

# Rapport de stage à option humanitaire

18 nov. au 20 déc. 2019, Dakar

Clark Kevin

## Laboratoire national de contrôle des médicaments au Sénégal (LNCM)

Objectifs : Application et transfert technologique par la formation de techniciens à la méthode développée en l'HPTLC pour l'analyse et le fingerprinting de plantes : *Quality control of Sclerocarya birrea based preparations used in West Africa for Diabetes Mellitus control : Diabéfla®*

### Résumer des résultats du travail de master

A l'heure actuelle, plus de 50% des familles rurales questionnées au Burkina Faso utilisent la médecine traditionnelle comme soins de premier recours selon l'enquête réalisée. C'est une solution face à un système de santé souvent saturé, l'absence d'assurance et système de financement et d'une grandissante influence des maladies non transmissibles. Les plantes médicinales sont employées en cueillette familiale, vendue sur les marchés traditionnels et existent maintenant sous forme de médicaments traditionnels améliorés avec autorisation de mise sur le marché facilitées.

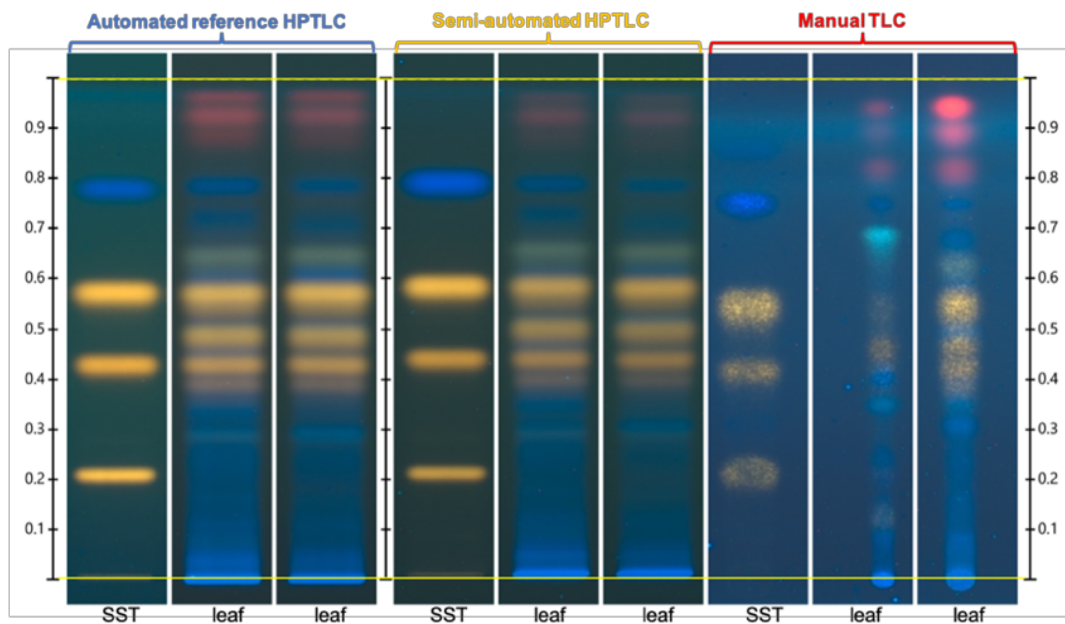


Cependant, il n'existe pas de contrôle qualité en dehors des l'aspects visuels et d'occasionnels tests microbiologiques. Le but de tous ce projet est de contribuer à la situation actuelle par des moyen simple, compatible avec les contraintes locales, la sécurité des solvants, la disponibilité des standards de référence, l'accès aux instruments analytiques, pièces de rechanges et maintenance. L'HPTLC pour l'identification et la détection d'adultération des matières premières végétales ainsi que des produits finis semble la solution la plus appropriée. Ceci au moyen de fingerprint issue d'analyse d'échantillon récolté sur le terrain et avec détermination enregistrée au Conservatoire et jardin botaniques de la ville de Genève.

Après l'optimisation de la méthode, le screening des échantillons et de l'identification des flavonoïdes majoritaires comme marqueurs principaux du fingerprint par UHPLC-HRMS, une analyse d'environ 1 heure pour 15 échantillons et seulement 45 mL de phase mobile avec des solvant abordable financièrement et disponible sur place a été obtenue.

L'avantage principal est la possibilité d'adapté la méthode à du matériel d'entrée de gamme ou de chaine HPTLC simplifiée donc abordable selon les opérateurs et objectifs via différente déclinaison du mode opératoire. C'est cet aspect qui a permis de réaliser le transfert technologique auprès des

autorités de santé nationales contrôlant les médicaments sur le marché (stage à Dakar), ainsi qu'avec les producteurs (Phytofla). Les résultats obtenus avec les instruments haut de gamme gracieusement mis à disposition par CAMAG qui ont permis d'obtenir les fingerprint de référence par espèce botanique sont ainsi comparable avec les fingerprint réalisable sur place.



HPTLC chromatograms resulting of 3 different workflows

### Stage à Dakar

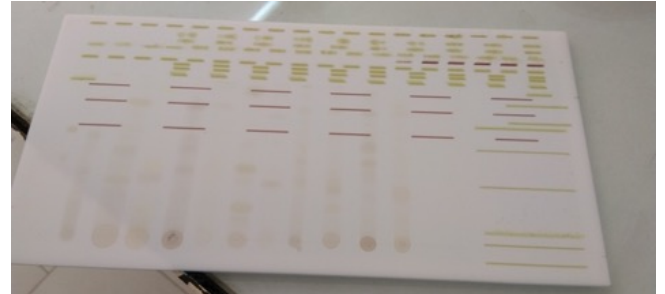
#### Remise en état du système HPTLC de CAMAG et des éléments nécessaires pour le travail en laboratoire (1 semaine)

- Mise en route du Linomat (application d'échantillon) après plus de 10 ans d'inutilisation : démontage et nettoyage complet de la buse de spray-on, seringues et tourelle automatique. Quelques adaptations ont dû être réalisées avec les moyens du bord sur le circuit d'air comprimé dont certaines conduites ont lâché après remise sous pression avec un générateur d'azote. Les tests d'applications ont démontré une bonne homogénéité des bandes après la résolution de quelque problème de connectivité entre les instruments, via assistance à distance de Camag.

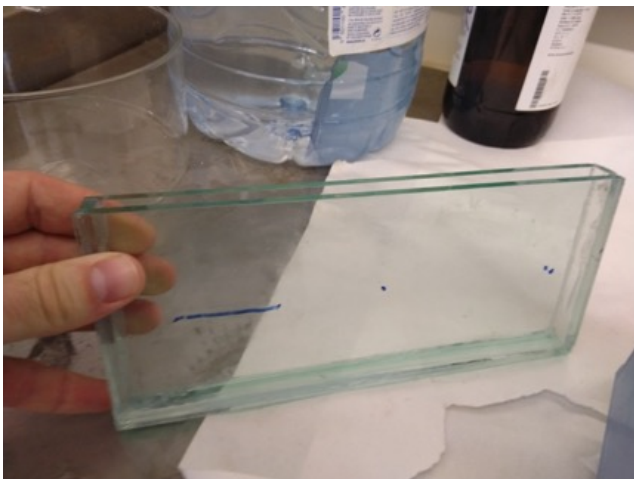
- Mise en route du Scanner 3 et développement d'une méthode alternative pour la révélation au moyen d'une cuve à immersion fabriquée ad-hoc par un aquariophile, le sprayage étant trop dangereux vu l'absence de hottes fonctionnelles.
- Remise en route avec Assane Diop des éléments indispensables au laboratoire et à sa sécurité : hottes, rotavapor, centrifugeuse, eau distillée et miliQ, (LC, GC etc.).
- Anecdote : découverte d'un kg d'acide picrique dans la réserve de réactifs et solvant.



Nettoyage de la tourelle



Tests d'applications



Cuve à immersion improvisée



Aspiration avec barboteur pour augmenter la sécurité avec la cuve

### **Présentation du système HPTLC à l'équipe du laboratoire (2 semaines)**

Le personnel du laboratoire a démontré un réel intérêt pour la phytochimie et le contrôle qualité suite à une visite ethno-botanique sur les plantes utiles présentes dans l'enceinte même du laboratoire. Chacun a pu amener ces propres échantillons (plantes pour jus, alimentaires etc.) en plus des quelques échantillons apportés du Burkina Faso et Bâle. Une petite remise à niveau théorique a été entreprise et j'ai dû m'adapter au logiciel wincats plus ancien et permettant moins de flexibilité. Les étapes séquentielles de l'HPTLC sont présentées et effectuées selon la méthode développée lors du travail de master avec explication technique et scientifique dans le but que chaque opérateur puisse ensuite être autonome dans les contrôles qualité. Certaines adaptations ont dû être faites par exemple pour la saturation de la cuve qui a un volume beaucoup plus grand et dont il a été tenté de diminuer au maximum les quantités de solvant de développement nécessaire en garantissant la reproductibilité. Une première quantification a été réalisée avec les standards de flavonoïdes et avec du nescafé.





### **Séminaire Contrôle de qualité des plantes et phytomédicaments, Assane Diop (1 semaine)**

Quelques jours ont été nécessaires à la préparation du séminaire : préparation d'échantillons pour démonstrations, anticipation de solution de secours en cas de panne etc. Le premier jour concernait surtout la mise en évidence du contexte sahélien pour le contrôle qualité, le deuxième abordait les questions analytiques avec présentation de CAMAG par Raphaël Vizzini, présentation du système HPTLC, des analyses par fingerprint etc par moi-même puis demi-journée de pratique. Le dernier jour était porté sur la CZE et une visite botanique avec une discussion de clôture sur les possibilités avenir menée par Assane.







Partie théorique



Visite botanique



### **Finalisation de l'implémentation et application à la recherche (1 semaine)**

Finalisation du protocole d'utilisation HPTLC (SOP interne au LNCM), reprise de quelques quantifications avec parfois quelques problèmes avec le scanner.

D'autres techniques de laboratoire ont été fait pour donner quelques outils supplémentaires au doctorant : extrait sec d'*Hibiscus sabdarifa* par évaporation à sec, différentes extractions de *Sarcocephalus latifolius* pour détection de potentiel trace de tramadol dans les racines : extrait liquide-liquide d'alcaloïde. La technique a été employé aussi pour détecter des adultérations volontaires de molécule de synthèse dans les poudres de plantes alimentaire ou à usage médicinale, à la distinction de plante " faux-ami" par confusion botanique, aux possibilités d'analyse des médicaments essentiels génériques des listes nationales. Une tentative d'adaptation de la méthode fatty oil en phase normale a été effectuée mais avec des problèmes de reproductibilité.

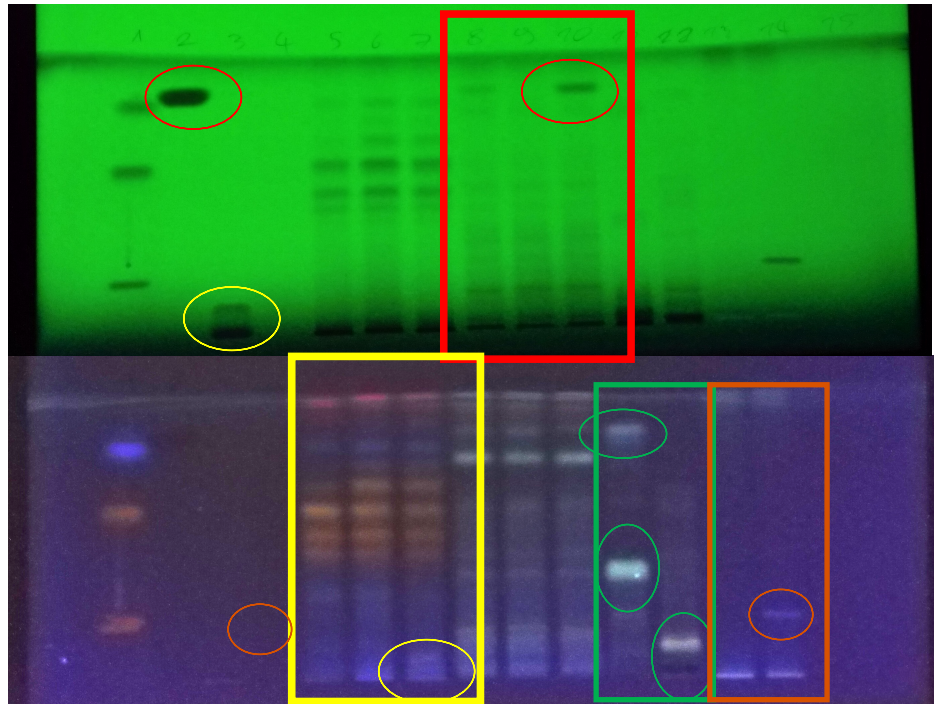


Saye et standard de anti malarique

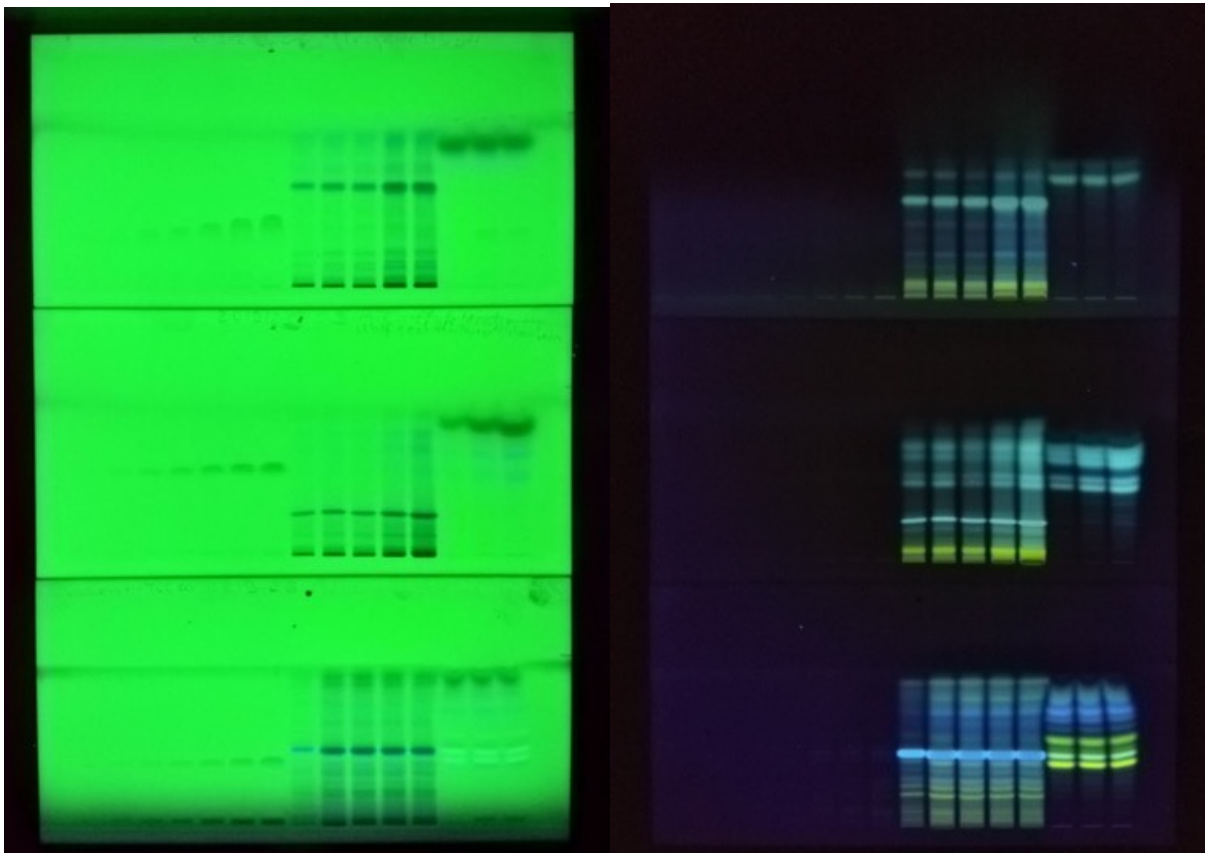
Fingerprint de référence de *S. birrea*, lot de Diabefla bon et adultéré avec la metformine

Fingerprint différent pour le bissap et son faux ami

Gingembre adultéré par du viagra



Analyse réalisée durant le séminaire (certaines zones n'apparaissent pas très clairement sur la photo fait avec un smartphone)



Différentes extractions de *Sarcocephalus latifolius* et volume d'application pour la détection de potentiel trace de tramadol dans les racines : extrait type liquide-liquide d'alcaloïde pour les trois tracks de droite.



**Side events**

