

ACTIVITÉ ANTIPALUDIQUE D'EXTRAITS DE FEUILLES DE *Cassia spectabilis* et *Entandrophragma angolense*

NDOUNGA, M.^{1,2} ; FLINIAUX, M.A.³ et CARME, B.²

1. - Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales (CERVE),
B.P. 1249 Brazzaville, Congo.
2. - Service de Parasitologie et Mycologie, CHU Hôpital Sud,
80 Amiens, France.
3. - Laboratoire de Biologie Cellulaire et Biochimie Végétale
Faculté de Pharmacie, 80 Amiens, France.

I. - INTRODUCTION

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* reste pour le Congo la principale endémie. Il est responsable d'une grande mortalité et morbidité. Son incidence est en constante augmentation en raison de la pharmacorésistance mais aussi de la dégradation des conditions socio-économiques qui empêchent la grande partie de la population d'acquérir les médicaments efficaces mais onéreux. C'est ainsi que des traitements alternatifs à base de plantes sont de plus en plus utilisés pour soigner les fièvres attribuées à tort ou à raison à la malaria. L'étude de ces plantes s'impose par conséquent pour infirmer ou confirmer leur usage en médecine traditionnelle et permettre aux populations de les utiliser rationnellement.

Dans le cadre de l'étude des propriétés antimalariques des plantes de la flore congolaise, nous avons ciblé deux espèces végétales. La première, *Cassia spectabilis* DC (Caesalpinaceae) est utilisée selon quelques informations dans le traitement des fièvres attribuées au paludisme. Il faut signaler qu'un autre *Cassia*, *Cassia occidentalis* L. est plus couramment utilisé en phytothérapie traditionnelle congolaise pour le même usage. Cette espèce ainsi que *Cassia abbreviata* ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antipaludique in vitro. Cela a permis de mettre en évidence une faible activité pour *C. abbreviata*, tandis que pour *C. occidentalis* les tests se sont révélés négatifs [Weenen et al. 1990].

La seconde, *Entandrophragma angolense* C.CD. (Meliaceae) n'est pas utilisée dans le traitement traditionnel du paludisme. Cependant, des espèces de la même famille comme *Azadirachta indica*, *Melia azadarach*, *Cedra odorata*, *Guerea multiflora*, *Khaya*

grandifoliola Khaya ivorensis et *Khaya senegalensis* sont employées dans certains pays dans le traitement des symptômes de la malaria. Ces plantes renferment des substances appelées liminoïdes fortement actives in vitro sur la maturation de *Plasmodium falciparum* [Khalid et al. 1986 ; Bray et al. 1990]. Pour sa part *A. indica* réduit de façon significative la parasitémie des souris porteuses de *Plasmodium berghei* [Abatan et al. 1986]. Il en est de même de *K. grandifoliola*, *K. ivorensis* et *K. senegalensis* [Makinde et al. 1988 ; Awe et al. 1991]. Dans le genre *Entandrophrama*, *E. bussei* a révélé une activité in vitro faible comparable à celle d'*A. indica* [Weenen et al. 1990].

Dans cette communication, nous présentons les résultats obtenus après l'évaluation de l'activité antipaludique in vitro des extraits de *C. spectabilis* et *E. angolense* sur la souche de *Plasmodium falciparum* W2 chloroquinorésistance. L'extrait le plus actif a par ailleurs été administré à des souris parasités avec *plasmodium berghei* pour l'évaluation de l'activité antipaludique in vivo et testé vis-à-vis de la lignée cellulaire MRC5 pour la détermination de l'effet cytotoxique in vitro.

Mots clés : *Cassia spectabilis*, *Entandrophrama angolense*, activité antipaludique, test in vitro, test in vivo, cytotoxicité.

II. - MATERIEL ET METHODES

2.1. - Matériel végétal

Cassia spectabilis. Les feuilles de cet arbre ornemental très courant au Congo sont utilisées sous forme de décocté dans le traitement des fièvres attribuées au paludisme. Le décocté aqueux des feuilles est également administré per os pour traiter la blennorragie [Ajanohoun 1988]. Le jus des écorces de tronc est donné en boisson contre les maux de reins et de ventre [Bouquet 1969]. C'est une des espèces qui renferment des alcaloïdes [Christofidis 1977a, 1977b, Mulchandani 1977]. Des quinones ont par ailleurs été identifiés [Mulchandani et al 1977]. L'échantillon testé a été cueilli en Septembre 1994 dans l'enceinte de l'ORSTOM de Brazzaville.

Entandrophrama angolense est un grand arbre de forêt primaire. Au Congo, il est employé comme analgésique, anti-inflammatoire [Bouquet 1969]. Une étude récente a mis en évidence une activité antiulcéreuse de l'extrait méthanolique de l'écorce de tronc, le principe actif étant le méthylangolensate [Njar et al 1995]. Les feuilles testées ont été récoltées dans la forêt primaire de Ntonkama à 30 km de Brazzaville en Août 1994.

2.2. - Préparation des extraits

Les feuilles séchées à l'abri du soleil sont broyées et la poudre traitée à chaud pendant 2 H par le chloroforme. L'extrait sec obtenu après évaporation du solvant est repris à froid par le méthanol. On recueille une fraction soluble et résidu insoluble MeOH. Les rendements des différents extraits sont consignés dans le tableau 1.

Dans les extraits chloroformiques, nous avons recherché la présence des alcaloïdes sur C.C.M. de silice, après révélation à l'UV et pulvérisation du réactif de Dragendorf. Seul *C. spectabilis* a montré la présence d'alcaloïdes de façon très marquée.

2.3. - Evaluation de l'activité antimalarique in vitro

La souche de *Plasmodium falciparum* W2 chloroquinorésistante originaire d'Indochine est issue d'un clonage réalisé par D. Walliker de l'Université d'Edinburgh (GB). Le maintien en culture s'est fait suivant la technique de culture in vitro [Trager et Jensen 1976]. Pour l'évaluation de l'activité in vitro, nous avons utilisé le microtest isotopique qui nous sert depuis plusieurs années pour la surveillance de la chloroquinorésistance au Congo [Mirowsky et al 1990].

Solubilisation des produits testés. Le DMSO est utilisé pour les extraits à raison de 80 mg/ml ; les solutions mères d'extraits sont diluées avec le milieu de culture RPMI 1640 additionné de 10% de sérum humain. Les solutions de base ont une concentration de 400µg/ml. Le sulfate de chloroquine est dissout dans le chlorure de sodium 0.9% pour une solution de 5 mg/ml équivalent chloroquine base ; celle-ci est diluée pour avoir une solution de base à 3 µg/ml.

Réalisation des tests. Les solutions d'extraits et de chloroquine sont réparties dans des plaques de culture à fond plat de 96 puits (Costar) à raison de 100 µl/cupule et 2 cupules par produit. Après dilution (ordre 2), on ajoute dans chaque cupule 200 µl d'une suspension de globules rouges parasites renfermant 0.4 µCi/ml d'hypoxanthine tritiée (ICN Pharmaceuticals). Les plaques contiennent à cette étape une série de 9 concentrations pour la chloroquine (600; 300; 150; 75; 37.5; 18.75; 9.38; 4.7; 2.3) et des séries de 6 concentrations pour les extraits de plantes (160; 80; 40; 20; 10; 5). Les plaques sont portées à 37°C dans une étuve à CO₂ pendant 44 H.

Après l'incubation, on procède à la collecte des hématies sur des filtres spéciaux avec un collecteur de cellules semi automatique (Stakron). Ces filtres imprégnés de parasites sont placés dans des mini tubes contenant du liquide à scintillation (Optiscint) afin de procéder au comptage de la radioactivité à l'aide d'un compteur Beta (LBK Rack Beta).

Exploitation des données. Deux essais au moins sont réalisés pour la détermination de la C.I.50 (concentration inhibitrice 50) obtenue en exprimant les pourcentages d'inhibition de la maturation des parasites en fonction du logarithme des concentrations. La courbe qui représente cette fonction est d'allure sigmoïde. Sur la partie de la courbe comprise entre 20 et 80% assimilable à une droite, on calcule l'équation de la droite de régression. Nous avons utilisé pour cela le Logiciel Microsoft Excel 4.0 pour Macintosh.

2.4. - Détermination des effets cytotoxiques

Réalisation du test. L'effet cytotoxique est déterminé par une méthode semi-quantitative rapide (Quentin - Leclercq 1990). Nous avons utilisé pour cela les cellules MRC5 (EUROBIO) de poumon d'embryon humain. La suspension commerciale de cellule, après dilution à environ 5.10^4 cell./ml est répartie dans des plaques de culture à fond plat de 96 puits à raison de 250 μ g/cupule. Le milieu de culture est constitué par le milieu de base MEN additionné de L-glutamine, d'antibiotiques, de bicarbonate de sodium et de 10% de sérum de veau foetal. Après 24 H d'incubation à l'étuve à 37°C dans une étuve à CO₂, le milieu de culture est remplacé par le même volume de la dilution du produit à tester en utilisant quatre (4) cupules pour chaque dilution.

Après 72 H d'incubation supplémentaires, on fixe les cellules en remplaçant les milieux de culture par 100 μ l d'éthanol 96% préalablement maintenu à -20°C. La fixation à proprement parler dure 30 mn, les plaques de culture étant maintenues à -20°C. L'éthanol éliminé, on ajoute pour la coloration des cellules 50 μ l d'une solution de bleu de toluidine à 2%. Les plaques sont laissées à la température ambiante. Elles sont enfin lavées à l'eau courante et séchées retournées.

Interprétation des résultats. On estime visuellement l'intensité de la coloration à partir de l'échelle de notation ci-après :

- : absence de coloration = absence de cellules vivantes, fixées et colorées,
- + : coloration très faible = présence de quelques cellules vivantes,
- ++ : assez forte coloration = présence d'assez nombreuses cellules vivantes,
- +++ : forte coloration = présence de nombreuses cellules vivantes
- ++++ : très forte coloration = très nombreuses cellules colorées (témoins)

2.5. - Evaluation de l'activité antipaludique in vivo

Animaux. Nous avons appliqué le test suppressif de 4 jours [Peters 1973, Abatan 1986, Fandeur 1985]. Des souris non consanguines OF1 (IFFA-CREDO) pesant 20 à 25 g réparties en lots de 5 sont infestées avec du sang provenant de souris parasitées depuis

4 à 5 jours avec *Plasmodium berghei* et présentant une parasitémie d'environ 15 à 20%. A chaque animale on injecte 100µl de sang dilué au 1/10ème dans le PBS. L'inoculum contient environ 5.10^6 hématies parasitées.

Traitement des animaux. Les extraits sont administrés sous la forme d'émulsions contenant 2% de Tween 80 dans la solution saline. La chloroquine (sulfate) est directement solubilisée avec la solution saline. Le traitement des animaux commence aussitôt après leur infestation par voie orale ou sous cutanée en injectant à chaque souris quatre doses consécutives (1 dose/jour) de Jo à Jo+3. Un lot témoin est prévu pour chaque série d'essais auquel on administre 0.5 ml d'une solution à 2% de Tween 80.

Exploitation des données. Le contrôle de la parasitémie se fait à Jo+4 sur frottis mince réalisé avec une goutte de sang prélevée à la pointe de la queue et coloré au RAL. Pour chaque animal, on rapporte le pourcentage de réduction de la parasitémie à Jo+4 et la durée de survie des souris traitées par rapport aux témoins. L'analyse statistique des données brutes a été rendue possible grâce au Programme EPIDEMIO, Version 1988, B. DUFLO, Paris. Il permet la comparaison des moyennes en utilisant le Test de Student qui donne la probabilité P d'établir une différence significative entre la réponse des animaux témoins et celle des souris traitées si $P < 0.05$.

III. - RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. - Activité antimalarique in vitro

Les résultats des essais in vitro rapportés dans le tableau 2 montrent un profil d'activité intéressant pour *E. angolense*. Sa fraction soluble MeOH (C.I.50 = 10 µg/ml) est significativement plus active que l'extrait chloroformique (C.I.50 = 28.9 µg/ml), $P = 0.01$. On constate également que le fractionnement permet une concentration des principes actifs dans la fraction soluble MeOH. Le résidu insoluble MeOH (C.I.50 = 53 µg/ml) a une activité faible en comparaison de l'extrait chloroformique, $P < 0.01$.

Pour *C. spectabilis*, le fractionnement donne un résidu insoluble très peu actif (C.I.50 = 15.8 µg/ml) plus actif. Cette fraction n'est pas significativement plus active que l'extrait chloroformique (C.I.50 = 32.2 µg/ml), $P = 0.1$.

L'ensemble des résultats permet de conclure à une activité faible des deux plantes si on établit une comparaison avec la chloroquine (C.I.50 = 0.212 µg/ml). *E. angolense* est néanmoins un peu plus active que *C. spectabilis*.

3.2. Effet cytotoxique

On note une forte létalité à 200 µg/ml lorsque les cellules sont mises en présence de la fraction soluble MeOH de *C. spectabilis*. Avec 100 et 50 µg/ml, l'action du même extrait est très limitée ou nulle. Pour *E. angolense*, aucune cellule ne survit à 200 et 100 µg/ml. La non létalité est observée à 12.5 µg/ml. La chloroquine a un effet cytotoxique très modéré. La concentration non létale est de 15.6 µg/ml. Avec 25 µg/ml on observe la mort de toutes les cellules.

La prise en compte des indices cytotoxiques permet de conclure à une cytotoxicité prononcée mais assez comparable des fractions solubles MeOH de *C. spectabilis* (indice = 6) et d'*E. angolense* (indice = 5). Nous avons également la confirmation de l'action modérée de la chloroquine (indice = 30) sur la multiplication et la survie des cellules MRC5.

3.3. Activité antimalarique in vivo

Par voie orale, l'administration de 200 mg/kg d'une suspension de la fraction soluble MeOH de l'extrait chloroformique de *C. spectabilis* ne provoque aucune réduction de la parasitémie à Jo+4 ($P > 0.05$) bien qu'on observe une légère prolongation de la survie des animaux traités ($P = 0.01$). Dans les mêmes conditions, la fraction soluble MeOH d'*E. angolense* induit une réduction de la parasitémie de 45% ($P = 0.04$) à Jo+4 et une prolongation de la survie des souris traitées ($P < 0.01$). Le sulfate de chloroquine à la dose de 5 mg/kg provoque une forte réduction de la parasitémie de 99.9% ($P < 0.01$) et une prolongation de la survie ($P < 0.01$).

Par voie sous cutanée, les deux extraits de plante ne provoquent ni réduction de la parasitémie ni prolongation de la survie ($P > 0.05$). La chloroquine à la dose de 2.5 mg/kg induit une réduction de la parasitémie à Jo+4 ($P < 0.01$) et une prolongation de la survie des animaux traités ($P = 0.03$). Avec 5 mg/kg, on obtient une guérison totale des souris qui se traduit par l'absence d'hématozoaires dans le sang des souris traitées à Jo+4 et Jo+14.

III. - CONCLUSION

L'évaluation de l'activité antipaludique de deux (2) plantes de la flore congolaise nous a donné des résultats intéressants. En effet, *C. spectabilis* sélectionnée sur la base de données ethnopharmacognosiques c'est-à-dire en prenant en compte son usage en médecine traditionnelle, s'est révélée faiblement active in vitro comparée à la chloroquine,

tandis qu'in vivo, on n'observe aucun effet significatif sur l'évolution de la parasitémie des souris traitées.

Pour *E. angolense* choisie sur la base des données chimiotauxonomiques, l'activité in vitro quoique faible est néanmoins plus forte à celle de *C. spectabilis*. Les essais in vivo ont montré par ailleurs que l'extrait d'*E. angolense* réduit de façon significative la parasitémie après traitement des animaux par voie orale. Le traitement sous-cutané n'a pas cependant donné de résultat significatif.

Les deux plantes ont une activité cytotoxique forte sur les cellules MRC5 en comparaison de la chloroquine qui présente une action modérée.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antipaludique montrent qu'en adoptant la démarche chimiotauxonomique, il est possible de sélectionner des plantes suffisamment actives. L'interprétation de ces résultats demande néanmoins une certaine prudence en ce qui concerne l'usage traditionnel de *C. spectabilis* tant l'activité peut varier en fonction de la saison de collecte ou du cycle biologique. Ces résultats montrent qu'*E. angolense* est potentiellement antipalustre et confirme l'intérêt des Meliaceae.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABATAN M.A. & MAKINDE M.J. 1986, Screening of *Azadirachta indica* and *Pisum sativum* for possible antimalarial activities. Journal of ethnopharmacognosy 17 : 85-93
2. ADJANOHOOUN E.J. ; AHYI A.M.R. ; AKE ASSI L. ; BANIAKINA J. & al. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Congo. A.C.C.T., Paris 1988.
3. AWE S.O. & MAKINDE J.M. 1991 Antimalarial effects of the stem bark aqueous extracts of three *Khaya* species. Fitoterapia 62, 6 : 467-473

4. BOUQUET : Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville) ; O.R.S.T.O.M., Paris. 1969.
5. BRAY, D.H. ; WARHURST, D.C. ; CONNOLLY, J.D. ; O'NEIL ; M.J. & PHILLIPSON, J.D. 1990. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituents. Limonoids. *Phytotherapy Research*. 4(1) : 29-35.
6. CHRISTIFIDIS, I. ; WELTER, A. & JADOT, J. 1977. Spectaline and iso 6 cassine, two new piperidin 3 vol alkaloids from leaves of *Cassia spectabilis*. *Tetrahedron* 33 : 977.
7. CHRISTIFIDIS, I. ; WELTER, A. & JADOT, J. 1977. Spectalinine and iso 6 carnvaline, two unprecedented piperidin alkaloids from seed of *Cassia spectabilis*. *Tetrahedron* 33 : 3005.
8. FANDEUR, T.; MORETTI, C. & POLONSKY, J. 1985. In vitro and in vivo assesment of antimalarial activity of sergolide. *Planta Medica* 20-30.
9. KALHID, S.A.; FAROUK, A.; GEARY, T.G. & JENSEN, J.B. 1986 - Potential antimalarial candidates from african plants. An in vitro approach using *Plasmodium falciparum*. - *Journal of Ethnopharmacology* 17 : 85-93.
10. MAKINDE, J.M.; AWE, S.O. & AGBEDAHUNSI, J.M. 1988. Effect of *Khaya grandifolia* extract on *Plasmodium berghei* on mice. *Phytotherapy Research* 2, 1 : 30-32.
11. MIROWSKY, P.; GAY, F.; BUSTOS, D.; MAZIER, D. & GENTILLINI, M. 1990. - Cloning of a fresh isolate of *Plasmodium falciparum* and drug sensivity of the clones. - *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 : 511-515.

12. MULCHANDANI, N.B. & HASSARAJANI, S.A. 1977.
Cassinicine, a new alkaloid and anthraquinone from *Cassia spectabilis* and their biogenic relationship. - *Planta Medica* 32 : 357.
13. NJAR, V.C.O.; ADESANWO, J.K. & RAJI, Y. 1995.
Methylangolensate : the antiulcer agent of stem bark of *Entandrophragma angolense*. - *Planta Medica* 394-398.
14. PETERS, W.; PORTUS, J.B. & ROBINSON, B.L. 1973.
The chemotherapy of rodent malaria. XVII. Dynamics of drug resistance, part 3: influence of drug combinaison on the development of resistance to chloroquine in *Plasmodium berghei*. - *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 67(2) : 143-154.
15. QUENTIN-LECLERC J.
Des poisons de flèches aux substances naturelles antimitotiques. Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie. Metz 23-25 Mars 1990. ORSTOM Editions. pp 279-290.
16. TRAGER, W. & JENSEN, J.B. 1976.
Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193 : 673-675.
17. WEENEN, H.; NKUNYA, M.H.H.; BRAY, D.H., MWASUMBI, L.B.; KINABO, L.S. & KILIMALI, V.A.E.B. 1990.
Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants, *Planta Medica* 61(1) : 91-92.

Tableau 1 : Rendement des extraits et fractions préparés

	C. spectabilis	E. angolense
Extrait chloroformique	15%	12%
Fraction soluble MeOH	7.5%	7.5%
Résidu insoluble MeOH	4.2%	1.7%

Tableau 2 : Activité antipaludique in vitro d'extraits de C. spectabilis et E. angolense

	Nbre d'essais	C.I.50 en $\mu\text{g/ml}$	Statistique
<i>C. spectabilis</i>			
Extrait chloroformique	2	32.2(23.9-40.6)	P= 0.1(DNS) ^a
Fraction soluble MeOH	2	15.8(15.4-16.2)	
Résidu insoluble MeO	2	92(73-111)	
<i>E. angolense</i>			
Extrait chloroformique	2	28.9(28.6-29.2)	P = 0.01(DS) ^a
Fraction soluble MeOH	2	10(9.7-10.3)	P =0.04(DS) ^b
Résidu insoluble MeO	2	53(52.4-53.6)	
Chloroquine	4	0.212(0.176-0.247)	

DNS : différence non significative ; DS : différence significative; a : Fraction soluble MeOH versus extrait chloroformique ; b : résidu insoluble MeOH versus extrait chloroformique.

**Tableau 3 : Effet cytotoxique in vitro d'extraits de
C. spectabilis et E. angolense**

Concentrations en µg/ml	C. spectabilis ^c	E. angolense ^c	Chloroquine
200	+	-	nt
100	+++	-	nt
50	++++	++	nt
25	++++	+++	nt
12.5	++++	++++	+
6.25	++++	++++	++
3.12	nt	nt	+++
1.56	nt	nt	++++
0.78	nt	nt	++++
0	++++	++++	++++
Indice cytotoxique	100 ----- = 6 15.8	50 ----- = 5 10	6.25 ----- = 30 0.212

nt : non testé ; **c** : fraction soluble MeOH de l'extrait chloroformique

- : absence de coloration et de cellules vivantes, fixées et colorées ; + : coloration très faible = présence de quelques cellules vivantes ; ++ : assez forte coloration = présence d'assez nombreuses cellules vivantes ; +++ : forte coloration = présence de nombreuses cellules vivantes ; ++++ : très forte coloration = très nombreuses cellules colorées (témoins).

Tableau 5 : Activité antipaludique in vivo des extraits de *C. spectabilis* et *E. angolense* (traitement sous-cutané)

	Dose en mg/kg	Parasitémie en % 0 Jo+4			Durée moyenne de survie en jours		
		S. témoins	S. traitées & statistique	% réduction	S. témoins	S. traitées	Statistique
<i>C. spectabilis</i>	80	23.3 (13-33)	17.4 (13.5-21.5) P=0.14 DNS	25	5.6	6.2	P=0.3 DNS
<i>E. angolense</i>	80	23.3 (13-33)	21 (15-27) P=0.06 DNS	10	5.6	6	P=0.4 DNS
<i>Chloroquine sulfate</i>	2.5	23.3 (13-33)	1.2 (0.7-1.7) P<0.01 DS	91	5.6	6.8	P=0.03 DS
	5	23.3 (13-33)	0 P<0.01 DS	100	5.6	guérison totale à Jo+4	P<0.01 DS