year as evaluated by the report on global strategy for asthma management and prevention, 2011. Asthma is a chronic disease characterized by acute exacerbations of coughing, dyspnoea, wheezing and chest tightness. Patients usually have reduced forced expiratory volume that lead to airflow reduction. Other features characteristics of asthma are airway inflammation and bronchial hyper responsiveness. Evidence of reversible airways obstruction confirms the diagnosis [1].

In modern medicine, asthma is treated using drugs acting on several of its clinical aspects. Some drugs have a relaxant effect on trachea and bronchia; others are anti-inflammatory and/or anti allergic agents. Although drugs essential for treatment of asthma are available, their cost remains an obstacle in poor countries. In this regard, traditional medicine is still largely used in southern countries and especially in Africa where up to 80% of the population uses traditional medicine in daily health care needs [2]. Among plants used in traditional medicine in Africa, *W. indica* is a plant largely used by traditional healers in Burkina Faso for both management and prevention of respiratory affections including asthma [Nacoulma O.G. Medicinal plants and traditional medical practices at Burkina Faso: case of central plateau. Tomes 1 and 2. Thesis *Doctorat es sciences*. University of Ouagadougou, 1996. Reference N°0015NAC, 3]. It has been also used in the treatment of diverse conditions of inflammation such as gum and teeth diseases [4, 5]. However, to the best of our knowledge, no previous work related to the phytochemistry investigation of *W. indica* in asthma is known. The aim of this study was to provide an experimental evidence base for local and traditional uses of *W. indica* against asthma and others conditions of inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Phytochemical study

Collection of plant material: *W. Indica* was collected during three days in Saaba, a village located in central plateau (Burkina Faso). Three collections of plant material were performed during the dry season

and three years consecutively. A voucher specimen of the plant was identified and conserved in the herbarium of the department of botany at University of Ouagadougou I.

Preparation of plant material: The collected material was washed thrice with running tap water and once with sterile water. Roots were dried at ambient temperature away from sun and dust, during four weeks. Next, the roots were powdered (500 g of roots/hour) with crusher (Gladiator EST. 1931 Type BN 1 model).

Hydro alcoholic extraction: The dried powder material of the roots (100 g) of *W. indica* was macerated during 72 hours with 500 mL of alcohol-water mixture (80:20). The mixture was filtered through a Whatman N°1 filter paper. The filtrates were centrifuged to eliminate particles (Centrifuge 4217MKII model). The solvent was removed under reduced pressure at a maximum temperature of 40°C during two hours with Rotavapor (Büchi R-114, Labortechnik). A concentrated hydro alcoholic extract (HA) was obtained. Extraction yield and residual water content were determined for each annual collection of the plant material.

Bioactivity-guided fractionation (fig.1): The hydro alcoholic extract from *W. indica* was separated by solid-liquid fractioning, respectively with n-hexane (F₁), dichloromethane (F₂) and liquid-liquid fractioning with ethyl acetate (F₃); F₄ was the residuary fraction. Screening of the four fractions was performed for PDE4A1 α , PLA₂, 5-LOX *in vitro* inhibition and for contraction inhibition on rat trachea. Based on the results obtained, F₃ was chromatographed on silica gel column chromatography, using solvents system varied from 100% dichloromethane (F₃₁), dichloromethane/methanol 9:1 (F₃₂); 8:2 (F₃₃); 7:3 (F₃₄); 6:4 (F₃₅); 5:5 (F₃₆); 4:6 (F₃₇); 3:7 (F₃₈); 2:8 (F₃₉); 1:9 (F₃₁₀) to 100% methanol (F₃₁₁). Screening of fractions from F₃ was performed for contraction inhibition on rat trachea. According to the results obtained, F₃₆ and F₃₇ were pooled for chemical purification.

Isolation of compounds from F₃₆ and F₃₇: Purifications of F₃₆ and F₃₇ were conducted by using silica gel 60 (Merck) column chromatography and preparative thin layer chromatography (preparative TLC) in the presence of ethyl acetate/methanol and dichloromethane/methanol as eluents.

Identification: The structure of compounds was elucidated by detailed ¹H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆), ¹³C NMR, 2D NMR, molecular mass spectroscopy (ESI-MS), melting point (Büchi melting point B-540) and optical activity (Perkin Elmer 341).

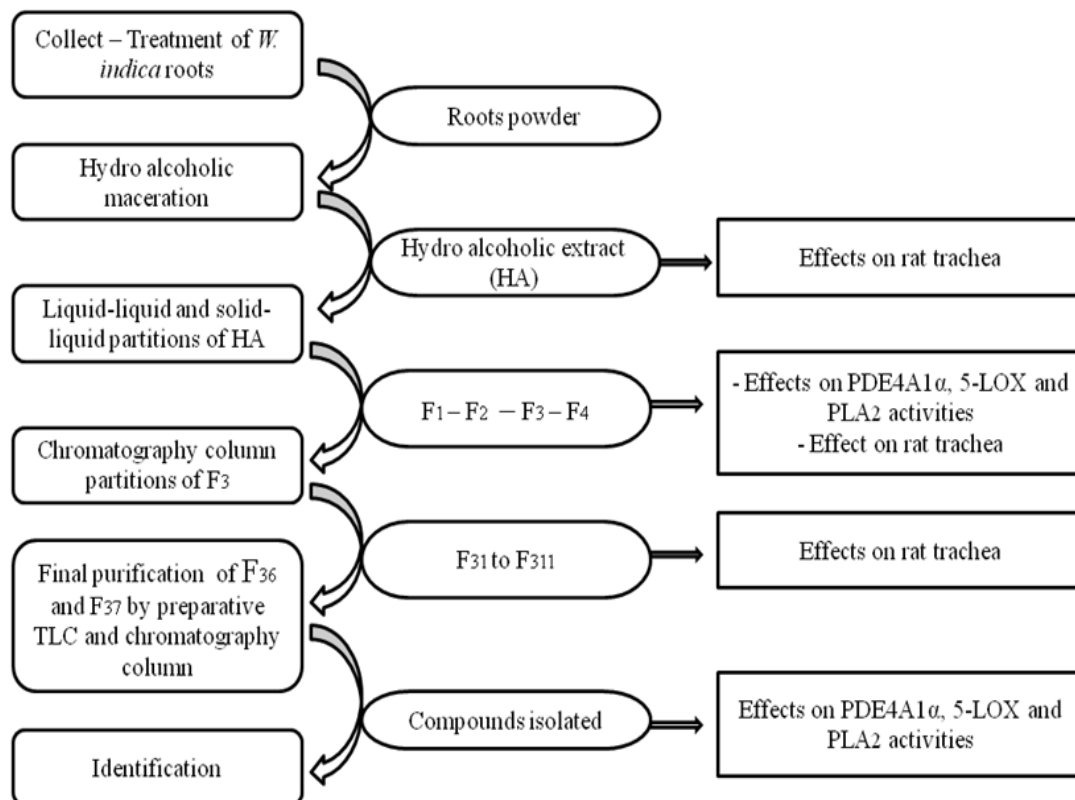


Fig. 1: Bioactivity-guided fractionation of hydro alcoholic extract from *W. indica*.

Pharmacological tests

In vitro enzymes interaction

Interaction with PDE4A1 α : PDE4A1 α activity was measured with an assay kit of BPS Bioscience[®]. Fluorescence polarization caused by cyclic AMP hydrolyze marked by a fluorescent substance is measured in presence of vehicle control (ethanol 60% or DMSO 5%), in presence of different fractions or compound tested and in presence of aminophylline (Renaudin[®]) used as a positive control. Tests were performed in duplicate according to the manufacturer's directions by using a fluorimeter (Fusion[™] Universal microplate analyzer, Packard Bioscience[®]). The tested compounds were added in ethanol (60%) to give a final concentration of ethanol less than 0.1% ethanol or DMSO to give a final DMSO concentration less than 0.5%. The percentage of PDE4A1 α activity in presence of aminophylline (75 μ M) or extract was calculated in comparison with vehicle control.

Interaction with 5-LOX: Kinetic assay of 5-LOX (Cayman[®]) activity was measured following spectrometric UV method and used 1cm path length quartz cuvettes as previously described [6, 7].

Unsaturated fatty acid (arachidonic acid, Cayman[®]) oxidization by the enzyme, release conjugated diene products (5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid and 5-HETE) which absorb at 238 nm.

Assays (1 mL) contained 50 mM potassium phosphate, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 0.3 mM CaCl₂, 100 μM ATP, 50 μM arachidonic acid, 5-LOX and tested compound. The latter was diluted in ethanol (60%) to give a final concentration less than 0.1% ethanol or diluted in DMSO to give a final DMSO concentration less than 0.5%. Assays were initiated by adding the enzyme and carried out at 25°C, using zileuton (Sigma[®]) as a positive control and the reaction was followed during 4 minutes after addition of the enzyme. The 5-LOX activity in presence of vehicle control was determined by using the slope of linear curve. The percentage of 5-LOX activity in presence of zileuton (0.5 μM) or extract was calculated in comparison with vehicle control.

Interaction with PLA₂: The kinetic of PLA₂ activity was determined by a fluorimetric method as previously described [8, 9]. A phospholipid marked with pyrenyl group was used (1-hexadecanoyl-2-(1-Pyrenedécanoyl)-sn-glycero-3-phosphomethanol, Interchim[®]). Phospholipid hydrolyzation by PLA₂ of bee venom origin, (Sigma[®]) release pyrenyl group which fluorescence was measured.

Assays were conducted on 96 wells microplate (200 μL by well) and contained 50 mM Tris acid, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 0.01 μg/mL PLA₂, 10 μg/mL phospholipid marked, tested compound and 10 mM CaCl₂. Assays were initiated by adding 10 μL of CaCl₂ and carried out at 37°C. A fluorimeter (Varioskan[®] Flash Spectral Scanning Multimode Reader) was used to follow the reaction during 6 minutes before and after addition of CaCl₂. The PLA₂ activity in presence of vehicle control was determined by using the slope of linear curve. The percentage of PLA₂ activity in presence of indometacin (50 μM) (Sigma[®]) or extract was calculated in comparison with vehicle control.

Effect on isolated rat trachea

Animal ethic committee authorization: The “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) were followed in these experiments which were approved by the local ethical committee and the Direction des Services Vétérinaires (DSV) de l’Isère, France. Experiments were conducted on adult male Wistar rats (weight range 200-250 g) from Elevage Janvier (France) housed in controlled conditions and provided with standard rat chow *ad libitum*.

Animals: Before experience, rat was kept without food during 16 hours, but had access to water. Rats were killed by a blow to the head and exsanguination as used in many experiments assessing rat trachea muscle functioning [10-16].

A segment of trachea containing four to five cartilaginous rings was taken just above the bifurcation of the two bronchi. Adherences were removed. The tracheal ring was suspended between two stainless-steel hooks and placed in a 10 mL water-jacketed organ chamber containing daily fresh made Krebs-Henseleit solution (Composition [mM]: NaCl 94.7, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.88 and glucose 5.5 (Sigma®), CaCl₂ 2.52, KH₂PO₄ 1.18 (Prolabo®)). The solution was continuously aerated with 95% oxygen/5% CO₂ (Air liquide®), with pH maintained at 7.4 and temperature at 37°C. Isometric tensions were measured by using an isometric transducer (25 g), and changes in isometric force were recorded by using a tension amplifier and recorder computer system. The resting tension was adjusted periodically to 1.5 g during the equilibration period. The ring was washed every 15 min and reequilibrated to baseline tension for 60 min [12, 13, 17-19].

Preparation of active substances and extracts: Acetylcholine was dissolved with modified Krebs-Henseleit solution. Extracts and compounds isolated were dissolved in ethanol/water (20:80) or DMSO 10%. Active substances and extracts were directly added in the bath in order to not exceed DMSO 0.5% or ethanol 0.04%.

Effect on contraction induced by acetylcholine: First, trachea was contracted with acetylcholine cumulative doses. EC₈₀ of acetylcholine on rat trachea was determined from dose - effect curve. Trachea was washed by changing modified Krebs-Henseleit solution. Then, the dose of acetylcholine corresponding to EC₈₀ was administrated. When complete trachea contraction is obtained, cumulative doses of extracts were added to the bath every three minutes.

Data analysis: Results are given as mean \pm S.E.M. EC₈₀ and IC₅₀ values were estimated by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software (version 5.02). To compare vehicle control with positive control and positive control with tested compound, normality was first tested and Student t or Mann-Whitney Rank sun tests were then performed accordingly. Sigma Stat software (version 3.5) was used for statistical analysis. Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Phytochemistry

Extraction yield: The residual water content of the hydro alcoholic extract was 1.51 ± 0.02 %. Yield of hydro alcoholic extraction varied from 18 to 22.6 % according to the collection.

Isolated compounds: Several compounds were isolated and purified from the roots extract, namely F3683A (14.2 mg), F3683BY (11 mg), F36823GA (13 mg) and F36823GB (142 mg). F36823GB which had the best yield (0.9%) have been identified.

Identification of compound F36823GB:

Data from 1D NMR (^1H and ^{13}C NMR) and from 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC) were analyzed and employed to assign all protons and carbons of F36823GB. The fully characterized compound was (-)-epicatechin (**fig.2**) as evidenced by its spectral properties. NMR data perfectly match with literature data: ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6): δ 2.73 (dd, $J = 3.1, 16.3$ Hz, H4); 2.86 (dd, $J = 5.0, 16.3$ Hz, H4); 3.61 (d, $J = 5$ Hz, 3-OH); 4.21 (m, H-3); 4.88 (s, H2); 5.93 (d, $J = 2$ Hz, H6); 6.03 (d, $J = 2$ Hz, H8); 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, H5'); 6.84 (dd, $J = 2, 8.1$ Hz, H6'); 7.05 (d, $J = 2$ Hz, H2'), 7.81 (s, OH); 7.85 (s, OH); 8.03 (s, OH); 8.18 (s, OH). ESI-MS: m/z 289 $[\text{M}-1]^+$.

The ^1H NMR assignment of protons at positions 2, 3 and 4 confirmed the presence of an epicatechin isomer.

The optical activity of the F36823GB was determined and found to match the $[\alpha]_D$ (Methanol, $c = 0.014$) of (-)-epicatechin (-32.5°). The melting point of F36823GB was 215°C and R_f (TLC) = 0.8 (dichloromethane/methanol 8:2).

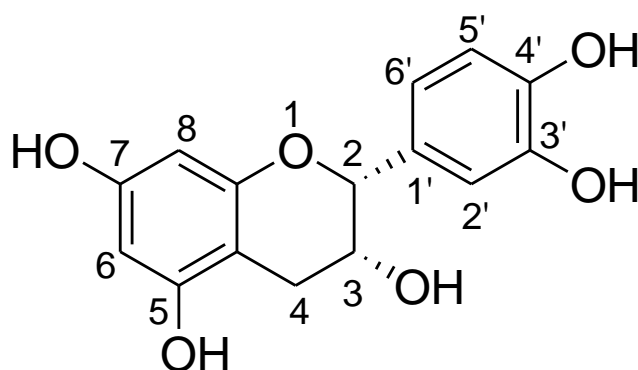


Fig. 2: Chemical structure of F36823GB: (-)-epicatechin.

Pharmacological activity

Interaction of *W. indica* with enzymes

PDE4A1 α inhibition test: the descriptive results of PDE4A1 α bioguidage test showed that HA, F₁, F₂, F₃ and F₄ reduced PDE4A1 α activity. PDE4A1 α inhibition varied from 22 to 42 % at 50 μ g/mL according to the fraction. The inhibition was modest comparatively to the aminophylline control (55%). HA, F₃ and F₄ seem more potent than F₁, F₂. Moreover, the extract effect was not dose-dependent. In contrast, F36823GB dose-dependently inhibited PDE4A1 α until to 170 μ g/mL with maximum inhibition of 50.3%. Over this dose, a plateau effect was observed.

5-LOX inhibition test: the results are descriptive concerning extract and fractions. 5-LOX inhibition by HA, F₁, F₃ and F₄ seems dose-dependent (60 to 80 % at 10 μ g/mL). The inhibition by 5 μ g/mL of F₃ and F₄ seems as potent as the one observed with zileuton (0.12 μ g/mL).

F36823GB dose-dependently inhibited 5-LOX with IC₅₀ of 15.8 μ M (**fig.3**). The inhibitor effect of F36823GB (30 μ M) was more important than zileuton control (0.5 μ M) ($p < 0.001$).

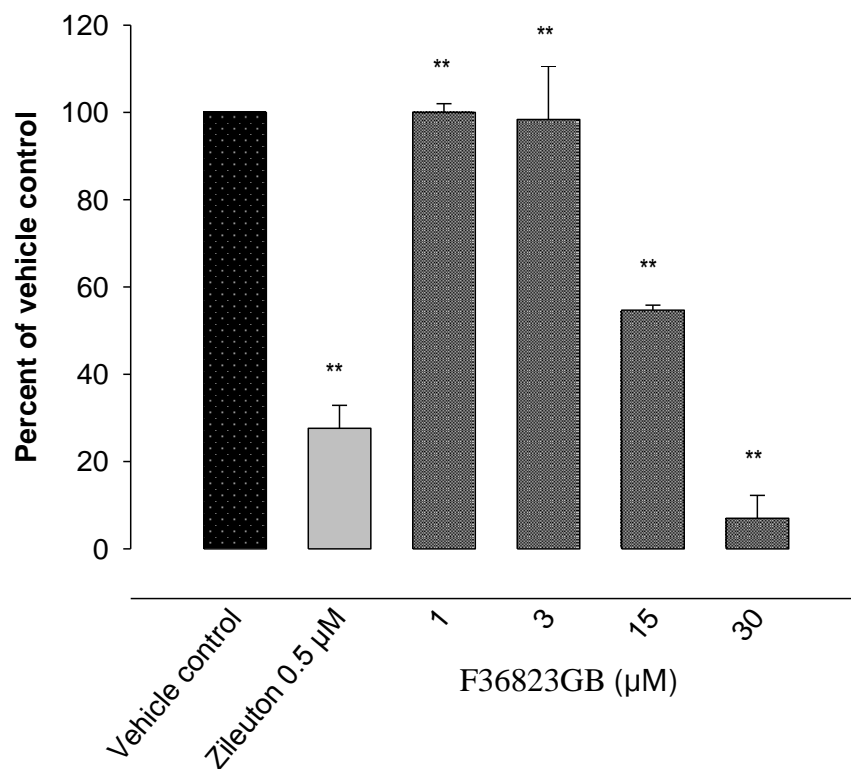


Fig. 3: 5-LOX activity in absence and in presence of F36823GB (n = 3).

Zileuton vs Vehicle control; F36823GB vs Zileuton: * $p < 0.05$, Student test.

PLA₂ inhibition test: a dose-dependent inhibition of PLA₂ was observed with HA, F₁, F₂, F₃ and F₄ (**fig.4**). The inhibition by the fractions at 100 µg/mL was as important as indometacin control (18 µg/mL). HA, F₃ and F₄ (at 500 µg/mL) effect is significantly more important than indometacin control's one.

F36823GB dose-dependently inhibited PLA₂ with IC₅₀ of 154.7 µM (**fig.5**). Over 1725 µM of F36823GB, the effect was comparable to indometacin control (50 µM)

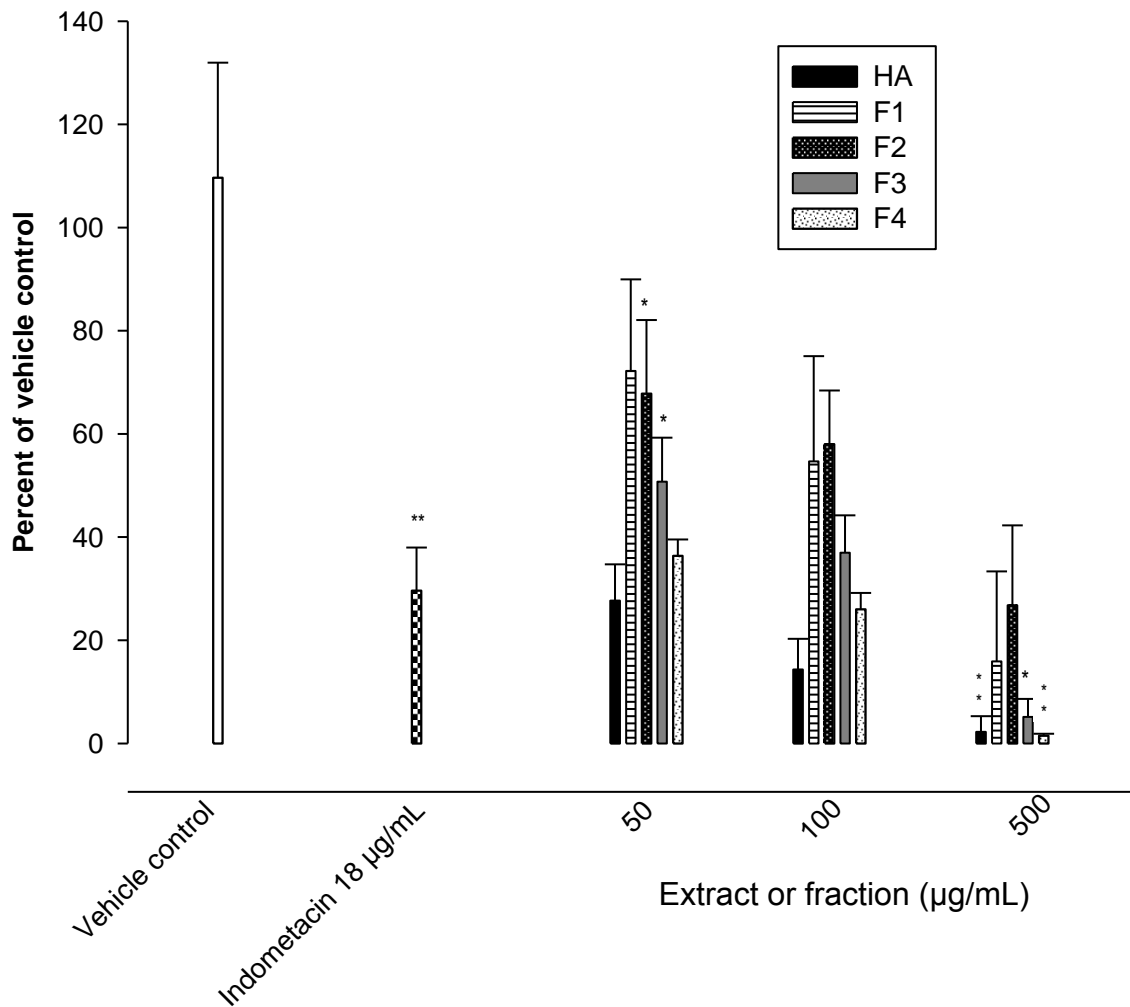


Fig. 4: PLA₂ activity in absence and in presence of HA and F₁, F₂, F₃, F₄ (n = 3). Indometacin vs Vehicle control; Extract vs Indometacin: * p<0.05, Student test.

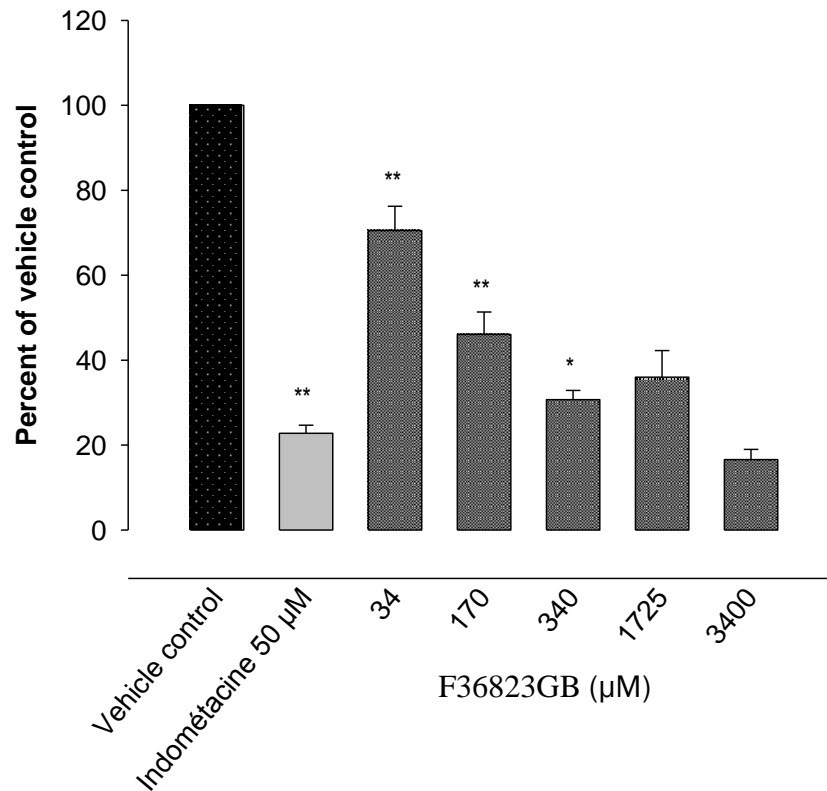


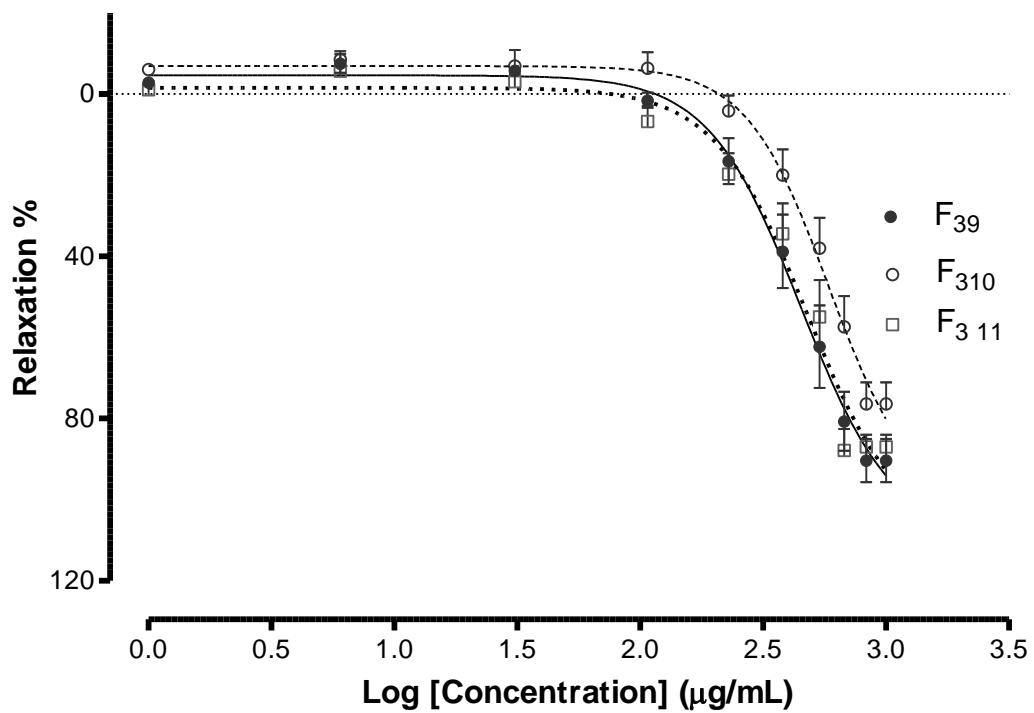
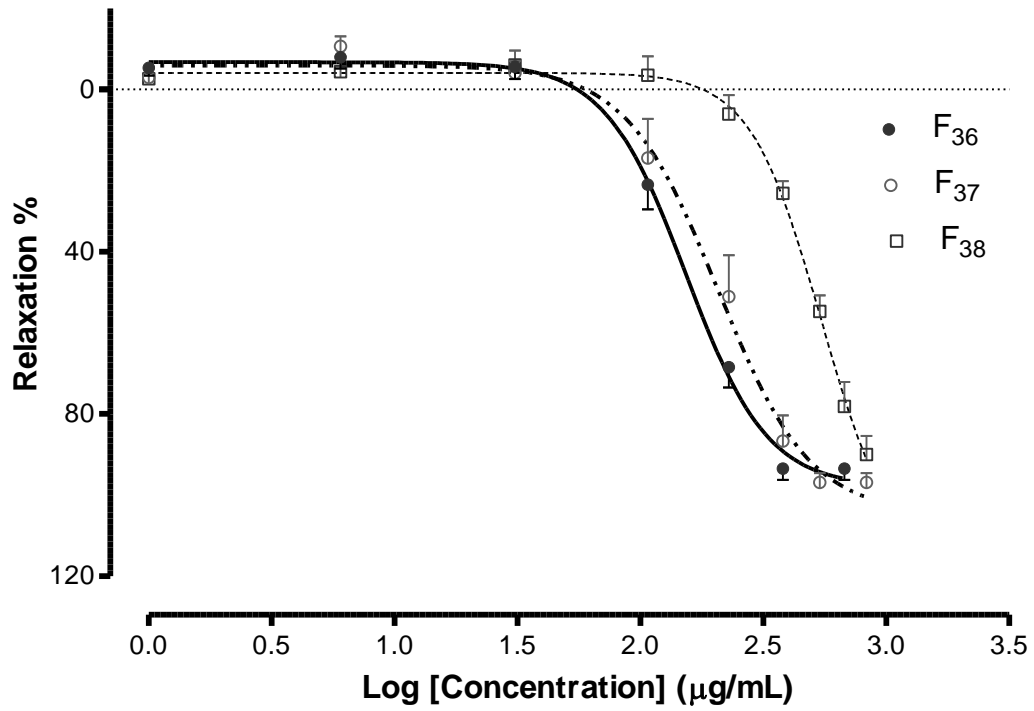
Fig. 5: PLA₂ activity in absence and in presence of F36823GB (n = 4).

F36823GB vs Indometacin: * p<0.05, Student test.

Indometacin vs Vehicle control: * p<0.05, Mann-Whitney Rank Sum test.

Effects of *W. indica* on rat trachea

HA reduced contraction induced by acetylcholine with IC₅₀ = 1051 µg/mL. F₁, F₂ and F₄ didn't show significant inhibition of the contraction induced by acetylcholine. However, F₃ and its fractions (**fig.6**) had inhibition effect. IC₅₀ of fractions derived from F₃ were compared with IC₅₀ of F₃ (IC₅₀ = 563 µg/mL) on the rat trachea. F₃₆ (IC₅₀ = 181 µg/mL) and F₃₇ (IC₅₀ = 283.7 µg/mL) were more active than F₃ (p<0.01). However, the activity of the other fractions was similar to F₃.



b.

Fig. 6: Relaxant effect of fractions derived from F₃ (n=7)

a. Dose-effect curves of F₃₆, F₃₇ and F₃₈

b. Dose-effect curves of F₃₉, F₃₁₀ and F₃₁₁

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this work constitutes the first pharmacological investigation related to the uses of *W. indica* against asthma. Moreover, our study provided pharmacological data and brought more evidence supporting the traditional use of *W. indica* in asthma management. On the one hand, extracts and (-)-epicatechin isolated from roots of *W. indica* reduced PDE4A1 α , 5-LOX and PLA₂ activities; on the other hand, extracts reduced the contractions induced by acetylcholine on isolated rat trachea.

F36823GB isolated from the roots of *W. indica* was identified to be (-)-epicatechin. Catechins belong to the flavonoids family and flavanols class. According to the configuration of asymmetric carbons N°2 and 3 (**fig.2**), there are four active optically isomers. (-)-epicatechin and (+)-catechin are the most common enantiomers of catechins in nature. (-)-epicatechin is present in several plants such as *Acacia catechu* [20], *Theobroma cacao* [21], fruits of *Malus sp.* [22] and *Vitis viniflora* [23].

Highlights found in literature are in agreement with our pharmacological results. Indeed, literature survey, revealed that (-)-epigallocatechin-3-gallate, a derivative of catechin is an inhibitor of the cyclic nucleotide PDE isoenzymes present in vascular tissue [24]. Catechin derivatives and particularly, (-)-epicatechin were investigated for inhibition of the enzymes responsible for processing arachidonic acid. In this regard, the water extract from *Aloe vera*, containing catechin tanins inhibited PLA₂ (group IIA) with IC₅₀ of 0.22 mg/mL [25]. (-)-epicatechin inhibited human platelet 12-LOX and rabbit 15-LOX-1 [26]. (-)-epicatechin also inhibited human 5-LOX with IC₅₀ of 22 μ M. [27]. This value obtained by HPLC assay of 5-HpETE, is comparable to our result (15.8 μ M). More recently, flavocoxid, a mixed extract containing baicalein and catechin/epicatechin have demonstrated a dual inhibition of COX-2 and 5-LOX enzymes activity [28, 29] and also of their expression [30].

Concerning smooth muscle relaxation, (+)-catechin dose-dependently relaxes both spontaneous and high K⁺ (80 mM)-induced contraction in rabbit jejunum and inhibits high K⁺-induced contraction in intact smooth muscle preparations from rat stomach fundus, guinea-pig ileum and guinea-pig trachea. It is suggested that catechins may possess Ca²⁺ antagonist activity [31]. Our results obtained on rat trachea confirm the one observed on guinea-pig trachea.

Above all, catechins may act on allergy, other component of asthma. Catechins inhibit hyaluronidase activity [32] and histamine release from rat peritoneal mast cells [33].

Epidemiology studies in human searching a link between intakes of catechins and asthma showed that red wine intake, containing flavonoids such as catechins, is negatively associated with asthma severity [34]. Finally, a clinical trial aiming to compare the effectiveness and safety of flavocoxid to naproxen in subjects with moderate to severe osteoarthritis of the knee showed that flavocoxid was as effective as

naproxen in managing the signs and symptoms of osteoarthritis of the knee. Flavocoxid demonstrated better gastric, renal, and respiratory safety profiles than naproxen [35].

CONCLUSION

The ultimate goal of the present study was to investigate the traditional use of *W. indica* in asthma treatment, to isolate and characterize the molecules responsible for the pharmacological activity and investigate the mechanism of its action. This study allowed to upgrade *W. indica* and to provide an evidence base for local and traditional uses of this species against several ailments. Inhibition of PDE4A1 α , 5-LOX, PLA₂ and relaxant effect on rat trachea of *W. indica* can support its traditional use against asthma and inflammation. The contribution of (-)-epicatechin have been demonstrated for these pharmacological properties. However, other compounds from extract could be involved in this effect. For that, further investigation of extract from *W. indica* is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank S. Cachot, C. Beney, C. Ravelet, H. Geisselmann and M. Peuchmaur (University Grenoble I), B. Pollack, R. Marlu (University Grenoble I, University hospital, Grenoble) for their technical assistance and are grateful to France consulate at Burkina Faso for financial support (F. Gaudeau, A. Giraudeau).

REFERENCES

1. Karol M.H. Animals models of occupational asthma. *Eur. Respir. J.* (1994) **7**, 555-568.
2. World Health Organization. WHO traditional medicinal strategy 2002-2005. Geneva. WHO/ EDM /TRM / 2002.1
3. Traoré D. Médecine et magie Africaine ou comment le noir se soigne t-il? Présence Africaine, Paris, 1983.
4. Sita G. Traitement traditionnel de quelques maladies en pays Bissa (République de Haute-Volta). *Bulletin Agricole du Rwanda.* (1978) **1**, 24–34.
5. Tapsoba H., Deschamps J.P. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology* (2006) **104**, 68-78.
6. Pufahl R.A., Kasten T.P., Hills R., Gierse J.K., Reitz B.A., Weinberg R.A., Masferrer J.L. Development of a fluorescence-based enzyme assay of human 5-lipoxygenase. *Anal. Biochem.* (2007) **364**, 204–212.
7. Masferrer J.L., Zweifel B.S., Hardy M., Anderson G.D., Dufield D., Cortes-Burgos L., Pufahl R.A., Graneto M. Pharmacology of PF-4191834, a Novel, Selective Non-Redox 5-Lipoxygenase Inhibitor Effective in Inflammation and Pain. *JPET.* (2010) **334**, 294-301.
8. Perrin-Cocon L., Agaugué S., Coutant F., Masurel A., Bezzine S., Lambeau G., André P., Lotteau V. Secretory phospholipase A2 induces dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* (2004) **34**(8), 2293-2302.
9. Radvanyi F., Jordana L., Russo-Mariea F., Bona C. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A2 using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. biochem.* (1989) **177**(1), 103-109.
10. Turgut E.B, Inci S-E, Mustafa I. The investigation into indomethacin-induced potentiation of the contractile response to antigen in ovalbumin-sensitized guinea-pig tracheas. *Fund. Clin. Pharmacol.* (2012) **26**, 332-339.
11. Fehri B., Mueen A.K., Aiache J-M. The relaxant effect induced by *Allium sativum* L. bulb aqueous extract on rat isolated trachea. *Pharmacogn. Mag.* (2011) **7**(25), 377-382.
12. Lima F.C., Peixoto-Neves D., Gomes M.D.M., Coeho-de-Souza A.N., Lima C.C., Zin W.A., Malgalhaes P.J.C., Saad L., Leal-Cardoso J.H. Antispasmodic effects of eugenol on rat airway smooth muscle. *Fund. Clin. Pharmacol.* (2011) **25**, 690-699.
13. Boskabady M.H., Kiani S., Rakhshanda H. Relaxant effects of *Rosa damascena* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *J. Ethnopharmacol.* (2006) **106**(3), 377-382.
14. Mohammad H.B., Sahar K., Behnia H. Relaxant effects of *Ocimum basilicum* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Daru.* (2005) **13**, 28-33.

15. Bramich N.J. Electrical behavior of guinea pig tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* (2000) **278**(2), 320-328.
16. Hazekamp A., Verpoorte R., Panthong A. Isolation of a bronchodilator flavonoid From the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. *J. ethnopharmacol.* (2001) **78**, 45-49.
17. Kazem M., Naseri G., Heidari A. Bronchodilatory Activity of *Vitis vinifera* Leaf Hydroalcoholic Extract in Rat. *Iran Biomed. J.* (2006) **10**(2), 79-83.
18. Shibata O., Saito M., Yoshimura M., Yamaguchi M., Makita T., Sumikawa K. Interactions of Edrophonium with Neostigmine in the Rat Trachea. *Anesth. Analg.* (2003) **97**, 1059-1063.
19. Estrada-Soto S., Sánchez-Recillas A., Navarrete-Vázquez G., Castillo-España P., Villalobos-Molina R., Ibarra-Barajas M.J. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *Ethnopharmacol.* (2012) **139**(2), 513-518.
20. Lakshmi T., Magesh A., Rajendra R. Estimation of biomarker epicatechin in ethanolic bark extract of *Acacia catechu* Willd by HPLC method. *J. Pharm. Sci. & Res.* (2012) **4**(3), 1764-1767.
21. Engler M.B., Engler M.M. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutrition Research.* (2004) **24**, 695–706.
22. Kanda T., Akiyama H., Yanagida A., Tanabe M., Goda Y., Toyoda M., Teshimma R., Saito Y. Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* (1998) **62**(7), 1284-1289.
23. Goldberg D.M., Karumanchiri A., Tsang E., Soleas G. Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol. Vitic.* (1998) **49**(1), 23-34.
24. Alvarez E., Campos-Toimil M., Justiniano-Basaran H., Lugnier C., Orallo F. Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* (2006) **147**, 269-280.
25. Kammoun M., Miladi S., Ben Ali Y., Damak M., Gargouri Y., Bezzine S. *In vitro* study of the PLA2 inhibition and antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *Lipids in Health and Disease.* (2011), **10**(30).
26. Schewe T., Sadik C., Klotz L.O., Yoshimoto T., Kühn H., Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol. Chem.* (2001) **382**, 1687-1696.
27. Schewe T., Kühn H., Sies H. Flavonoids of Cocoa Inhibit Recombinant Human 5-Lipoxygenase. *J. Nutr.* (2002) **132**, 1825-1829.
28. Burnett B.P., Bitto A., Altavilla D., Squadrito F., Levy R.M., Pillai L. Flavocoxid Inhibits Phospholipase A2, Peroxidase moieties of the Cyclooxygenases (COX), and 5-Lipoxygenase, modifies COX-2 gene expression, and acts as an antioxidant. *Mediators of inflammation.* (2011) Article ID 385780.

29. Altavilla D., Squadrito F., Bitto A., Polito F., Burnett BP., Di Stefano V., Minutoli L. Flavocoxid, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, blunts pro-inflammatory phenotype activation in endotoxin-stimulated macrophages. *Br. J. Pharmacol.* (2009) **157**, 1410-1418.
30. Polito F., Bitto A., Irrera N., Squadrito F., Fazzari C., Minutoli L., Altavilla D. Flavocoxid, a dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, reduces pancreatic damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br. J. Pharmacol.* (2010) **161**, 1002-1011.
31. Ghayur M.N., Khan H., Gilani A.H. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Arch. Pharm. Res.* (2007) **30**(8), 970-975.
32. Samee H., Li Z., Lin H., Khalid J., Guo Y. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* (2009) **10**(2), 147-153.
33. Kanda T., Akiyama H., Yanagida A., Tanabe M., Goda Y., Toyoda M., Teshima R., Saito Y. Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1998) **62**(7), 1284-1289.
34. Shaheen S.O., Sterne J.A., Thompson R.L., Songhurst C.E., Margetts B.M., Burney P.G. Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2001) **164**, 1823-1828.
35. Levy R.M., Khokhlov A., Kopenkin S., Bart B., Ermolova T., Kantemirova R., Mazurov V., Bell M., Caldron P., Pillai L., Burnett B.P. Efficacy and safety of flavocoxid, a novel therapeutic, compared with naproxen: a randomized multicenter controlled trial in subjects with osteoarthritis of the knee. *Adv. Ther.* (2010) **27**(10), 731-742.

2. Résultats non publiés

2.1. L'enquête ethnobotanique

L'interview au près de deux tradipraticiens de santé a permis de confirmer l'usage traditionnel de *W. indica* dans la prise en charge de l'asthme au Burkina Faso. Le tableau I indique les informations collectées en rapport avec la nosographie de l'asthme ou les éléments de diagnostic traditionnel, le mode de préparation et le schéma thérapeutique.

Tableau I : Données sur l'usage traditionnel de *W. indica* collectées auprès de deux tradipraticiens de santé

Nature de l'information	Tradipraticien de santé 1	Tradipraticien de santé 2
Nosographie de l'asthme	Toux dites « rebelles », Difficultés respiratoires, Sifflements Notion de chronicité	
Mode de préparation de la recette	- Plante entière ou les parties aériennes séchées et découpées de manière grossière - décoction de 50 g environ de drogue végétale pendant 20 minutes	- racines fraîches lavées - décoction des racines - cuire de la viande de pintade dans le décocté de racines le tout dans une marmite en terre cuite
Schéma thérapeutique	Un ½ verre du décocté matin et soir Ajout de miel facultatif	Manger la chair de la pintade Boire le bouillon en deux jours
Autres usages de <i>Waltheria indica</i>	Reflux et aigreurs gastriques Soins des nourrissons	Non enregistrés
Autres plantes utilisées dans la prise en charge de l'asthme	<i>Adansonia digitata</i> <i>Euphorbia hirta</i> <i>Ficus gnaphalocarpa</i> <i>Cassia occidentalis</i> <i>Ocimum basilicum</i>	Non enregistrées

2.2. La caractérisation histochimique

Les tests d'identification *in situ* ont révélé la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de tanins aussi bien dans la tige (fig.2) que la feuille (fig.1) de *Waltheria indica*.

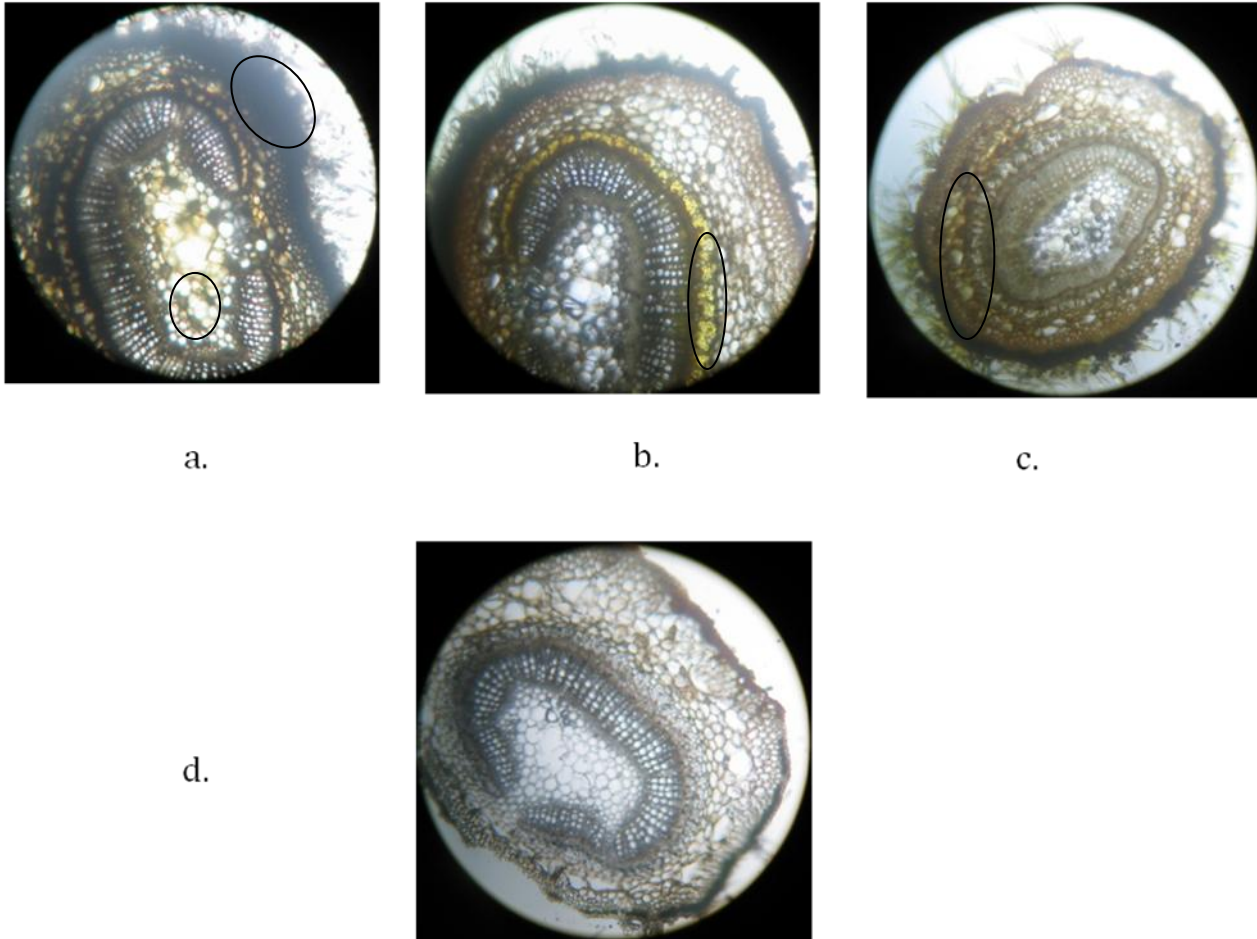


Fig. 1 : Coupes colorées (a, b et c) et non colorée (d) de feuille de *W. indica* observées au microscope optique (x10)

a. taches noires indiquant la présence de tanins ; b. taches jaune orangées indiquant la présence d'alcaloïdes ; c. taches jaunes indiquant la présence de flavones.

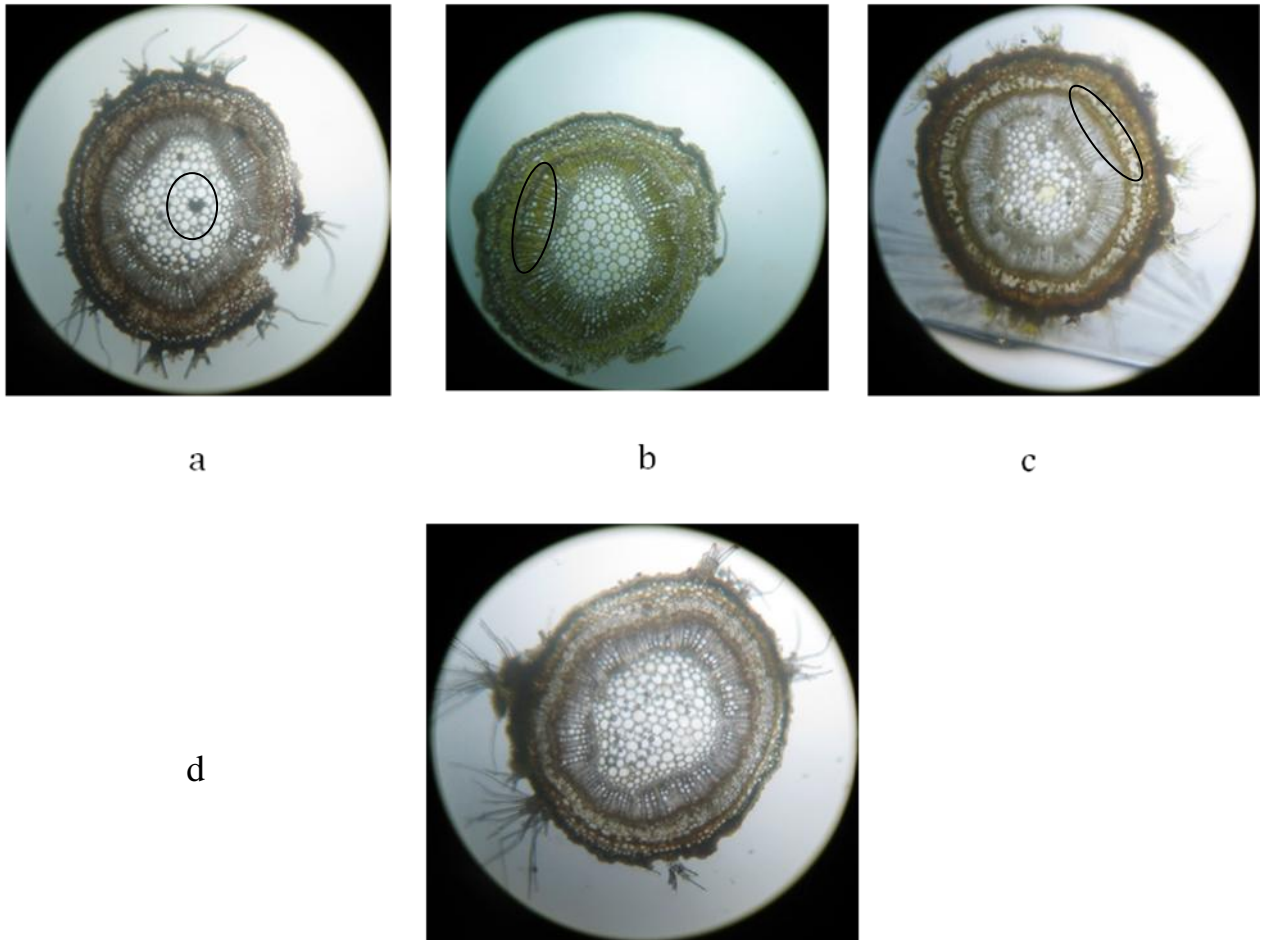


Fig. 2 : Coupes colorées (a, b et c) et non colorée (d) de tige de *W. indica* observées au microscope optique (x10)

a. taches noires indiquant la présence de tanins ; b. taches jaune orangées indiquant la présence d'alcaloïdes ; c. taches jaunes indiquant la présence de flavones.

2.3. Les composés isolés à partir de *W. indica*

Le macéré hydro alcoolique est fractionné (fig.3) avec des solvants de polarité croissante respectivement avec du n-hexane (F_1), du dichlorométhane (F_2) et de l'acétate d'éthyle (F_3), la fraction résiduelle étant (F_4). F_3 est fractionné sur colonne de silice avec un système de solvants allant du dichlorométhane 100% (F_{31}), dichlorométhane/méthanol 9 :1 (F_{32}) ... à du méthanol 100% (F_{311}). 100 mL de chaque fraction ont été recueillis. Plusieurs composés ont été isolés à partir de la fraction F_3 dont l'épicatéchine (lévogyre) (fig. 4).

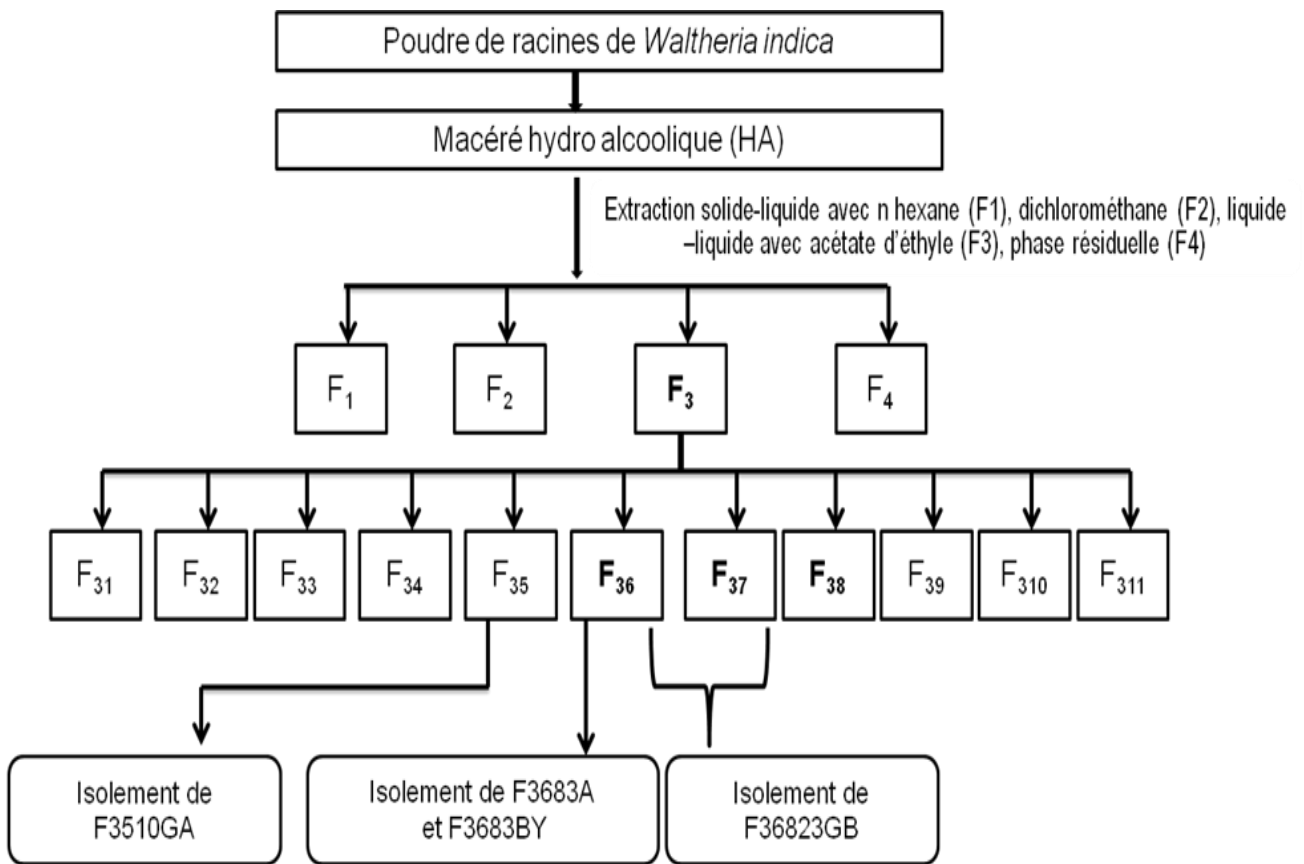
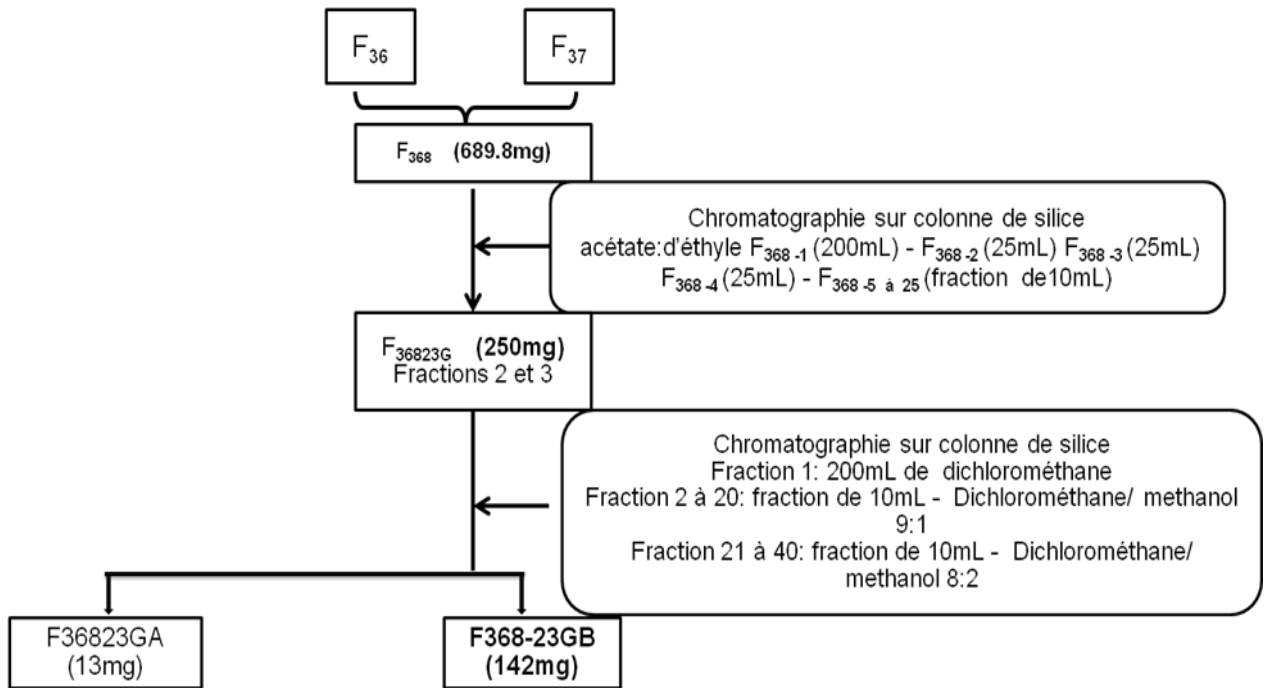
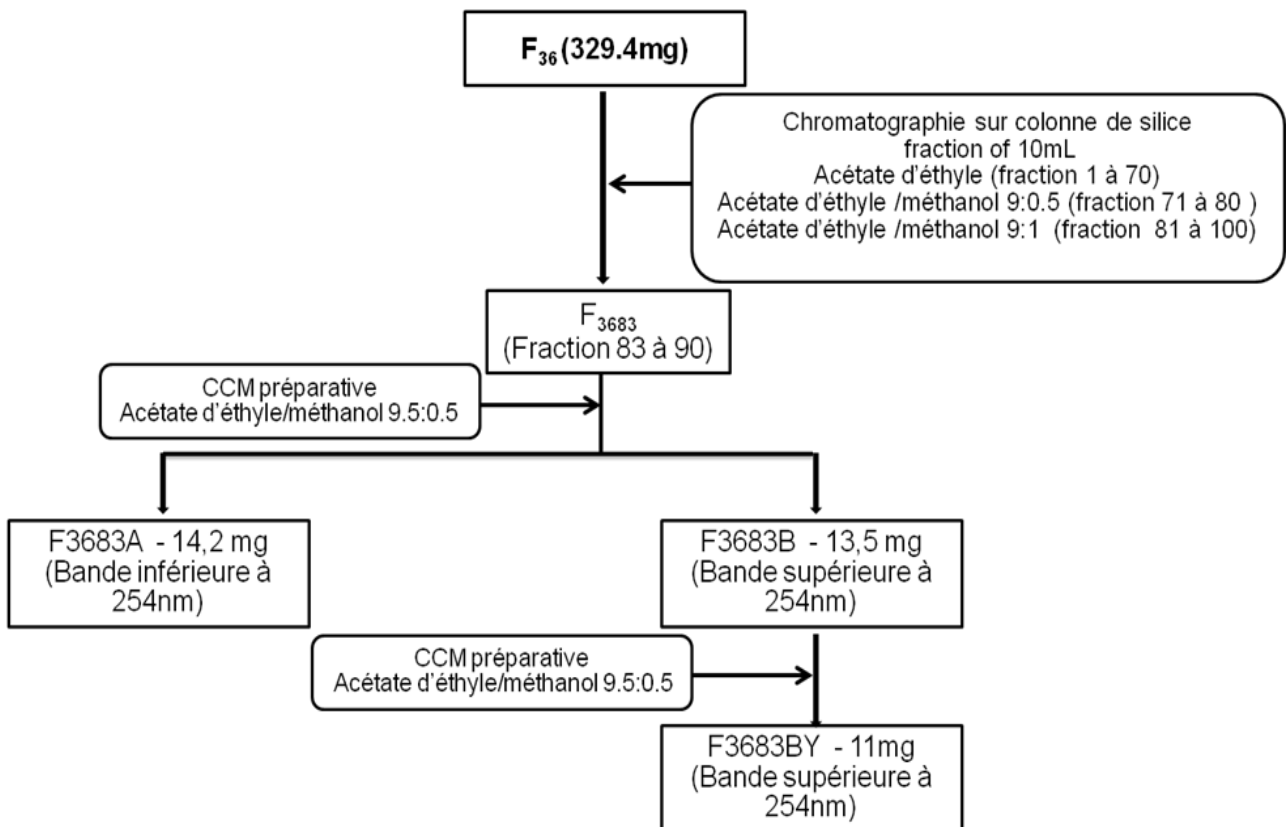


Fig. 3 : Partition du macéré hydro alcoolique et de la fraction F₃.



a.



b.

Fig. 4 : Isolement de F36823GB (a.); F3683A (b).

Les données chromatographiques et spectrales (RMN du proton et carbone, spectre de masse) de F3683A sont fournies en annexe 6. L'identification de ce composé est en cours.

2.4. L'évaluation de l'interaction de *waltheria indica* avec la LOX IB de soja

L'extrait hydro alcoolique de *W. indica*, ses fractions (fig. 5) et l'épicatechine (fig.6) inhibaient de manière dose dépendante l'activité de la LOX-IB ($CI_{50} = 210 \mu M$).

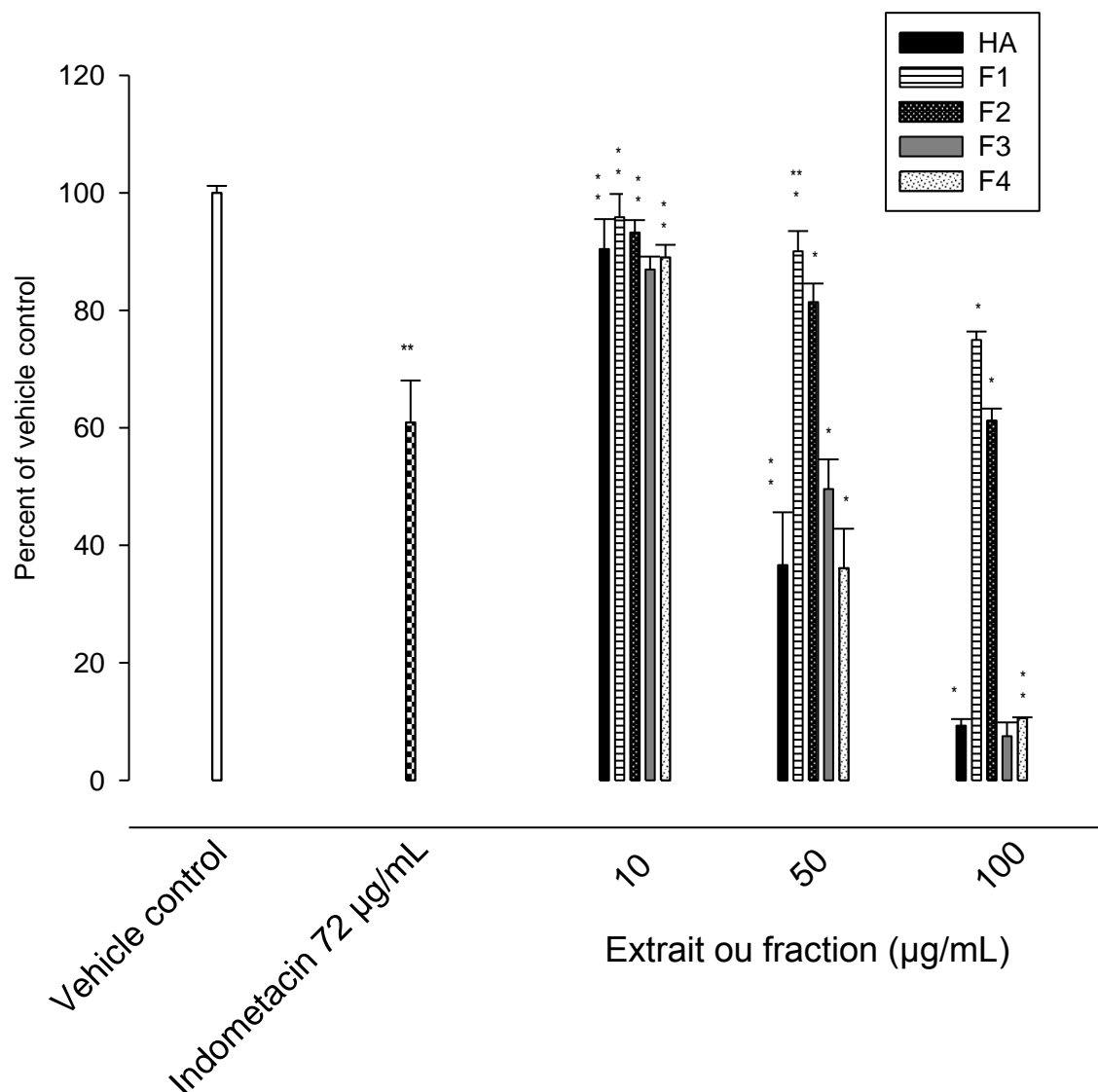


Fig. 5: Activité de la LOX-IB en absence et en présence de l'extrait hydro alcoolique, de ses fractions F₁, F₂, F₃, F₄ (n=3).

Indométacine vs Vehicle control; Fraction vs Indométacine : * P<0,05, Test de Student.

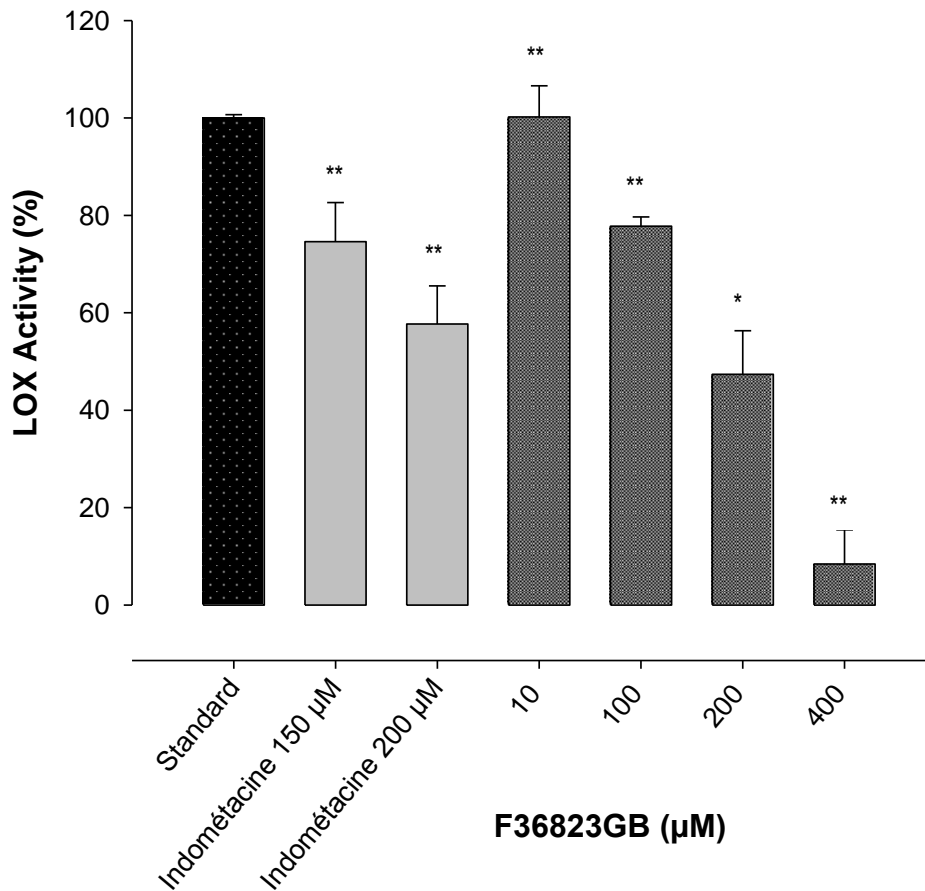


Fig. 6: Activité de la LOX-IB en absence et en présence de F36823GB (n = 6).

Indométacine vs Vehicle control ou Standard; F36823GB vs Indométacine : * P<0,05, Test de Student.

2.5. L'évaluation de la toxicité générale aiguë de l'extrait hydro alcoolique de *W. indica*

Tableau II : Résultats de l'étude de la toxicité générale aiguë de l'extrait hydro alcoolique des racines de *W. indica* (n=6 par lot)

lot	Dose (mg/kg)	Nombre de morts	Pourcentage de morts
temoin	-	0	0
1	10	0	0 (8,33)
2	120	2	33,33
3	360	4	66,66
4	600	4	66,66
5	900	6	100 (91,66)

La DL₅₀ par voie intra péritonéale chez la souris calculée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon est de 210±82 mg/kg (fig.7).

Sur l'échelle de valeur de toxicité de Hodge et Sterner, l'extrait est considéré comme une substance modérément toxique (50 à 500 mg/kg). L'indice de sécurité de l'extrait (DL95/DL5) déterminé est de 35.

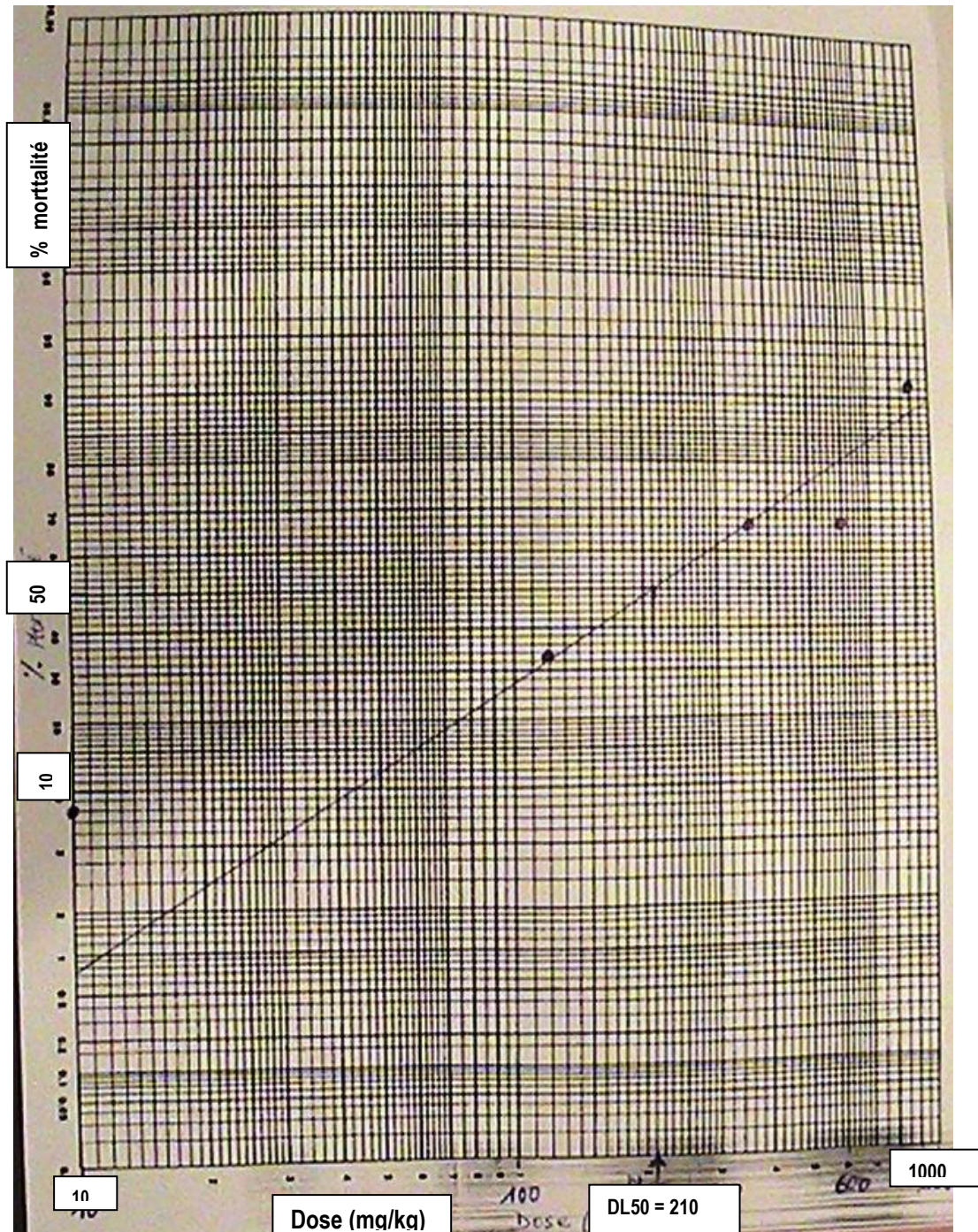


Fig. 7 : Courbe de mortalité des souris swiss ayant reçu des doses croissantes d'extrait hydroalcoolique de racines de *W. indica*

Le toxidrome causé par l'extrait hydro alcoolique des racines de *W. indica* chez la souris par voie intra péritonéale comprenait au niveau:

- de l'appareil urinaire : des mictions ;
- du système neuromusculaire : une activité diminuée, la prostration ;
- respiratoire : des gasps précédant la mort ;
- Système nerveux central : le léchage des pattes, les convulsions précédant la mort.

Il a été observé aussi un refus d'alimentation dans les lots ayant reçu des doses supérieures ou égales à 120 mg/Kg.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

1. Enquête ethnobotanique et caractérisation des groupes chimiques

L'entrevue avec les tradipraticiens confirme l'utilisation de *W. indica* seul ou en association avec d'autres drogues, en médecine traditionnelle pour la prise en charge de l'asthme. Elle révèle aussi que la plante entière ou les parties aériennes sont utilisées par les tradipraticiens pour soigner l'asthme. Les enquêtes antérieures (Nacoulma, 1996 ; Traoré, 1983) avaient montré que les racines de la plante seulement étaient utilisées.

Les symptômes majeurs (toux, dyspnée et sifflements respiratoires) de l'asthme sont bien cités par les tradipraticiens pour décrire l'asthme. L'absence de registre de suivi des patients tenu par les tradipraticiens ne nous a pas permis d'évaluer l'efficacité et la tolérance clinique des recettes traditionnelles.

L'étude histochimique montre la présence de tanins, de flavonoïdes et d'alcaloïdes aussi bien dans la tige que la feuille de *W. indica*. Les mêmes groupes chimiques ont été mis en évidence dans les racines de la plante (Zongo, 2007). Ce qui pourrait expliquer l'utilisation de toutes les parties de la plante par les guérisseurs traditionnels.

2. Evaluation pharmacologique et isolement bioguidé

2.1. Interaction avec les enzymes : PLA₂, 5-LOX, LOX IB, PDE4A1 α

L'extrait hydroalcoolique, les fractions dérivées et un seul composé isolé de la plante (l'épicatéchine) ont été testés sur l'activité des enzymes. Un effet inhibiteur par les extraits de *W. indica* et l'épicatéchine de manière dose-dépendant était observable vis-à-vis de la PLA₂, la 5-LOX et la LOX IB. L'effet anti PDE4A1 α des fractions n'était cependant pas dose dépendant. L'inhibition de la 5-LOX animale (IC₅₀ = 15,8 μ M pour l'épicatéchine) paraît plus importante que la LOX IB de soja (IC₅₀ = 154,7 μ M pour l'épicatéchine). Cela laisse entrevoir une sélectivité vis-à-vis des différents types de LOX.

L'effet inhibiteur de l'extrait hydro alcoolique, de certaines fractions et de l'épicatéchine était plus important que le contrôle indométacine (PLA₂ et LOX IB) ou le zileuton (pour la 5-LOX) mais à des concentrations supérieures ou égales à celles du contrôle positif. Par exemple pour l'épicatéchine, au moins 30 μ M produisait une inhibition supérieure au contrôle zileuton (0,5

µM) vis-à-vis de la 5-LOX ; 200 µM d'épicatechine vs 200 µM d'indométacine pour la LOX IB ; plus de 1700 µM d'épicatechine vs 50 µM d'indométacine pour la PLA₂).

Un effet anti inflammatoire de *W. indica* avait été décrit par Rao et coll. (2005) qui ont mis en évidence une inhibition de la production de NO et de cytokines par trois flavonoïdes isolés de la plante ((-)-épicatechine, tiliroside, quercétine). Notre étude montre cependant qu'une inhibition de la PLA₂ et de la 5-LOX participe à l'effet anti inflammatoire de *W. indica*. Schewe et coll. (2002) avaient montré que l'épicatechine (levogyre) inhibait la 5-LOX (IC₅₀ = 22 µM).

Le mécanisme précis de l'inhibition de la 5-LOX par les extraits ou l'épicatechine reste à élucider sachant que plusieurs mécanismes sont évoqués dans la littérature :

- Les réactions type redox : il s'agit de réaction d'oxydo-réduction pouvant intéresser le cofacteur enzymatique, l'ion ferreux (Fe²⁺) qui en présence d'acides gras hydroperoxydes (HETE et HpETE) est transformé en ion ferrique (Fe³⁺) pour donner la forme active de la 5-LOX (Oliver, 2002). Les inhibiteurs de la 5-LOX type redox peuvent entraîner la régénération de la forme inactive de la 5-LOX en réduisant le fer ferrique.
- le blocage de la protéine activatrice de la 5-LOX (FLAP) (Chung, 1995)
- la chélation du fer du site actif de l'enzyme ;
- l'inhibition compétitive ou non, réversible du site actif de la 5-LOX (Arockia Babu et coll., 2002).

D'après Grimm et coll. (2006), les composés inhibiteurs de la 5-LOX disposant d'un groupe fonctionnel type phénol, hydroxamate ou N-hydroxyurée agiraient par un mécanisme type redox ou par la chélation du fer du site actif enzymatique.

La réduction du fer ferrique, sa chélation et l'inhibition directe du site actif de l'enzyme ont été décrites aussi avec la LOX IB de soja. Les inhibiteurs de radicaux libres comme les flavonoïdes réduiraient par ailleurs l'activité de la LOX IB par piégeage des radicaux acides gras libres, en plus de l'interaction avec le site actif de l'enzyme (Fauconnier et coll., 1997).

2.2. Interaction avec la trachée isolée de rat

Les résultats de l'étude sur la trachée de rat constituent la première mise en évidence de l'effet relaxant de *W. indica* sur la trachée. L'extrait hydro alcoolique, la fraction acétate d'éthyle (F3) et la plupart des fractions dérivées inhibaient les contractions induites par l'acétylcholine. Des composés isolés n'ont pas pu être testés sur la trachée. Néanmoins, des auteurs ont montré que la dextrocatéchine ((+)-catéchine) inhibait de manière dose dépendante les contractions induites par une solution dépolarisante sur le jéjunum de lapin, le fundus de rat et la trachée de cobaye. Ces auteurs avaient évoqué comme mécanisme d'action un antagonisme calcique (Ghayur et coll., 2007).

Plusieurs mécanismes peuvent conduire à la relaxation bronchique. Ce sont entre autres, la stimulation des récepteurs adrénergiques bêta-2 qui sont exprimés sur la trachée du rat, une activité méthyl xanthine like par inhibition de la phosphodiesterase, la libération de NO par le biais de l'activation de la NO synthétase ou par la libération de prostacyclines.

Finallement, les résultats de l'étude sur la trachée fournissent une base pharmacologique de l'utilisation traditionnelle de *W. indica* dans l'asthme, notamment pour rompre la bronchoconstriction en période de crises.

3. Evaluation toxicologique

La DL₅₀ de l'extrait hydro alcoolique des racines de *W. indica* (210 mg/kg) indique que la plante n'est pas dénuée de toxicité. L'extrait est classé comme un produit modérément toxique sur l'échelle de Hodge et Sterner. Mohammed et coll. (2007) avaient trouvé une DL₅₀ de 69 mg/kg chez la souris par voie intrapéritonéale pour l'extrait aqueux des racines. Ce qui correspond également à un produit modérément toxique sur la même échelle de toxicité. Hamidu et coll. (2008) trouvaient cependant que l'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de la plante était légèrement toxique chez la souris par voie intrapéritonéale (DL₅₀ = 875 mg/kg).

Les données de sécurité d'emploi concernant l'épicatéchine (lévo) indiquent que celui-ci n'est presque pas toxique chez la souris par voie intrapéritonéale sur l'échelle de Hodge et Sterner (DL₅₀ = 1000 mg/kg) (*fiches de données de sécurité Sigma-Aldrich Version du 16.11.2012 et Santa Cruz Biotech. Version du 21.10.2009*). Ces données suggèrent que *W. indica*

contiendrait d'autres composés qui participeraient à l'action toxique voire aussi pharmacologique de la plante. Elles confirment la nécessité de la poursuite des investigations chimiques et biologiques à la recherche d'autres molécules bioactives. Une synergie d'action de molécules bioactives présentes dans l'extrait pourrait expliquer une réponse biologique plus importante avec l'extrait brut qu'avec un composé isolé.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif général de cette étude était de caractériser *W. indica* sur le plan chimique et pharmacologique en relation avec l'usage traditionnel contre l'asthme. Une entrevue avec deux tradipraticiens a permis de confirmer cet usage et de décrire l'emploi de la plante seule ou en association avec d'autres drogues sous forme de décocté.

Les investigations chimiques ont permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes et de polyphénols dans les différentes parties de la plante. Plusieurs composés ont été isolés à partir de l'extrait hydro alcoolique des racines de la plante. Un seul a été identifié comme étant l'épicatéchine (lévogyre).

Au niveau pharmacologique, la plante possède des propriétés anti inflammatoire et bronchorelaxante. Sur le plan moléculaire, l'extrait hydroalcoolique des racines de *W. indica*, les fractions initiales qui en sont issues ainsi que l'épicatéchine isolée de la plante inhibaient *in vitro* l'activité de la 5-LOX, la LOX-IB de soja et la PLA2 de manière dose dépendante. Un effet dose dépendant des fractions n'a pas été mis en évidence pour l'inhibition de la PDE4A1a. Sur le plan tissulaire, l'extrait hydroalcoolique, la fraction acétate d'éthyle et les fractions dérivées de celle-ci, inhibaient les contractions induites par l'acétylcholine sur la trachée de rat *ex vivo*. Un effet dose dépendant était observé. Ces données pharmacologiques fournissent une base de validation de l'usage traditionnel de *W. indica* dans la prise en charge des composantes anti inflammatoire et bronchorelaxante de l'asthme.

Toutefois, il serait nécessaire de compléter la validation de l'usage traditionnel dans l'asthme. Les futures investigations précliniques devraient ainsi concerner :

- l'isolement et l'identification d'autres composés à partir de la fraction acétate d'éthyle ;
- leur caractérisation pharmacologique et toxicologique éventuellement par :
 - l'évaluation de leurs effets et leur mode d'action sur la trachée, la 5-LOX et la PLA2 ;
 - l'évaluation de leurs effets anti asthmatiques *in vivo*
 - l'étude de la toxicité de ces molécules bioactives.

En dernière analyse, un monitoring des patients traités par les tradipraticiens de santé permettra l'évaluation de l'efficacité et de la tolérance clinique des recettes traditionnelles, et donc fournir une évidence ethnomédicale dans l'usage anti asthmatique de la plante.

ANNEXES

Annexe 1

Protocole d'histochimie

Les propriétés médicinales sont conférées aux plantes par la présence de certains métabolites secondaires. Ces composés chimiques se répartissent en trois grands groupes à savoir les polyphénols, les composés terpéniques et les alcaloïdes. Les composés polyphénoliques tels que les tanins, les flavones, les anthracénosides; les composés triterpéniques/stéroïdiques et les alcaloïdes sont localisés *in situ* par la méthode de Ciulei, 1982.

Coupe des organes (tige, feuille)

Les coupes sont réalisées à main levée.

- Un morceau de moelle de sorgho de forme cylindrique est coupé longitudinalement: on obtient alors deux demi-cylindres.
- Un sillon est creusé à l'intérieur de chaque demi-cylindre afin de pouvoir loger convenablement l'organe végétal à couper
- Des coupes sont effectuées perpendiculairement à l'axe du cylindre contenant le matériel végétal.

Réactifs

- FeCl₃ 1%
- NaOH 5%
- HCl 2%
- Réactif de DRAGENDORFF

La méthode de localisation est basée sur des tests de coloration *in situ*.

Localisation des polyphénols

➤ Localisation de flavones (réaction de Shibata)

Les coupes les plus fines sont montées entre lame et lamelle dans 2 à 3 gouttes d'une solution de NaOH 5%. La présence des flavones est matérialisée par des tâches jaunâtres.

➤ Localisation des tanins

Les coupes les plus fines sont montées directement entre lame et lamelle dans 2 à 3 gouttes de FeCl_3 1%. Des tâches bleues noirâtres sont observées en présence des tanins galliques tandis que des tâches vertes noirâtres sont observées en présence des tanins catéchiques.

Localisation des alcaloïdes

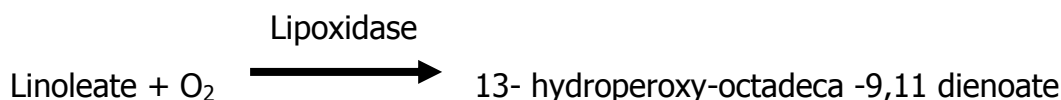
Les coupes les plus fines sont laissées quelques minutes dans une solution de HCl 2%. Les coupes sont ensuite montées dans 2 à 3 gouttes de réactif de Dragendorff entre lame et lamelle pour observation. La présence des alcaloïdes est attestée par l'apparition de tâches jaunes orangées.

Les observations sont faites aux grossissements $\times 10$ et $\times 40$ à l'aide d'un microscope optique (Motic BA200) couplé à un appareil photo (Canon PowerShot A650 IS).

Annexe 2

Test anti LOX IB

Principe de mesure de l'activité de l'enzyme : L'oxydation par la lipoxigénase des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Les diènes conjugués absorbent à 232-234 nm. Ils peuvent être déterminés par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'onde. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à l'activité enzymatique.



La cinétique de l'activité de la LOX-IB est mesurée selon une méthode spectrométrique UV déjà décrite (Aziz-ur-rehman et coll., 2005 ; Sharif A. et coll., 2005 ; Kumaraswamy M.V. et coll., 2008 ; Albano S.M. et coll., 2012).

Matériel et réactifs

- Spectrophotomètre UV
- Cuve en Quartz de 1,5mL
- Micropipettes de 1000 μ L et 100 μ L
- Acide borique (Sigma)
- NaOH (Prolabo)
- Acide linoléique (Sigma, pureté>99%)
- Lipoxigénase type I-B (Sigma, 158,000unités/mg)
- Extrait et fractions à tester
- Eau distillée
- Substance de référence : indométacine (Sigma)

Préparation de quelques réactifs

- Préparation de la solution de lipoxigénase type I-B (1mg =158,000 Unités)

Solution stock 158,000 unités/mL

L'enzyme est dissoute dans le tampon borate glacé ou refroidi soit 0,001g dans 1mL de tampon glacé ou refroidi.

Solution à 3000 unités /mL : La solution stock est diluée avant le test avec de l'eau distillée glacée pour ramener **3000** Unités/mL soit une dilution au $3000/158,000 = 3/158$

Solution de travail à 1500 unités/mL : dilution au $\frac{1}{2}$ de la solution à 3000 Unités/mL

- Préparation de la solution d'acide linoléique 0,01%

Dissoudre 0,1 ml d'acide linoléique [Sigma L1376] [PM 280,45] dans 6mL d'éthanol. Ajouter 10 ml d'eau distillée glacée.

Diluer au $\frac{1}{6}$ avec le tampon borate et vérifier que l'absorbance de la solution est entre 0,20 et 0,21. Agiter et conserver dans la glace.

Solution 0,1% : dilution au $\frac{1}{6} = 1\text{mL} + 5\text{mL}$ de tampon borate

Solution 0,01% : dilution au $\frac{1}{10}$ de la solution 0,1% avec le tampon borate

Dosage : Spectrophotomètre double faisceau (Marque Shimadzu)

1. mesurer l'absorbance de l'acide linoléique 0,01% à 234nm (vérifier qu'elle n'est pas supérieure à 0,2)
2. rincer et ajouter successivement :
 - Dans la cuve échantillon
 - acide linoléique 0,01% : 500 μL
 - composé testé ou solvant si c'est l'activité de référence qui est mesurée (méthanol 80%) : 50 μL
 - Dans la cuve « blanc »
 - acide linoléique 0,01% : 500 μL
 - composé testé ou solvant (éthanol 60%) : 50 μL
 - tampon borate : 500 μL
3. agiter
4. incubé pendant 3 minutes
5. faire l'autozéro
6. ajouter dans la cuve échantillon, la solution de 5-LOX 1500 Unités/mL : 500 μL
7. suivre l'absorbance chaque minute pendant 6 minutes à 234nm

Annexe 3

Etude de la toxicité générale aiguë (méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon, 1947)

Principe : Des souris mâles Swiss pesant entre 20 et 32 g et préalablement mises à jeun pendant 18 heures ont été utilisées.

La toxicité générale aiguë immédiate (survenant dans les 2 heures) ainsi que la toxicité aiguë survenant dans les 24 heures sont étudiées :

- Pendant les 2 premières heures, puis dans les 24 heures, le comportement des souris est observé (par rapport au lot témoin), les signes d'intoxication sont notés, et les conditions de l'environnement (température, humidité du laboratoire) sont répertoriées
- Au bout de 2 heures, puis de 24 heures d'observation, les animaux sont pesés à nouveau et le nombre de morts est compté dans chaque lot. Le pourcentage de morts est calculé.
- Après les 2 heures, les animaux sont nourris avant de poursuivre le test.

Choix des doses à tester : Pré test (9 souris)

Un pré test a permis de déterminer les doses de l'extrait de la plante à administrer. Trois (3) lots de 3 souris constitués reçoivent respectivement chacun, par voie intra péritonéale, 10 mg / Kg (lot I), 100 mg / Kg (lot II) et 900 mg / Kg (lot III) d'extrait.

Les concentrations des extraits administrés sont préparées à partir de l'extrait mère par des dilutions successives en tenant compte des doses à administrer et du volume maximal à administrer chez la souris par voie intra péritonéale (1 ml).

En fonction des résultats, des doses intermédiaires, entre la dose qui n'a pas causé de mort et celle qui a causé la mort de toutes les souris, sont sélectionnées.

Après cet essai, 6 lots de 6 souris ont été constitués. Le premier lot considéré comme lot témoin reçoit le solvant de l'extrait et les autres lots reçoivent la drogue végétale par voie intra péritonéale à des doses croissantes (10, 120, 360, 600 et 900 mg/Kg). La DL₅₀ est calculée selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon.

La toxicité aiguë a été évaluée selon l'échelle de valeur de toxicité de Hodge et Sterner.

L'indice de sécurité (DL95/DL5) a été déterminé pour rendre compte de la maniabilité de l'extrait.

Éléments d'orientation pour la description du toxidrome

- Appareil respiratoire : dyspnée, halètement, apnée
- Peau : Pilo-érection, érythème, œdème
- Appareil digestif et urinaire : Ptyalisme (sécrétion salivaire excessive), diarrhées, urine et selles sanglantes
- Appareil cardiovasculaire : hémorragies
- Système neuromusculaire : Activité accrue ou diminuée, tremblements, convulsions, prostration, queue dressée, tonus musculaire accru
- Système nerveux central : abattement, prostration, position assise tête haute, regard fixe, tête penchée, toilettage excessif, rongement des extrémités, irritabilité, comportement hostile (agressivité ou réactions de défense), crainte, activités anormales.

Annexe 4

Test d'inhibition de la phosphodiesterase type 4A1 α

L'activité des phosphodiesterases est évaluée à l'aide du kit d'essai PDE4A1 de BPS Bioscience (N° catalogue 60340)

Principe : Le test est basé sur la fixation à un agent liant, d'un nucléotide monophosphate fluorescent généré par la réaction de dégradation de l'AMPcyclique marqué, sous l'action de la PDE4A1.

Le ligand ajouté à la réaction entraîne un changement de la polarisation de la fluorescence qui peut être mesurée en utilisant un lecteur de fluorescence.

Longueur d'onde d'excitation : 485nm (475-495)

Longueur d'onde d'émission : 528nm (518-538)

L'activité enzymatique est mesurée en absence des composés à tester (activité de référence Ao) et en présence des différentes concentrations des composés à tester (As).

Procédure et interprétation

Etape 1

- Préparer les composés à tester : extraits et substance de référence
- Dilution au 1/100 de la solution stock du substrat AMPc (20 μ M à 200nM)
- Dilution de la PDE4A1 α de 0,2mg/mL à 0,1-0,15ng/ μ L (2-3ng/réaction)
- Déposer les réactifs dans les puits selon la procédure suivante :

	Puits standard	Activ	Blanc (contrôle négatif)	Contrôle négatif AMPc	Contrôle positif	Puits échantillon
PDE4A1 α	20 μ L	-	-	-	20 μ L	20 μ L
Fam-AMPc (substrat)	25 μ L	-	-	25 μ L	25 μ L	25 μ L
Substance référence	-	-	-	-	5 μ L	-
Extrait	-	-	-	-	-	5 μ L
Solvant extrait	5 μ L	-	-	-	-	-
Tampon PDE	-	-	50 μ L	25 μ L	-	-
Volume total	50 μ L	-	50 μ L	50 μ L	-	50 μ L

- Incuber à la température ambiante pendant 1h

Etape 2 :

- a. Diluer le ligand au 1/100 avec le diluant de ligand
- b. Ajouter 100 μ L du ligand dilué dans chaque puits
- c. Incuber à la température ambiante pendant 1 heure sous agitation légère.
- d. Lire la fluorescence de l'échantillon au fluorimètre avec une excitation à 475-495nm (485nm) et la longueur d'onde de détection de la lumière  mise à 518-538nm (528nm).

Annexe 5

Test anti phospholipase A₂

Principe de mesure de l'activité de l'enzyme :

L'activité de la PLA₂ est déterminée par fluorimétrie en présence de sérum albumine en utilisant un phospholipide marqué avec un groupe pyrényl. L'hydrolyse du phospholipide par la PLA₂ libère le groupe pyrényl (acides pyrényl décanoïque) qui n'est soluble dans le milieu réactionnel que dans le sérum albumine où il se lie à l'albumine. La fluorescence du pyrène peut alors être observée et suivie dans le temps à l'aide d'un fluorimètre.

Longueur d'onde d'excitation : 342 nm (largeur = 4 nm)

Longueur d'onde d'émission : 398 nm

Température = 37°C

Triplicate

Lecture sur 6 minutes avant ajout du calcium

Lecture pendant 6 minutes après ajout du calcium

Réactifs

- Phospholipide marqué au pyrène : 1-hexadécanoyl-2-(1-Pyrènedécanoyl)-sn-glycéro-3-phosphométhanol, sel de sodium (PM=801,00 ; Interchim, Montluçon, France)
- chloroforme/méthanol (9 :1)
- Phospholipase A₂ de venin d'abeille (Sigma, P9279, 600 à 1800 unités/mg, conservation - 20°C)
- Tris base (Sigma, purété>99%, PM= 121,14g)
- Tris acide (Sigma, PM= 157,6g)
- NaCl (Merck, Pureté>99,5%, PM= 58,44g)
- EGTA (Sigma)
- CaCl₂ (Prolabo, PM= 110,99g)
- Albumine sérique bovine 30% dans 0,85% de NaCl, sans acides gras (Sigma, A9205-10mL, Conservation 2-8°C)

Procédure

Réactif	Concentration finale	Volume	Facteur de dilution	Concentration initiale (solution travail)
Tampon Tris A (50mM, pH7,4 EGTA 1mM ; NaCl 150mM)		120µL		
Sérum albumine	0,1%	20µL	20/200 =1/10	1%
PLA ₂	0,01µg/mL	20µL	20/200 = 1/10	0,1µg/mL
1-hexadécanoyl-2-(1-Pyrènedécanoyl)-sn-glycéro-3-phosphométhanol, sel de sodium	10µg/mL	20µL	1/200	2mg/mL = 2000µg/mL
Diluant extrait ou contrôle ou extrait		10µL	1/20	
Injection du CaCl ₂				
CaCl ₂	10mM	10µL	10/200 = 1/20	200mM = 0,20M

Annexe 6

Tableau I : Résultats du fractionnement de F3 (3 g)

Code fraction	Masse (mg)
F31	5,1
F32	11,7
F33	5,0
F34	7,4
F35	50,9
F36	153,5
F37	446,1
F38	577,9
F39	590,1
F310	597,0
F311	308,0

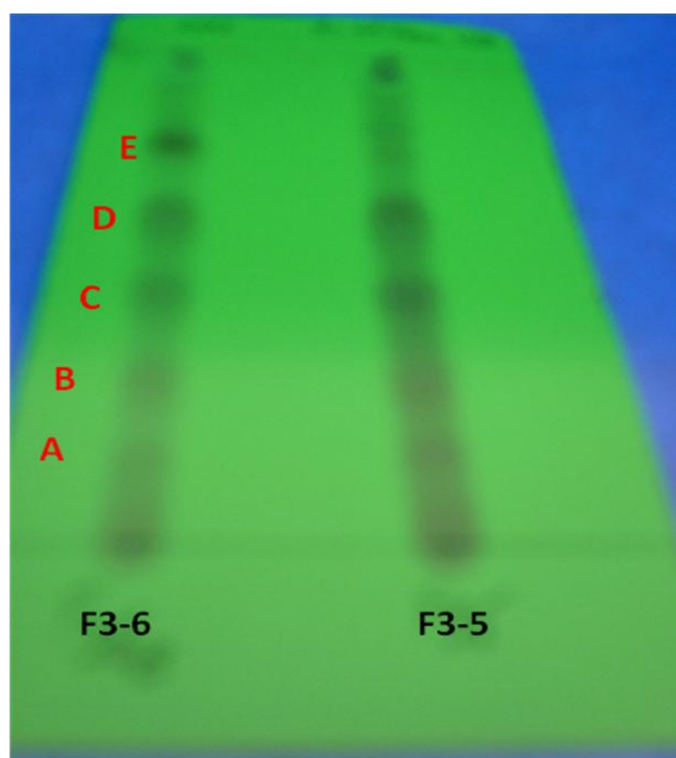
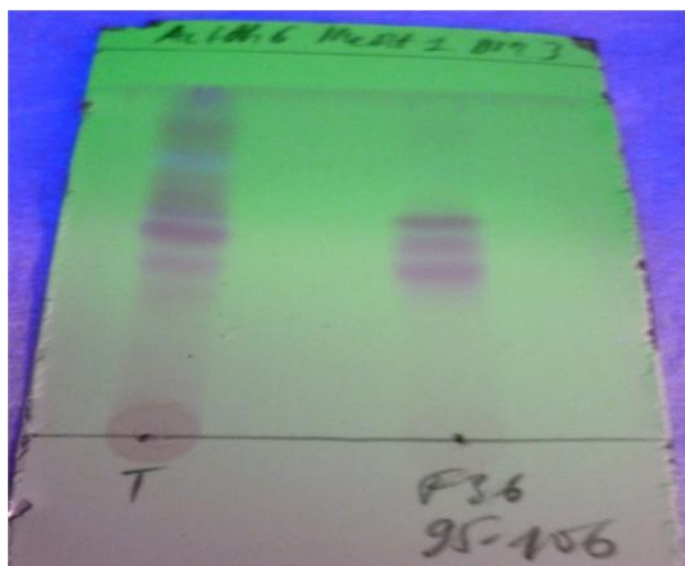


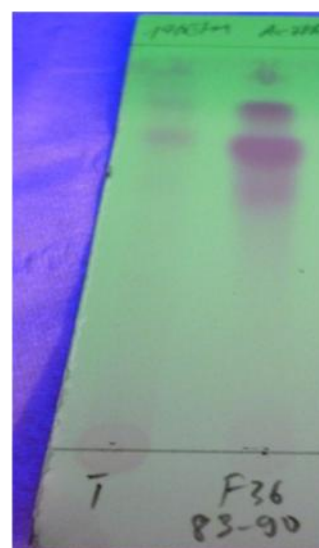
Fig. 1 : CCM des fractions F36 et F35 (Eluant Acétate d'éthyle/eau 7:3 - UV 254 nm)

Tableau II : Regroupement des fractions issues de F36 d'après leur profil CCM

Fractions	Dénomination	Spots ciblés
1 – 10	F36 1-10	-
10 – 18	F36 10-18	-
19 – 24	F36 19-24	-
25 – 26	F36 25-26	-
27 – 32	F36 27-32	-
33 – 34	F36 33-34	-
35 – 50	F36 35 - 50	-
51 – 54	F36 51-54	E
55 – 66	F36 55-65	-
66 – 80	F36 66-80	D
83 - 90	F36 83-90	C, D
91 - 94	F36 91-94	C
95 - 106	F36 95-106	B, C
107 -117	F36 107-17	B

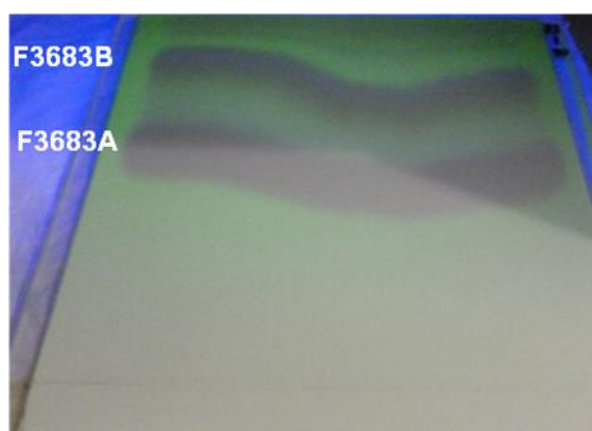


F 36 95-106
Eluant Ac. Et/MeOH/DM 6:1:3

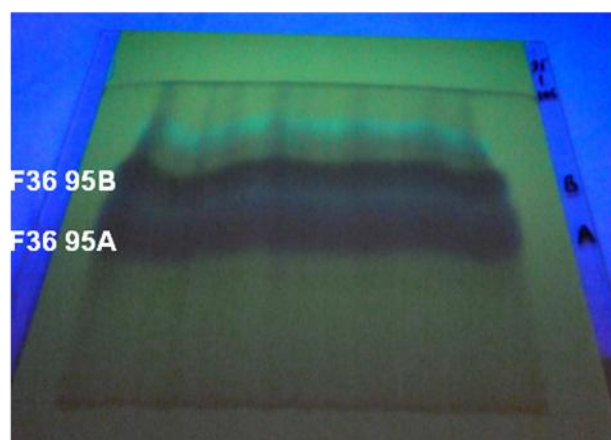


F 36 83-90
Eluant Ac. Et/MeOH 9:1

Fig. 2 : Profil CCM des fractions groupées F36 83-90 et F36 91-95

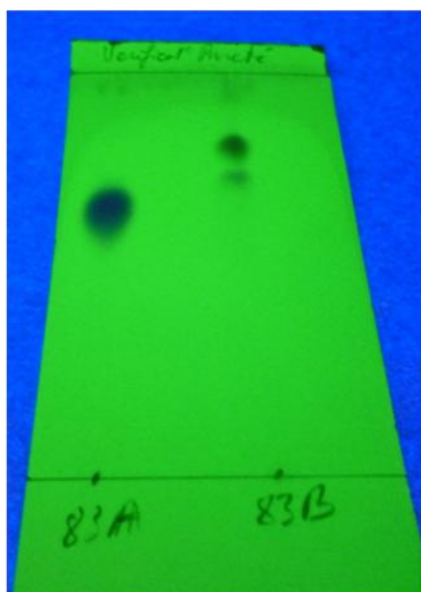


F36 83-90
Eluant Ac.Eth/MeOH 9,5:0,5

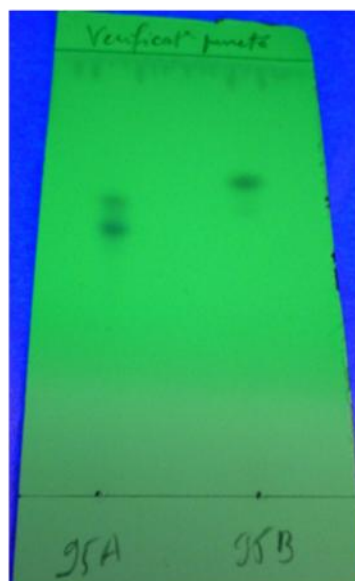


F36 95-106
Eluant Ac. Et/MeOH/DM 6:1:3

Fig. 3 : CCM préparatives des fractions groupées F36 83-90 et F36 91-95



F36 83A et F36 83B
Eluant Ac.Eth/MeOH 9,5:0,5



F36 95 A et F36 95B
Eluant Ac. Et/MeOH/DM 6:1:3

Fig. 4: Vérification de la pureté de F36 83A, F36 83B, F36 95A et F36 95B

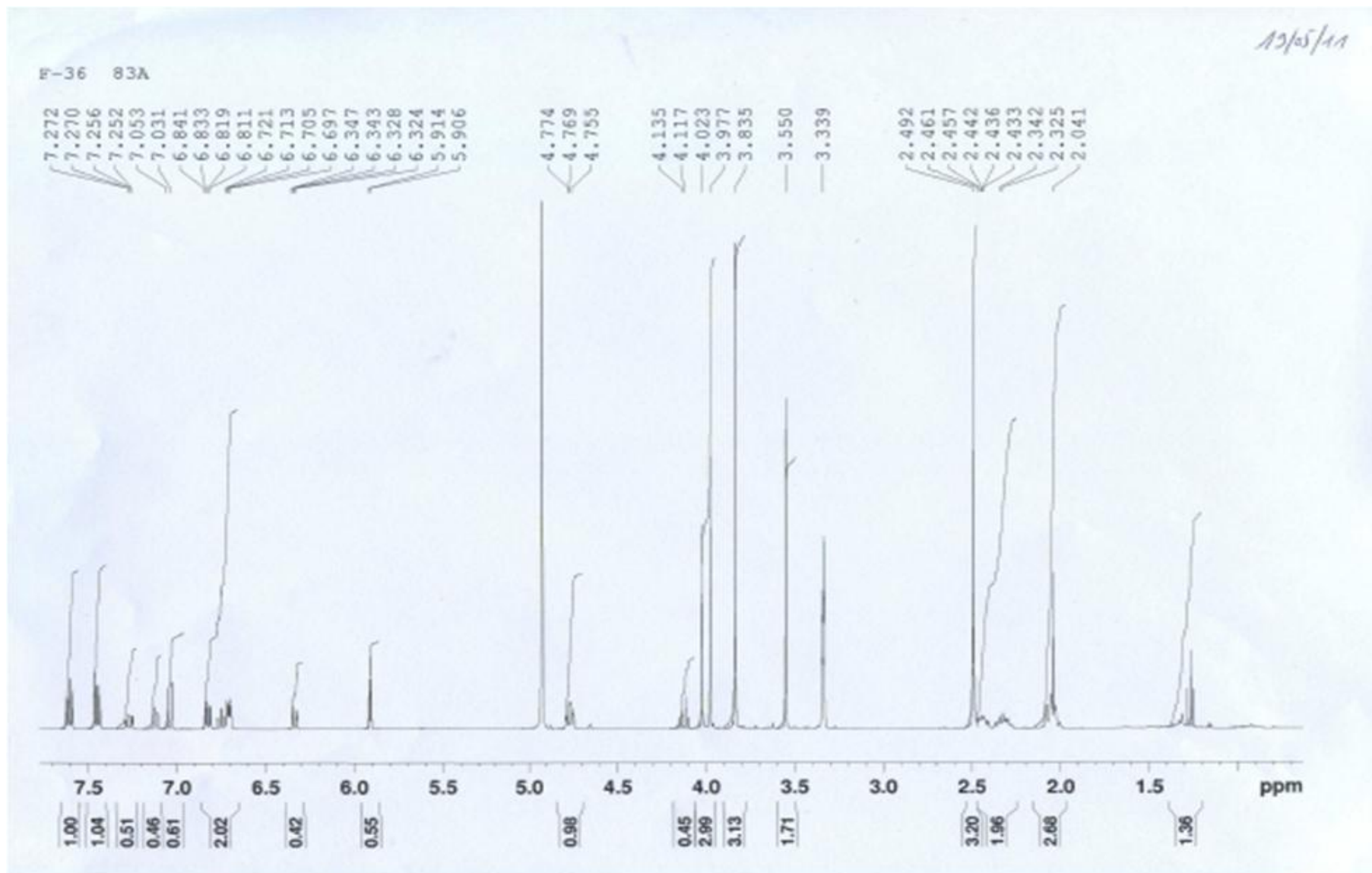


Fig. 5: RMN proton de F3683A

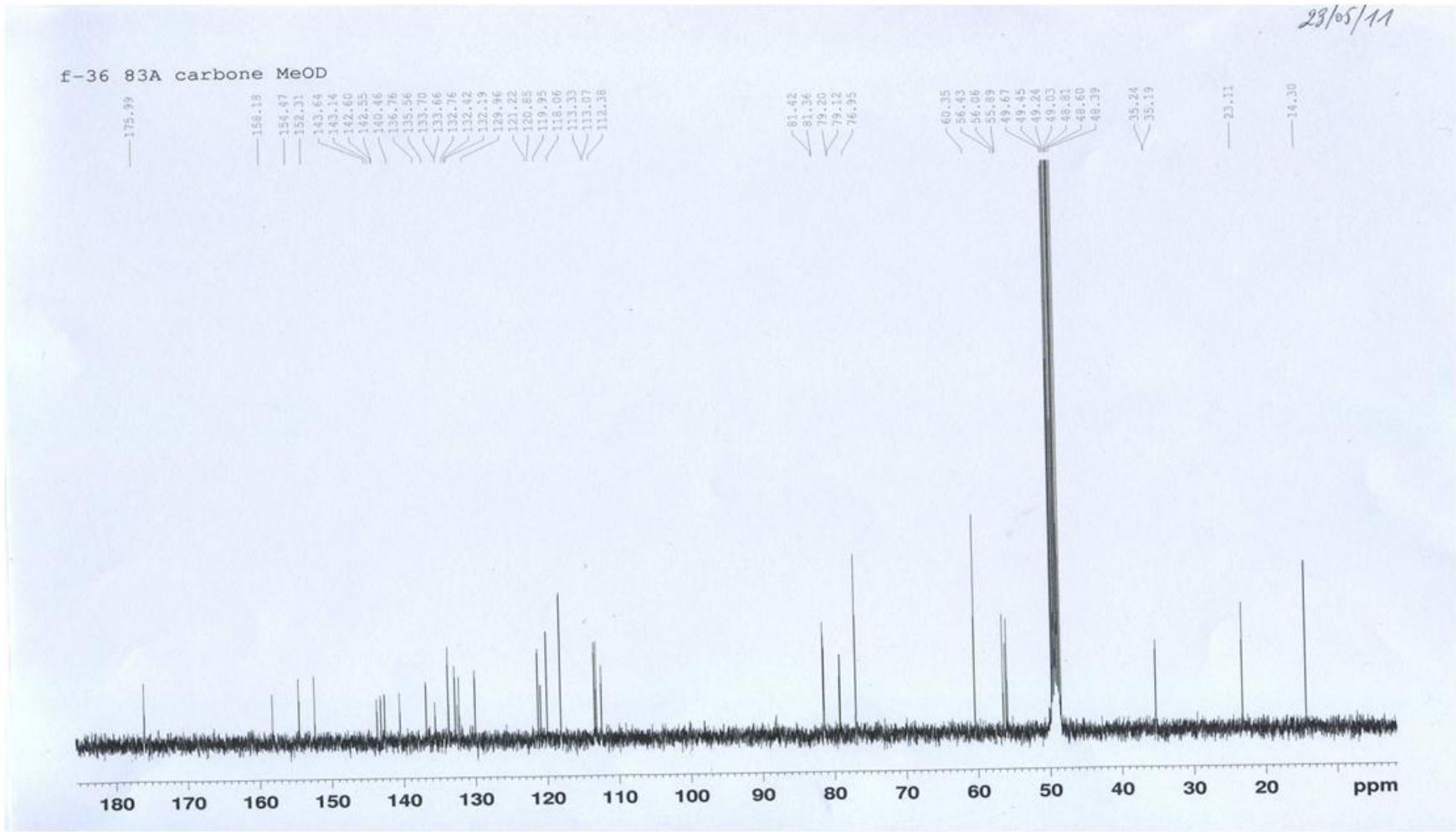


Fig. 6: RMN carbone 13 de F3683A

tel-00949223, version 1 - 19 Feb 2014

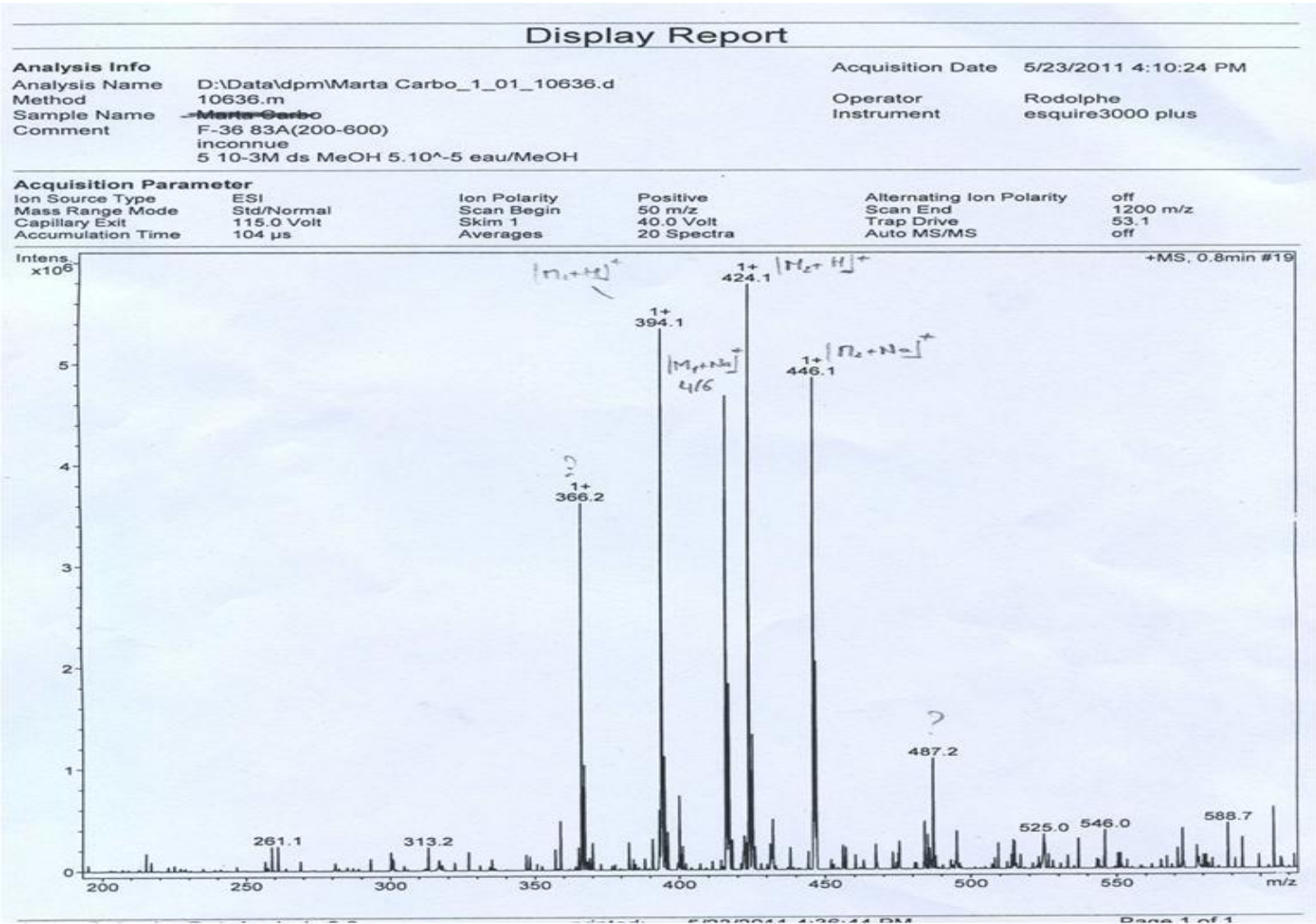


Fig. 7: Spectre de masse de F3683A

tel-00949223, version 1 - 19 Feb 2014

RESUME

Titre : Caractérisation chimique et biologique de *Waltheria indica* L. (Malvaceae), herbacée utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour la prise en charge de l'asthme

Introduction: Au Burkina Faso, *W. indica* L. syn. *W. americana* est utilisée en médecine traditionnelle dans la prise en charge aussi bien curative que préventive de l'asthme. Basée sur une approche ethnopharmacologique, cette étude visait à caractériser *W. indica* sur le plan chimique et pharmacologique en relation avec l'usage traditionnel contre l'asthme.

Méthodologie : Après avoir confirmé les données bibliographiques sur l'usage antiasthmatisant de la plante par un entretien avec des tradipraticiens de santé, une recherche bioguidée a été réalisée. Des investigations chimiques à type d'extraction, de purification et de détermination structurale ont été conduites en alternance avec les investigations biologiques de laboratoire. En outre, une caractérisation *in situ* des groupes chimiques a été réalisée dans différentes parties de la plante. Puis, une évaluation de la toxicité générale aigüe de l'extrait hydro alcoolique des racines a été réalisée chez la souris.

Résultats et discussion : Des alcaloïdes et des polyphénols ont été mis en évidence dans les différentes parties de la plante. Plusieurs composés ont été isolés à partir de l'extrait hydro alcoolique (HA) des racines. Un seul a été identifié comme étant (-)-épicatéchine. HA, ses fractions n-hexane (F₁), dichlorométhane (F₂), acétate d'éthyle (F₃), la fraction résiduelle (F₄) et l'épicatéchine isolée de F₃ inhibaient *in vitro* l'activité de la 5-LOX, la LOX-IB de soja et la PLA₂ de manière dose dépendante. L'inhibition de la PDE4A1α par les fractions n'était pas dose dépendante. Sur le plan tissulaire, HA, F₃ et les fractions dérivées de F₃ inhibaient les contractions induites par l'acétylcholine sur la trachée de rat *ex vivo*. Un effet dose dépendant était observé avec une CI₅₀ de 1051 µg/mL pour HA, entre 181 et 477 µg/mL pour F₃ et ses fractions. HA est modérément toxique chez la souris par voie intrapéritonéale (DL₅₀ =210 mg/Kg). Cette étude est la première investigation pharmacologique de l'usage traditionnel de *W. indica* contre l'asthme. Nos résultats supportent cet usage traditionnel de la plante et démontrent la participation de l'épicatéchine aux propriétés antiasthmatisantes.

Conclusion : La validation pharmacologique de l'usage traditionnel de *W. indica* contre l'asthme doit être complétée par les futures investigations précliniques avec l'isolement et les tests biologiques d'autres composés de la plante qui participeraient à l'activité de *W. indica*.

Mots clés : *Waltheria indica*, ethnopharmacologie, asthme, inflammation, bronchorelaxation.

Title: Chemical and biological characterization of *Waltheria indica* L. (Malvaceae), an herbaceous used in traditional medicine for asthma management in Burkina Faso.

Introduction: In Burkina Faso, *W. indica* L. syn. *W. americana* is used by traditional healers for curative and preventive management of asthma. Based on an ethnopharmacological approach, this study aimed to characterize *W. indica* on the chemical and pharmacological level according to the traditional use against asthma.

Methodology: First, interviews of traditional healers confirmed the literature data concerning traditional use of the plant against asthma. Second, chemical investigations were conducted alternatively with biological investigation. Moreover, an *in situ* characterization of main chemical groups was performed in different parts of the plant; then, a general acute toxicity of hydro alcoholic extract was evaluated in mice.

Results and discussion: Alkaloids and polyphenols are presents in different parts of *W. indica*. Several compounds have been isolated from hydro alcoholic roots extract (HA). One compound have been identified as (-)-epicatechin. *In vitro*, HA, its fractions n-hexane (F₁), dichlorométhane (F₂), ethyl acetate (F₃), residual fraction (F₄) and (-)-epicatechin isolated from F₃ dose-dependently inhibited the activity of 5-LOX, LOX-IB de soja and PLA₂. Inhibition of PDE4A1α by fractions was not dose-dependent. On tissue level, HA, F₃ and fractions from F₃ inhibited contraction induced by acetylcholine on rat trachea *ex vivo*. This effect was dose-dependent with IC₅₀ of 1051 µg/mL for HA, between 181 and 477µg/mL for F₃ and its fractions. HA is moderately toxic in mice (LD₅₀ =210 mg/Kg, intraperitoneal route). This study is the first pharmacological investigation of traditional use of *W. indica* against asthma. Our results validate the use of *W. indica* in traditional for management of asthma. These effects should be, at least in part, attributed to the presence of (-)-epicatechin in roots of *W. indica*.

Conclusion: The pharmacological validation of traditional use of *W. indica* against asthma must be completed in the future research by isolation and biological assays of other compounds which could participate to activity of *W. indica*.

Key words: *Waltheria indica*, ethnopharmacology, asthma, inflammation, bronchial relaxation.

REFERENCES

- Albano S.M., Lima A.S., Miguel M.G., Pedro L.G., Barroso J.G., Figueiredo C. Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants. *Re. Nat. Prod.* (2012) **6**(1), 35-48.
- Arockia Babu M., NShakya N., Kaskhedikar S.G., Prathipati P., Saxena A.K. Development of 3D-QSAR Models for 5-Lipoxygenase Antagonists: Chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* (2002) **10**, 4035–4041.
- Aziz-ur-rehman, Malik A., Riaz N., Ahmad H., Nawaz S.A., Choudhary M.I. Lipoxygenase Inhibiting Constituents from *Indigofera hetrantha*. *Chem. Pharm. Bull.* (2005) **53**(3), 263-266.
- Barnes P.J. Neural mechanisms in asthma. *Br. Med. Bull.* (1992) **48**(1), 149-168.
- Bouvenot G., Devulder B., Guillevin L., Queneau P. et Schaeffer A. *Pathologie médicale.* Editions Masson: Paris. (1994).
- Brunton L., Chabner B., Knollman B. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 11^{ème} edition (2005).
- Busse W.W., Lemanske R.F. Asthma. *N. Engl. J. Med.* (2001) **344**, 350-362.
- Chung K.F. Leukotriene receptor antagonists and biosynthesis inhibitors: potential breakthrough in asthma therapy. *Eur. Respir. J.* (1995) **8**, 1203–1213.
- Delmas M.C., Fuhrman C. pour le groupe épidémiologie et recherche clinique, L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives. *Rev. Mal. Resp.* (2010) **27**, 151-159.
- Dorion G. Mécanismes et structures impliqués dans l'effet anti-inflammatoire et bronchorelaxant du 1,1-diméthylphenyl 1-4piperazinium. *Mémoire de Maîtrise es sciences.* Université de Laval (2005).
- Fauconnier M.L., Marlier M. Revue bibliographique : les lipoxygénases de soja. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (1997) **1**(2), 125-141.
- Ghayur M.N., Khan H., Gilani A.H. Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Arch. Pharm. Res.* (2007) **30**(8), 970-975.
- Gilhodes O., Igual J. *Pneumologie.* Collection internat. Ellipses. Paris. (1994) 160p.

Global initiative for asthma (GINA). Report on global strategy for asthma management and prevention (2011).

Grimm E.L., Brideau C., Chauret N., Chi-Chung C., Delorme D., Ducharme Y., Ethier D., Falgueyret J-P., Friesen R.W., Guay J., Hamel P., Riendeau D., Soucy-Breau C., Tagari P. and Girard Y. Substituted coumarins as potent 5-Lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2006) 16, 2528-2531.

Hamidu L.J., Ayo J.O., Adelaiye A.B., Abubakar M.S. Sedative and Anticonvulsant Effects of Ethyl Acetate Fraction of *Waltheria indica* in Mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology* (2008) 3(4), 261-266.

Kammoun M., Miladi S., Ben Ali Y., Damak M., Gargouri Y., Bezzine S. *In vitro* study of the PLA2 inhibition and antioxidant activities of *Aloe vera* leaf skin extracts. *Lipids in Health and Disease*. (2011) 10(30).

Karen B. Enquête internationale sur l'accès aux médicaments essentiels de l'asthme: Etudes préliminaires. Union internationale contre la Tuberculose et les maladies respiratoires. (2005).

Karol M.H. Animals models of occupational asthma. *Eur. Respir. J.* (1994) 7, 555-568.

Kumaraswamy M.V., Satish S. Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Woodfordia fruticosa* Kurz and *Betula utilis* Wall. *Afr. J. Biotechnol.* (2008) 7 (12), 2013-2016.

Lazaar A.L., Panettieri R.A. Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances Disease mechanisms. *Drug discovery today*. (2004) 1(1), 112-116.

Soyka M.B., Holzmann D., Cezmi A. Regulatory Cells in Allergen-specific Immunotherapy.. *Immunotherapy*. (2012) 4(4), 389-396.

Miningou S.D., Zoubga A.Z., Meda H., Meda N., Tiendrébéogo H. Prévalence de l'asthme du sujet de 15 à 64 ans à Bobo Dioulasso (Burkina Faso) en 1998. *Rev. Pneumol. Clin.* (2002) 58(1), 341-345.

Mohammed, Z., Shok, M., Ilyas, N., Musa K.Y., Yaro A.H. Analgesic Activity of *Waltheria Indica* Linn. *European Journal of Scientific Research* (2007), 16(1), 6-9.

Nacoulma O.G. Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso/ cas du plateau Central. Tomes 1 et 2. Thèse Doctorat *es sciences*. Université de Ouagadougou (1996).

- Oliver W. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Current Drug Targets-Inflammation & allergy* (2002) 1, 23-44.
- Peat J.K., Toelle B.G., Dermand J., van den B.R., Britton W.J., Woolcock A.J. Serum IgE levels, atopy, and asthma in young adults: results from a longitudinal cohort study. *Allergy* (1996) 51, 804-810.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. et Moore P.K. *Pharmacology*. Churchill Livingstone: 5th Edition London (2003).
- Romanet-Manent S., Charpin D., Magnan A., Lanteaume A., Vervloet D. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy* (2002) 57, 607-613.
- Rao Y.K., Fang S-H., Tzeng Y-M. Inhibitory Effects of the Flavonoids Isolated from *Waltheria indica* on the Production of NO, TNF α and IL-12 in Activated Macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. (2005) 28(5), 912-915.
- Sanou I., Koueta F., Kam K.L., Dao L., Sawadogo A. L'asthme de l'enfant. Aspects épidémiologiques et évolutifs en milieu hospitalier pédiatrique de Ouagadougou (Burkina Faso). Thèse de médecine, Université de Ouagadougou (1995).
- Schewe T., Kühn H., Sies H. Flavonoids of Cocoa Inhibit Recombinant Human 5-Lipoxygenase. *J. Nutr.* (2002) 132, 1825-1829.
- Sharif A., Ahmed E., Malik A., Riaz N., Afza N., Nawaz S.A., Arshad M., Shah M.R., Choudhary M.I. Lipoxygenase inhibitory constituents from *Indigofera oblongifolia*. *Arch. Pharm. Res.* (2005) 28, 761-764.
- Soyka M.B., Holzmann D., Akdis C.A. Regulatory Cells in Allergen-specific Immunotherapy. *Immunotherapy* (2012) 4(4), 389-396.
- Traoré D. Médecine et magie Africaine ou comment le noir se soigne t-il? Présence Africaine, Paris, 1983.
- Widdicombe J.G. Autonomic regulation i-NANC / e-NANC. *Am. J. respire. Crit. Care Med.* (1998) 158, 171-175.
- Zongo F.E. Etude des effets relaxants de l'extrait hydro alcoolique de *Waltheria indica* sur la trachée de rat. Mémoire de DEA. Université de Ouagadougou, (2007).