

PROPRIÉTÉ TRANQUILLISANTE ET ANTALGIQUE DU *LIPPIA MULTIFLORA*

A.A. ABENA*, D. BIOKA**, C. BADILA SAMBA*, Th. HONDI-ASSAH*
M. DIATEWA*

* Laboratoire de Biochimie et Pharmacologie - Faculté des Sciences de la Santé
Université Marien NGOUABI, B.P. 69 Brazzaville - CONGO

** Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie - Faculté des Sciences.
Université Marien NGOUABI B.P. 69 Brazzaville - CONGO

RESUME

Les propriétés tranquillisante et antalgique du *Lippia multiflora* (L.m.), une Verbénacée couramment utilisée au Congo en boisson théiforme sont recherchées chez le rat. Les tests classiques de la psychopharmacologie prévisionnelle sont utilisés. Cette étude a permis de démontrer que L.m. n'antagonise pas les stéréotypies apomorphiniques comme le font les neuroleptiques mais possède des propriétés sédative, relaxante musculaire et antalgique, entre autres caractéristiques des tranquillisants.

Mots clés : *Lippia multiflora*, tranquillisant, antalgique.

INTRODUCTION

Lippia multiflora (L.m.) encore appelé thé de Gambie est une Verbénacée africaine utilisée au Congo sous forme de décoction de thé conventionnelle.

L'encyclopédie médicale de l'Afrique (5) mentionne dans son tome 4, la présence dans cette plante d'une huile essentielle composée de camphre et de borneol et signale son utilisation en cas de fatigue générale et d'insuffisance hépatique.

Yao (13) a montré que cette plante présente un effet antihypertenseur.

Le présent travail a pour but de rechercher chez le rat de laboratoire les effets tranquilisants et antalgiques de l'extrait brut du L.m. en utilisant les tests classiques de la psychopharmacologie prévisionnelle.

MATERIEL ET METHODE

Animaux

Des rats wistar mâles et femelles de poids compris entre 150 et 200 g ont été utilisés. Chaque lot étudié comprend 5 rats.

Préparation de l'extrait brut du L.m.

L'extrait brut du L.m. est obtenu à partir des feuilles sèches provenant de la région du Pool vendues dans les marchés de Brazzaville. L'extraction se fait par infusion de 20 g de feuilles dans 500 ml d'eau. La solution ainsi obtenue subit une lyophilisation. La poudre obtenue sera administrée aux animaux à différentes doses dissoute dans du NaCl à 0,9%.

Détermination de la dose non létale

6 lots d'animaux sont utilisés dans cette étude.

24 heures après administration I.P. respectivement de 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mg/kg de L.m., le nombre d'animaux morts et relevé.

Effet du L.m. sur l'état des animaux

4 lots d'animaux sont utilisés.

1 lot reçoit en I.P. du NaCl 0,9% (0,5 ml 100 g). Les 3 autres lots reçoivent par la même voie, l'extrait brut du L.m. aux doses respectives de 200, 400 et 600 mg/kg. Les rats sont ensuite placés dans des cages individuelles d'observation et l'état général est apprécié macroscopiquement.

Effet du L.m. sur l'activité motrice spontanée

L'activité motrice est appréciée par la méthode de Martin et al (7) légèrement modifiée. 4 lots d'animaux sont utilisés et traités comme ci-dessus avec du NaCl 0,9% et du L.m. 30 minutes après administration des produits un rat naïf est placé dans une cage à activité motrice et le nombre de carrés traversés pendant 10 minutes est déterminé.

Effet du L.m. sur la température rectale

4 lots d'animaux sont utilisés et traités comme ci-dessus.

La température rectale de chaque animal est mesurée à l'aide d'un thermomètre.

Effet du L.m. sur les stéréotypes apomorphiniques

5 lots d'animaux sont utilisés et un lot reçoit du NaCl 0,9% (0,5ml/100g) ; trois lots reçoivent du L.m. respectivement aux doses de 200, 400 et 600 mg/kg, le dernier lot reçoit de l'halopéridol à la dose de 0,4 mg/kg I.P.

30 minutes après l'administration, les animaux reçoivent par voie S.C. de l'apomorphine 1 mg/kg. L'intensité des stéréotypes est évalué toutes les 10 minutes pendant 60 minutes selon la méthode de SHIBUYA et al (10) :

0 = pas de stéréotypies

2 = stéréotypies légères

3 = stéréotypies modérées

4 = stéréotypies sévères (léchage continu, mouvement répété des pattes, de la tête et du corps)

Effet du L.m. sur le sommeil induit par le phénobarbital

4 lots d'animaux sont utilisés.

1 lot du NaCl 0,9% (0,5 ml/100g), 3 lots reçoivent du L.m. aux doses respectives de 200, 400 et 600 mg/kg I.P. 30 minutes après l'injection des produits, le phénobarbital (70 mg/kg) est administré aux rats par voie I.P.

Le délai (temps entre l'injection du phénobarbital et la perte du réflexe du redressement et la reprise de ce réflexe) et la durée du sommeil sont mesurés.

Effet du L.m. sur le test de la traction

2 lots sont utilisés. 1 lot reçoit du NaCl 0,9% (0,5 ml/100g) ; un autre lot reçoit du L.m. à la dose de 400 mg/kg I.P. 30 minutes après, un animal naïf est placé par les pattes sur une barre métallique tendu horizontalement. On note le temps que met l'animal pour effectuer un redressement amenant une des pattes postérieures à toucher la barre.

Effet du L.m. sur les crampes abdominales induites par l'acide acétique

6 lots sont utilisés. Un lot sert de témoin (NaCl 0,9%).

2 lots d'animaux reçoivent du diazépam par voie orale (2 et 4 mg/kg) les trois derniers lots reçoivent du L.m. aux doses respectives de 200, 400 et 600 mg/kg par voie orale. 30 minutes après, les animaux reçoivent de l'acide acétique (0,5%. 10ml/kg I.P.). Dix minutes après l'injection d'acide acétique, on compte le nombre de crampes abdominales pendant 10 minutes.

Effet du L.m. sur le test de la plaque chauffante

6 lots d'animaux sont utilisés et traités comme pour le test de l'acide acétique. 30 minutes après un animal est placé sur la plaque chauffante et le temps de réaction (temps compris entre le moment où l'animal est placé sur la plaque chauffante et le moment où il lèche ses pattes) est mesuré.

Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats est réalisée par comparaison de chaque lot d'animaux traités par rapport au lot témoin en utilisant le test t de STUDENT.

RESULTATS

Dose non létale

Aucune mortalité n'a été observée chez les rats traités par l'extrait brut de L.m. aux doses respectives de 200, 400, 600, 800, 1000 et 1200 mg/kg I.P. Nous avons choisi de travailler avec les doses de 200, 400 et 600 mg/kg de poids corporel.

Effet du L.m. sur l'état général des animaux

5 à 10 minutes après administration du L.m., une ataxie est observée, celle-ci est suivie d'une sédation qui apparaît entre la 10^e et 20^e minute., les animaux s'allongent, présentent un ptôsis mais restent sensible au stimulus. Une heure après, l'ataxie et le ptôsis tendent à disparaître mais les animaux restent sédatifs. 24 heures après l'administration du L.m., les animaux présentent encore une légère sédation.

Tous ces effets observés sont dose dépendants. D'autre part, de façon précoce (dans les 30 minutes qui suivent l'administration) les urines prennent la coloration jaune foncée du L.m.

Effet du L.m. sur l'activité motrice spontanée (figure 1)

L'activité motrice spontanée est réduite de façon significative ($P < 0,01$) par le L.m. aux doses utilisées. Le nombre de carrés traversés par les animaux est de $16,40 \pm 5,68$; $12,20 \pm 2,07$; et $9,60 \pm 1,92$ carrés aux doses respectives de 200, 400, et 600 mg/kg de L.m. Ce nombre est de $61,60 \pm 6,48$ pour les animaux témoins. Les différences entre lots traités par le L.m. ne sont pas significatives.

Effet du L.m. sur la température rectale

La température rectale des animaux n'est pas significativement modifiée par L.m. aux doses utilisées.

Effet du L.m. sur les stéréotypies apomorphiques

Le L.m. aux doses utilisées n'antagonisent pas les stéréotypies induites par l'apomorphine à la dose de 1 mg/kg s.c. L'halopéridol 0,4 mg/kg I.P. s'oppose significativement à ces stéréotypies.

Effet du L.m. sur le sommeil induit par le phénobarbital (figures 2 et 3)

Aux doses utilisées le L.m. réduit le délai du sommeil et potentialise la narcose barbiturique. Les délais de sommeil sont respectivement de $17,2 \pm 2,74$; $13,8 \pm 1,81$ et $13,4 \pm 2,16$ mn aux doses de 200, 400 et 600 mg/kg alors que ce délai est de $22,4 \pm 1,89$ mn pour les témoins. Les différences sont significatives par rapport aux témoins ($P < 0,01$).

La durée du sommeil est de $199,40 \pm 2,90$ min pour les témoins. Elle est respectivement de $209,80 \pm 29,58$ min (N.S.), $336,40 \pm 22,23$ min ($P < 0,01$) et $342 \pm 16,28$ min ($P < 0,01$) pour les doses de 200, 400 et 600 mg/kg de L.m.

Effet du L.m. sur le test de la traction (figure 4)

Les animaux témoins effectuent un rétablissement immédiat en $0,8 \pm 0,1$ sec tandis que les rats traités à l'extrait brut du L.m. (400 mg/kg) effectuent un rétablissement en $7,04 \pm 2,29$ sec. La différence entre témoins et traités est significative ($P < 0,05$)

Activité antalgésique du L.m. : test de l'acide acétique (figure 5)

Le L.m. réduit significativement le nombre de crampes induites par l'acide acétique comme fait le diazépam. Le nombre de crampes est de $33,80 \pm 5,04$ pour les animaux témoins. Il est de $13,40 \pm 4,49$ ($P < 0,01$) de $14,20 \pm 3,89$ ($P < 0,01$) pour le L.m. aux doses respectives de 200, 400 et 600 mg/kg et de $11,60 \pm 4,75$ et $13,00 \pm 2,00$ pour le diazépam respectivement aux doses de 2 et 4 mg/kg per os. Les différences entre L.m. 200 mg/kg et diazépam 2 et 4 mg/kg sont significatives ($P < 0,05$).

Activité antalgésique du L.m. : test de la plaque chauffante

Le L.m. augmente de façon significative le temps de réaction sur la plaque chauffante, comme le fait le diazépam. Le temps de réaction est de $2,10 \pm 0,26$ sec pour les témoins. Il est de $3,26 \pm 0,46$, et $4,50 \pm 0,80$ ($P < 0,01$) aux doses respectives de 200, 400 et 600 mg/kg de $2,90 \pm 0,51$ sec et de $5,90 \pm 1,09$ sec ($P < 0,01$) pour les rats traités par le diazépam aux doses respectives de 2 et 4 mg/kg de poids corporel.

DISCUSSION

L'extrait brut de L.m. administré aux rats par voie I.P. est bien toléré. Aucune mortalité n'est observée jusqu'à la dose de 1200 mg/kg d'où le choix pour cette étude de trois doses 200, 400 et 600 mg/kg. Les effets observés sont les suivants :

- * une ataxie précoce
- * une sédation prolongée
- * une coloration jaune foncée des urines

- * une diminution de l'activité motrice spontanée
- * une potentialisation du sommeil barbiturique
- * une augmentation du temps mis à ramener les pattes sur la barre métallique (test de traction)
- * une activité antalgique.

L'ataxie observée n'est pas un effet propre du L.m.. En effet BIOKA et ABENA (3), ABENA et al (1) ont retrouvé aussi cette ataxie après administrations respectives de Piper umbellatum et d'Ageratum conyzoides (4). Des substances irritantes non résorbées par voie orale pourraient expliquer ces différences observées.

La résorption du L.m. semble très rapide comme le témoigne la coloration jaune foncée des urines. Le L.m. entraîne une sédation, une diminution de l'activité motrice spontanée et une potentialisation du sommeil barbiturique. Tous ces effets sont révélateurs des propriétés sédatives observées avec les tranquillisants, les neuroleptiques et les antidépresseurs à doses élevées (9,12).

Cependant les neuroleptiques provoquent aussi la catalepsie et antagonisent les stéréotypies apomorphiques (10,11) comme le fait l'halopéridol dans notre étude. Ces effets n'ont pas été observés avec le L.m.. Il est donc fort probable que le L.m. ne soit pas un neuroleptique.

Les tranquillisants sont sédatifs, myorelaxants, anxiolytiques et anticonvulsivants. Le test de la traction est susceptible de relever une action myorelaxante (9). Le L.m. augmente le temps mis pour ramener les pattes postérieures sur la barre métallique. D'autre part NOAMESI et al (8) utilisant la préparation nerf-muscle ont montré que le L.m. relâche le muscle squelettique. Le L.m. pourrait donc présenter les propriétés myorelaxantes.

Dans le présent travail le L.m. antagonise aux différentes doses utilisées les effets algogènes de l'acide acétique et de la plaque chauffante comme le fait le diazépam.

Les Benzodiazépines qui constituent les principaux tranquillisants permettent d'obtenir une narcose, une analgésie, une myorelaxation suffisantes (2,6). Ces effets analgésiques du L.m. semble dose dépendants.

Le L.m. semble donc présenter un profil plus proche des tranquillisants. Il est évident que la recherche d'une activité anxiolytique et d'une activité anticonvulsivante est nécessaire pour confirmer le profil tranquillisant du L.m.

Références bibliographiques

1. ABENA A.A., KINTSANGOULA G.S., DIANTAMA J., BIOKA D.
Effets analgésiques d'un extrait brut d'*Ageratum conyzoides* chez le rat.
Encéphale 1993, XIX, 329-332
2. BIDET D., GAIGNAULT J.C.
Récepteurs biologiques et recherches actives : exemple des récepteurs des benzodiazépines. Actualité chimique 1984, 10 : 17 - 20
3. BIOKA D., ABENA A.A.
Profil psychopharmacologique d'un extrait aqueux de *Piper umbellatum*
Encéphale 1990, XV ; 200-208.
4. BIOKA D., MABIKA A., ABENA A.A.
Effet analgésique d'un extrait brut d'*Ageratum conyzoides* chez le rat.
Acta Horticulture 1993, 332. 171 - 176.
5. ENDA TIERS MONDE
Encyclopédie Médicale Africaine
Larousse Afrique 1988 4 vol. 1091 P.
6. KIENLEN J.
Benzodiazépines en anesthésie et réanimation
In GIROUD J.P., MEYNIEL G. et al. Pharmacologie clinique bases de la thérapeutique PP. 974-985 PARIS. Expansion Scientifique Française 1988.
7. MARTIN P., SOUBRIE P., PUECH A. J.
Helpless behaviour induced by repeated restriction of activity in rats : Specific reversal by antidepressants
Drugs Psychiatr. and Psychobiol, 5 : 123-128
8. NOAMESI B.K., ADEBAYO G., BAMGBOSE S.D.A.
Muscle relaxant properties of aqueous extract of *Lippia multiflora*
Planta Med. 1985 (3) 253-255
9. SAMUEL C. A.
D'un test pharmacologique utilisable pour la sélection des tranquillisants.
Thèse de doctorat Médecine. Faculté Médecine Paris 1970

10. SHUBUYA T. NISHMORI T. MATSUDA H. and CHEN P.C.
Behavioral pharmacological studies in the monkey with
DD-3480. *Int. J. Clin Pharmacol. Ther. Toxicol.* 1982, 20(6), 251-254
11. SHMITT S.
Eléments de Pharmacologie. Ed. Flammarion 1980, 7è éd. PP 321.
12. SKOLNICK P., PAUL S., CRAWLEY J., LEWIN E., LIPPA A., CLODY D.,
IRMSCHER K., SAIKO O. and MINCK K.O. (1983). Antagonism of the
anxiolytic action of Diazepam and Chloridiazepoxide by the novel
imidazopyridines, EMD 39593 and 41717. *Eur. J. pharmacol* 88 : 319-327
13. YAO KOFFO J.P. (1985)
Recherches phytochimiques et pharmacologiques sur trois verbénacées utilisées
comme antihypertenseurs en médecine traditionnelle. *Lippia multiflora* Moldenke,
LANTANA Camara L. et *Gmelina arborea*, Roxb. Thèse de Doctorat 3è cycle.
Université Toulouse III.

Nombre de carrés traversés

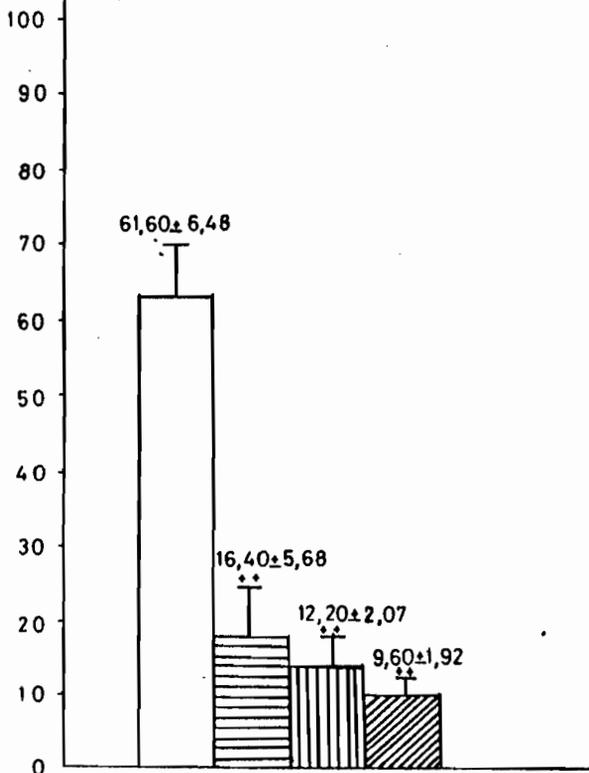


Figure 1. Effet de l'extrait brut du L.m. sur l'activité motrice.



Témoins: NaCl 0,9%



Lippia multiflora 200mg/kg I.P.



Lippia multiflora 400mg/kg I.P.



Lippia multiflora 600mg/kg I.P.

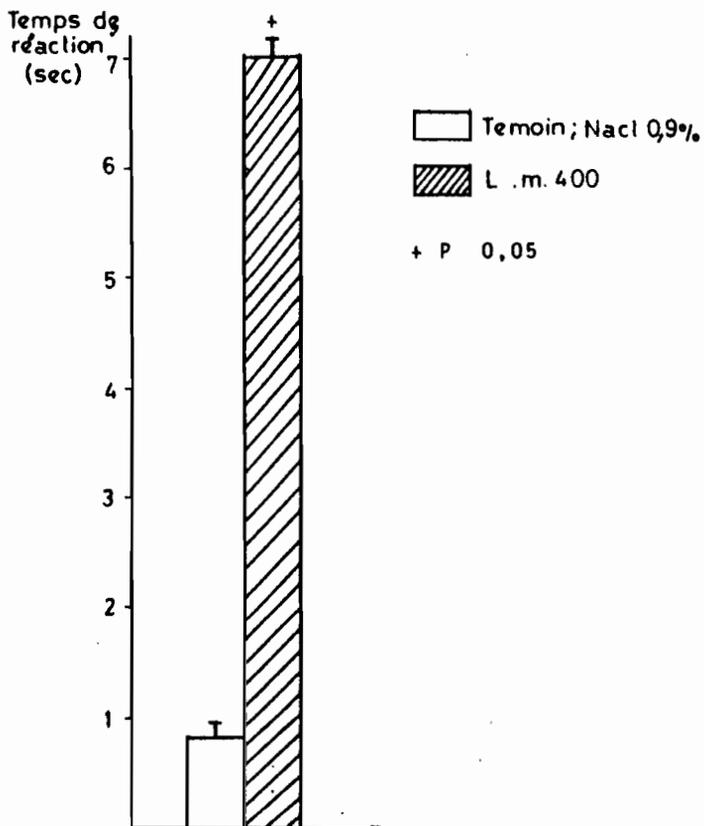


Figure 2. - Effet de l'extrait brut du L.m. sur le test de la traction (en seconde)

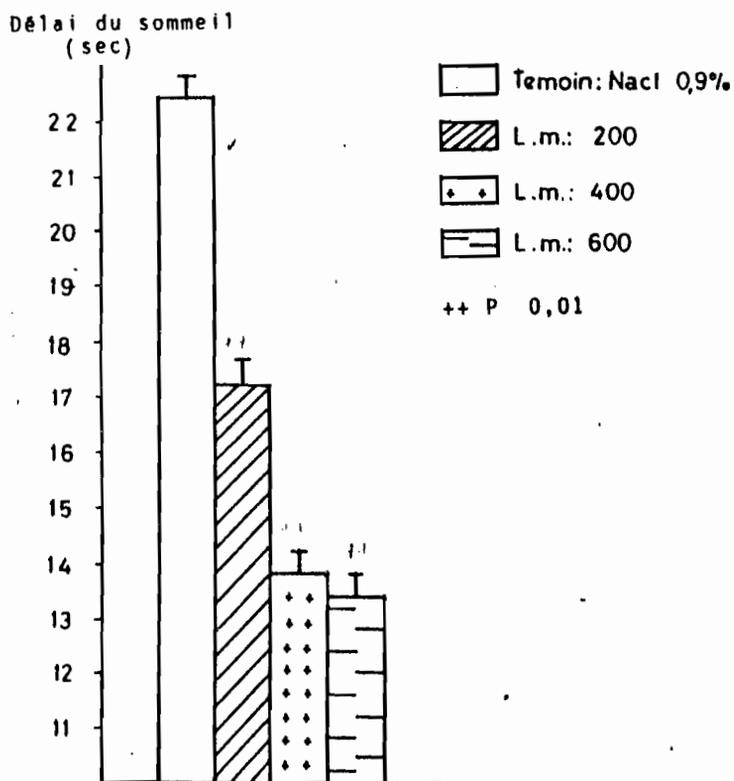


Figure 3.- Effet de l'extrait brut du L.m. sur le délai du sommeil.
(en minutes)

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*, *Entandrophragma 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.

Entandrophragma 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 carnavaline, 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