

Comparaison des effets antispasmodiques de l'écorce de racines et des feuilles de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn. (Fabaceae)

Irié-N'guessan A.G.^{1,4*}, Kouakou-Siransy N.G.⁴, Kouakou S.L.⁴, Kamenan B.A.⁴,
Djadji A.T.L.⁴, Abrogoua D.P.⁴, Champy P.^{1,2}, Kablan B.J.⁴, Leblais V.^{2,3}

¹ Chimie des substances naturelles et chimiothérapie antiparasitaire, CNRS UMR 8076 BioCIS, Châtenay-Malabry, France.

² Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

³ Signalisation et physiologie cardiaque, INSERM UMR-S 769, Châtenay-Malabry, France.

⁴ Laboratoire de pharmacologie, pharmacie clinique, et physiologie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny, République de Côte d'Ivoire.

Date de réception : 26 janvier 2014 ; Date de révision : 25 juin 2014 ; Date d'acceptation : 09 juillet 2014

Résumé :

En Côte d'Ivoire, les écorces de racines de *Dichrostachys cinerea* (Fabaceae) sont utilisées traditionnellement pour traiter l'asthme. Dans une étude précédente, nous en avons démontré l'effet antispasmodique d'extraits bruts sur la trachée de souris isolée. Les travaux effectués sur les racines des plantes mettant les espèces végétales en péril, il nous a paru judicieux, dans un but écologique, de mener, pendant la présente investigation, la même étude avec les parties aériennes de la plante afin de proposer, le cas échéant, les feuilles en substitution aux racines. **Matériel et méthode** : Quatre types d'extraits totaux, de polarités différentes, ont été préparés à partir des feuilles sèches pulvérisées: Décocté, Hydro-alcoolique, Méthanolique et Chlorométhylénique. Ces extraits, à des doses croissantes et cumulatives, ont été testés sur des anneaux de trachée de souris C57BL/6j, isolés et précontractés par le carbachol (10-6 mol/l), dans des cuves à organes isolés. **Résultats** : L'effet maximal (Emax) du décocté de feuilles a été 65,52 ± 2,14 %, avec CE50 de 601 ± 62 µg/ml. S'agissant de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles, Emax a été 76,29 ± 2,19%, avec CE50 de 692 ± 31 µg/ml. Quant aux extraits les moins polaires, à savoir méthanolique et chlorométhylénique, Emax des feuilles a été 7,79 ± 0,95%, et 9,71 ± 1,3%, respectivement avec des EC50 indéterminables. La comparaison avec les résultats antérieurement obtenus avec les racines ont montré que les extraits, hydro-alcoolique et méthanolique de l'écorce de racines, ont été plus actifs que les extraits de feuilles de mêmes polarités, tandis que pour les autres extraits, l'écorce de racines et les feuilles ont eu des effets similaires. **Conclusion** : Les extraits de feuilles ont montré des effets antispasmodiques considérables, quoiqu'inférieurs à ceux des racines. Il serait donc possible d'utiliser les feuilles au lieu des racines, en vue de la préservation des biodiversités africaines.

Mots clés : Asthme, *Dichrostachys cinerea*, Feuilles, Racines

Comparison of spasmolytic effects of roots barks and leaves of *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn. (Fabaceae)

Abstract :

Introduction : Roots barks of *Dichrostachys cinerea* (Fabaceae) are traditionally used in Ivory Coast for the treatment of asthma. In previous studies, extracts of various polarities were investigated for their spasmolytic effect in mice isolated trachea. As the use of roots contributes to the destruction of trees, we found interesting, in the present study, to carry out the same tests with the aerial parts of the plant, in the aim to substitute roots by leaves, if necessary. **Material and method**: Four kinds of crude extracts of different polarities were prepared with dried pulverized leaves: decoction, aqueous-alcoholic, methanolic, and chloromethylenic ones. Cumulative additions of increasing concentrations of extracts were performed in C57BL/6j mice isolated trachea rings, precontracted with carbachol (10-6 mol/L), in organ chambers. **Results** : Maximal effect (Emax) of leaves decoction was 65.52 ± 2.14% with EC50 = 601 ± 62 µg/ml, and that of the aqueous-alcoholic extract was 76.29 ± 2.19% with EC50 = 692 ± 31 µg/ml. For leaves least polar extracts, i.e. methanolic and chloromethylenic ones, Emax was 7.79 ± 0.95% and 9.71 ± 1.3% respectively with non determined EC50. Comparison with previous results obtained with root bark showed that aqueous-alcoholic and methanolic extracts of the roots bark were more effective than the leaves extracts for the same polarities, while the other roots bark extracts and leaves ones had almost similar effects. **Conclusion**: Leaf extracts exerted important spasmolytic effects even if lower than those of root bark extracts. It might so be possible to use leaves instead of roots, in order to protect the african ecology.

Keywords : Asthma, *Dichrostachys cinerea*, Leaves, Roots

Introduction

En Côte d'Ivoire, les écorces de racines de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn. (Fabaceae), triturées avec de l'eau, et utilisées en instillations nasales, servent à traiter traditionnellement l'asthme, et d'autres affections du tractus respiratoire (Adjanohoun et al, 1979). Sur le plan ethnobotanique, un tel usage traditionnel n'est presque pas mentionné ailleurs ; très peu d'études expérimentales se rapportent à des effets liés à cet usage, quoiqu'une étude récente ait montré un effet diphasique (contracturant, puis relaxant) de cette drogue végétale sur la trachée isolée de cobaye (Aworet-Samseny et al, 2011). Des effets plutôt diurétiques, anti-infectieux, ou anti-lithiasiques sont rapportés (Eisa et al, 2000 ; Jayakumari et al, 2007).

Dans une étude précédente (Irié-N'Guessan et al, 2011), nous avons démontré l'effet relaxant d'extraits bruts de polarités différentes des écorces de racines de cette plante sur la trachée de souris isolée et précontractée avec le carbachol (10-6 mol/l) ; Cependant les travaux effectués sur les racines des plantes mettent les espèces végétales en péril. Ainsi, de nombreux chercheurs s'orientent vers une comparaison de l'activité des feuilles et des racines (la récolte des feuilles étant moins nuisible pour les plantes). C'est dans le but de contribuer à la préservation des plantes, que nous avons entrepris cette étude comparative de l'effet d'extraits des feuilles et d'extraits des racines de *D. cinerea* sur la trachée de souris isolée et précontractée.

(*) **Correspondance** : Irié-N'guessan Amenan Geneviève; e-mail: jemigrace@gmail.com ; tél. : (+225) 07 98 81 57

Matériels et méthode

Matériel végétal : Les racines de *D. cinerea* ont été récoltées en janvier 2009, dans le Sud-Est de la Côte d'Ivoire, dans des buissons près de Grand-Bassam (région des lagunes), et les feuilles en octobre 2012, dans le même endroit. L'identification a été faite par un taxonomiste au Centre National de Floristique d'Abidjan (Côte d'Ivoire), en comparaison avec les spécimens des herbiers du Centre. Les écorces ont été prélevées des racines ; écorces et feuilles ont été lavées à l'eau distillée, séchées sur les paillasse du laboratoire, sous air conditionné (18 °C), pendant deux semaines, et pulvérisées à l'aide d'une broyeuse à tamis de maille n°11 (Retsch type SM 100).

Méthode d'extraction : Quatre types d'extraits, de polarités décroissantes (décocté, hydro-alcoolique, méthanolique, et chlorométhylénique), ont été préparés :

Décocté : 50 g de poudre de chaque organe ont été mis dans 500 ml d'eau distillée (H₂O), puis l'ensemble a été porté à l'ébullition pour une durée de 30 min. Après filtration, le décocté a été concentré avec un évaporateur rotatif sous vide, à basse pression et à 60 °C, puis évaporé à sec à l'aide d'une pompe à vide.

Extrait hydro-alcoolique : 50 g de poudre de chaque organe ont été mis dans 500 ml d'un mélange équimoléculaire d'éthanol (EtOH) 96%, et d'eau distillée, puis la suspension a été mise en agitation magnétique à froid pendant 24 heures. Le filtrat a été pulvérisé avec un évaporateur rotatif sous vide, à basse pression, à 45 °C.

Extrait méthanolique : 50 g de poudre de chaque organe ont été mis dans 500 ml de méthanol HPLC (MeOH), puis la suspension a été portée sur un agitateur magnétique à froid pendant 24 heures. Nous avons obtenu un extrait pulvérulent après évaporation rotative du filtrat sous vide, à basse pression, à 35 °C.

Extrait chlorométhylénique : 50 g de poudre de chaque organe ont été mis dans 500 ml de dichlorométhylène (DCM), puis la suspension a été portée sur un agitateur magnétique à froid pendant 24 heures. L'évaporation du filtrat à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide, à basse pression, à 35 °C a permis d'obtenir un extrait sec onctueux non pulvérulent.

Le rendement de chaque extraction a été déterminé.

Matériel animal : Les expériences ont été menées, après une période d'acclimatation d'une semaine, conformément aux directives de la Communauté Européenne en matière de soins et d'usage des animaux (86/609/CEE, CE J Off no. L358, 18 Décembre 1986), le guide du comité français d'éthiques (CREEA Ile-de-France Sud), et le décret français no.87-848 (J Off République Française, 20

Octobre 1987: pp 12245-12248). Les tests ont été faits sur 48 souris mâles C57BL/6J à raison de 6 souris par test, âgées de 7 à 8 semaines, et pesant 25-30 g (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France).

Préparation des anneaux de trachée et tests ex vivo :

Ces tests ont été réalisés suivant un modèle documenté (Li *et al*, 1997) : après avoir anesthésié les souris, par une injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique (60 mg/kg i.p.), les voies aériennes inférieures, ainsi que les tissus biologiques annexes associés, ont été rapidement prélevés, et placés dans une boîte de Pétri, contenant de la solution de Krebs bicarbonatée fraîche, ainsi composée : NaCl 117 mM ; KCl 5,36 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; KH₂PO₄ 1,03 mM ; MgSO₄ 0,57 mM ; CaCl₂ 2,5 mM ; D-glucose 11,1 mM. Les trachées ont été ensuite nettoyées par dissection des tissus annexes, puis découpées en anneaux de 2 mm. Les anneaux ont été montés de façon isométrique, entre 2 crochets en acier inoxydable (l'un fixe et l'autre mobile), dans les cuves contenant 5 ml de la solution physiologique de Krebs, à 37 °C, pH 7,40, et continuellement barbotée avec un mélange fait de 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone. L'enregistrement de tension isométrique s'est fait en temps réel à l'aide d'un capteur de force relié au système d'acquisition de données (PowerLab), contrôlé par le logiciel d'analyse Chart version 5 (AD Instruments, Bella Vista, Australia). Les anneaux ont été tendus de manière à garder un tonus de repos d'une valeur de 0,6 g pendant au moins une heure. L'intégrité fonctionnelle des anneaux de trachée a été alors évaluée par injection d'une solution aqueuse de carbachol 10⁻⁵ M (Sigma-Aldrich Chemicals, France). Après une période de 45 minutes, pendant laquelle les organes ont été lavés toutes les 15 minutes, les anneaux ont été précontractés avec une concentration submaximale de carbachol (10⁻⁶ M). Lorsque la contraction s'est stabilisée, nous avons procédé à des additions cumulatives de concentrations croissantes des différents extraits, ainsi que de l'eau distillée ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les contrôles.

Analyse des données et statistiques

La réponse des anneaux de trachée a été exprimée en pourcentage de réduction de la contraction induite par le carbachol selon la formule suivante: $\{r = 100 * [(c-x)/(c-b)]\}$, où *c* représente le tonus de contraction stable obtenu par précontraction avec le carbachol 10⁻⁶ M ; *b* le tonus de repos et *x* la valeur du tonus induit par la substance testée. Les valeurs de relaxation due à l'extrait ont été obtenues en soustrayant les valeurs obtenues avec les contrôles (eau distillée ou DMSO) des valeurs expérimentales. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± erreurs standard sur la moyenne pour

six expérimentations (S.E.M; n=6). E_{max} a été le pourcentage de relaxation obtenue à la concentration maximale testée (1 mg/ml pour les extraits H₂O et EtOH/H₂O ; 0,02 mg/ml pour les extraits MeOH ; et 0,01 mg/ml pour les extraits DCM). CE₅₀ a été la concentration de l'extrait qui a

induit 50% de relaxation. Les données ont été analysées avec les logiciels EXCEL®97 et SigmaPlot®, utilisant le t-test de Student, ou le one way analysis of variance (ANOVA) suivi par le test de Bonferroni, avec comme critère de significativité p<0,05.

Résultats

Données se rapportant aux tradipraticiens : Les tradipraticiens étaient pour la plupart de sexe masculin (66%), 28% avaient le niveau d'étude primaire, 17% le niveau secondaire et 55% analphabètes. 20% d'entre eux ne pratiquaient aucune autre activité en dehors de la médecine traditionnelle. Parmi ceux qui avaient des activités parallèles, 50% étaient des planteurs et 23% des ménagères. Les rendements d'extraction (% , masse

sèche) ont été respectivement, pour les extraits décoctés, hydro-alcooliques, méthanoliques, et chlorométhyléniques : écorces de racines (9,4 ; 8,4 ; 3,7 et 1,1) ; feuilles (16,9 ; 24,4 ; 23,1 et 2,5). L'addition cumulative des concentrations croissantes, pour tous les extraits, a induit une relaxation, aux plus fortes concentrations testées, des anneaux de trachée précontractés par le carbachol (figures 1, 2, 3, et 4).

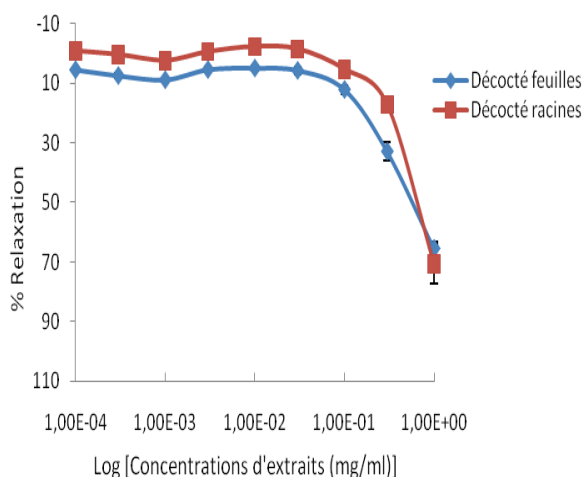


Figure 1 : Effets des décoctés sur la trachée précontractée

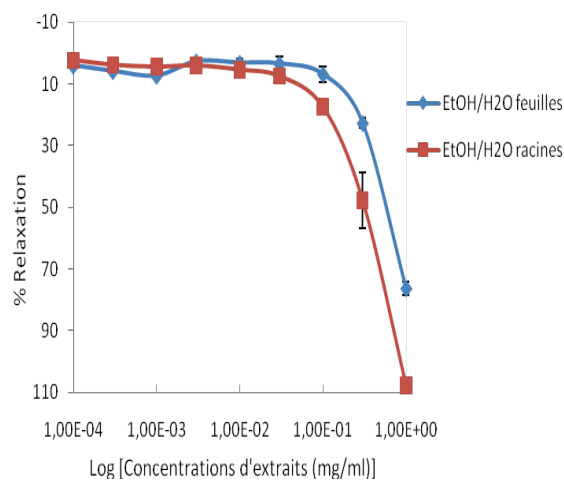


Figure 2 : Effets des extraits hydro-alcooliques sur la trachée précontractée

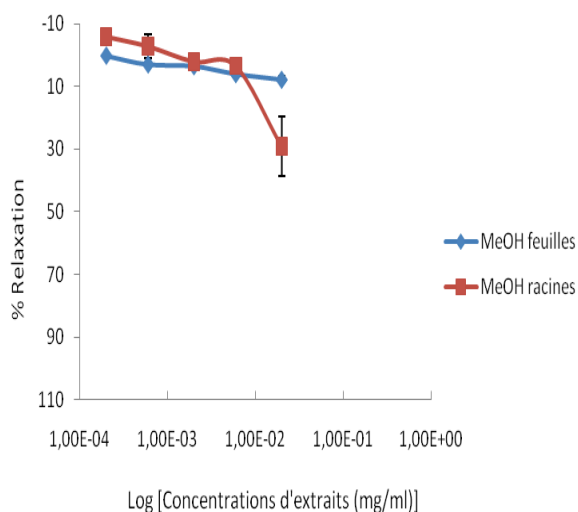


Figure 3 : Effets des extraits méthanoliques sur la trachée précontractée

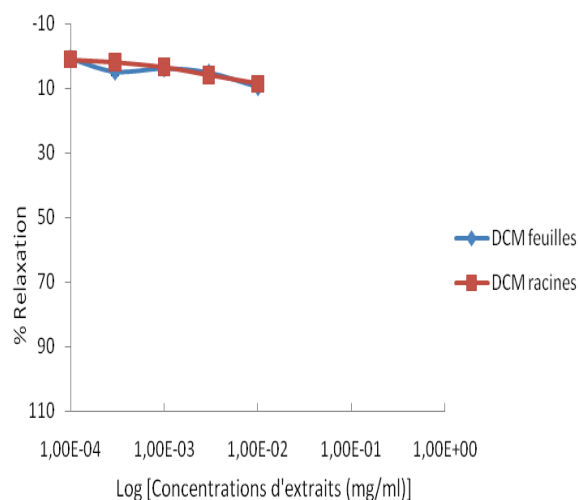


Figure 4 : Effets des extraits chlorométhyléniques sur la trachée précontractée

La non hydrosolubilité des extraits méthanoliques et chlorométhyléniques n'a pas permis l'utilisation de concentrations plus grandes que 2.10^{-2} et 10^{-2} mg/ml, respectivement. La relaxation maximale et les concentrations efficaces 50% ont été les suivantes :

Décoctés : E_{max} des feuilles a été $65,52 \pm 2,14\%$ avec CE_{50} de 601 ± 62 $\mu\text{g/ml}$; E_{max} des racines a été $70,54 \pm 16,07\%$ avec EC_{50} de 782 ± 53 $\mu\text{g/ml}$. *Extraits hydro-alcooliques* : pour les feuilles, E_{max} a été

$76,29 \pm 2,19\%$ avec CE_{50} de 692 ± 31 $\mu\text{g/ml}$; pour les racines, E_{max} a été $107,76 \pm 2,79\%$ avec $EC_{50} = 364 \pm 57$ $\mu\text{g/ml}$.

Extraits méthanoliques : E_{max} des feuilles a été $7,79 \pm 0,95\%$ avec CE_{50} indéterminable ; E_{max} des racines a été $29,13 \pm 21,45\%$ avec EC_{50} indéterminable.

Extraits chlorométhyléniques : E_{max} des feuilles a été $9,71 \pm 1,3\%$ avec CE_{50} indéterminable ; E_{max} des racines a été $8,67 \pm 4,87\%$ avec CE_{50} indéterminable.

Discussion

La comparaison des résultats obtenus avec les feuilles et les racines, par la même méthodologie, a permis de relever que les activités des extraits décoctés et chlorométhyléniques n'ont pas présenté de différence significative ; par contre les activités des extraits hydro-alcooliques et méthanoliques, ont présenté une différence significative, les écorces des racines ayant été plus actives que les feuilles : $p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement. Toutefois l'extrait hydro-alcoolique des feuilles, qui a été obtenu à froid, a été plus actif que le décocté des mêmes feuilles avec $p < 0,01$. Tant pour les écorces de racines que pour les feuilles, les extraits chlorométhyléniques ont été faiblement antispasmodiques ; les extraits les plus actifs ont été les hydro-alcooliques, les décoctés, et les méthanoliques, suggérant la présence de métabolites actifs polaires dans cette plante. Cependant, ce sont plutôt des composés apolaires qui ont été isolés, à ce jour, de la plante, à savoir le 2,3-trans-3',4',7,8-tetrahydroxyflavane-3-ol (Jagadeeshwar-Rao *et al*, 2003), et des dérivés de méroterpène (Long *et al*, 2009). Selon une étude menée au Zimbabwe, *D. cinerea* fait partie des espèces végétales les plus prescrites en médecine traditionnelle pour le traitement d'infections sexuellement transmises, les parties de plantes les plus fréquemment utilisées étant les racines, et généralement les extraits aqueux ont une activité moindre que les extraits à l'acétone ou au méthanol (Kambizi et Afolayan, 2001). Ailleurs au Soudan, il a été montré que les feuilles de la plante possédaient aussi des activités anti-infectieuses, les extraits les plus actifs étant les plus polaires (Eisa *et al*, 2000). Etant donné que les gousses de *D. cinerea* se sont avérées de bons suppléments alimentaires (Mlambo *et al*, 2004 ; Yayneshet *et al*, 2008 ; Maphosa *et al*, 2009), et que le 3-O-acyle mesquitol, isolé de la plante, a montré une capacité à piéger les radicaux libres (Jagadeeshwar-Rao *et al*, 2003), l'hypothèse de la combinaison de l'effet

stimulant de croissance et de la propriété anti-oxydante, en faveur de l'utilisation de la plante contre l'asthme (Kumar *et al*, 2004), est envisageable. Les alcaloïdes, mis en évidence dans les écorces de racines pendant nos précédentes études, ont été absents dans les feuilles : ceci expliquerait-il que certains extraits de feuilles aient été relativement moins actifs que les extraits d'écorces de racines de mêmes polarités ? Rodman *et al* (1984) ont noté une variation significative de la quantité de composés chimiques, en fonction de la partie de la plante, les parties souterraines étant plus riches ; une autre étude, comparative des feuilles et des racines de *Withania somnifera*, a révélé des différences qualitatives et quantitatives, fortement significatives, entre les deux parties de la plante, particulièrement en ce qui concerne les métabolites secondaires (Chatterjee *et al*, 2010). En revanche, l'étude comparative de l'activité antibactérienne des racines et des feuilles de *Pelargonium sidoides*, en Afrique du sud, a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les concentrations minimales inhibitrices des deux parties de la plante, suggérant que les racines, jusque là seule partie de la plante utilisée traditionnellement contre diverses infections, pouvaient être substituées par les feuilles (Lewu *et al*, 2006). Concernant notre étude, l'extrait hydro-alcoolique des feuilles, à la concentration de 1 mg/ml, contrairement à l'extrait hydro-alcoolique des écorces de racines, n'a pas supprimé totalement les contractions induites par le carbachol. Toutefois, à cette concentration maximale testée, cet extrait de feuilles a induit une relaxation de plus de 70%, qui pourrait être mise à profit dans le traitement traditionnel de l'asthme.

En conclusion, les extraits de feuilles ont montré des effets antispasmodiques considérables, quoiqu'inférieurs à ceux des racines. Il serait donc possible d'utiliser les feuilles au lieu des racines, en vue de la préservation des biodiversités africaines.

Remerciement

Les auteurs remercient le Professeur L. Aké-Assi (Centre National de Floristique d'Abidjan) pour l'identification botanique, le Docteur V. Domergue-Dupont (IFR141, Châtenay-Malabry, France) et son équipe, pour l'entretien des animaux, et Madame F. Lefebvre (UMR-S 769, Châtenay-Malabry, France) pour

l'assistance technique. L'étude a bénéficié d'un apport financier du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), et de l'Université Paris-Sud 11.

Références

- Adjanohoun E.J., Aké-Assi L., 1979. Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre National de Floristique Abidjan : Edition CRESS, 1-238.
- Aworet-Samseny R.R., Souza A., Kpahé F., Konaté K., Datté J.Y., 2011. *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight et Arn (Mimosaceae) hydro-alcoholic extract action on the contractility of tracheal smooth muscle isolated from guinea-pig. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**: 23-30.
- Chatterjee S., Srivastava S., Khalid A., Singh N., Sangwan R.S., Sidhu O.P., Roy R., Khetrapal C.L., Tuli R., 2010. Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemical*, **71**: 1085-1094.
- Eisa M.M., Almagboul A.Z., Omer M.E.A., Elegami A.A., 2000. Antibacterial activity of *Dichrostachys cinerea*. *Fitoterapia*, **71**(3): 324-327.
- Irié-N'guessan G., Champy P., Kouakou-Siransy G., Koffi A., Kablan B.J., Leblais V., 2011. Tracheal relaxation of five Ivorian anti-asthmatic plants: Role of epithelium and K⁺ channels in the effect of the aqueous-alcoholic extract of *Dichrostachys cinerea* root bark. *Journal of Ethnopharmacology*, **138** (2) : 432-438.
- Jagadeeshwar-Rao R., Tiwari A.K., Kumar U.S., Reddy S.V., Ali A.Z., Rao J.M., 2003. Novel 3-O-acyl mesquitol analogues as free-radical scavengers and enzyme inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **13** (16): 2777-2780.
- Jayakumari S., Srinivassa R.G., 2007. Effect of *Dichrostachys cinerea* (Linn.) root extract on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Natural Products Sciences*, **13**(3): 180-185.
- Kambizi L., Afolayan A.J., 2001. An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**(1): 5-9.
- Kumar S.S., Shanmugasundaram K.R., 2004. *Amrita bindu*, an antioxidant inducer therapy in asthma children. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**: 105-114.
- Lewu F.B., Grierson D.S., Afolayan A.J., 2006. The leaves of *Pelargonium sidoides* may substitute for its roots in the treatment of bacterial infections. *Biological Conservation*, **128**: 582-584.
- Li L., Vaali K., Paakkari I., Vapaatalo H., 1997. Bradykinin, lemakalim and sodium nitroprusside relax the mouse trachea *in vitro* by different mechanisms. *Life sciences*, **61**(7), PL 67-73.
- Long C., Marcourt L., Raux R., David B., Gau C., Menendez C., Gao M., Laroche M.F., Schambel P., Delaude C., Ausseil F., Lavaud C., Massiot G., 2009. Meroterpenes from *Dichrostachys cinerea* inhibit protein farnesyl transferase activity. *Journal of Natural Products*, **72**(10): 1804-1815.
- Maphosa V., Sikosana J.L., Muchenje V., 2009. Effect of doe milking and supplementation using *Dichrostachys cinerea* pods on kid and doe performance in grazing goats during the dry season. *Tropical Animal Health Products*, **41**(4): 535-541.
- Mlambo V., Smith T., Owen E., Mould F.L., Sikosana J.L.N., Mueller-Harvey I., 2004. Tanniniferous *Dichrostachys cinerea* fruits do not require detoxification for goat nutrition: in sacco and in vivo evaluations. *Livestock Production Sciences*, **90**: 135-144.
- Rodman J.E., Louda S.M., 1984. Phenology of Glucosinolate Concentrations in Roots, Stems and Leaves of *Cardamine cordifolia*. *Biochemical Systematics Ecology*, **12**(1): 37-46.
- Yayneshet T., Eik L.O., Moe S.R., 2008. Feeding *Acacia etbaica* and *Dichrostachys cinerea* fruits to smallholder goats in northern Ethiopia improves their performance during the dry season. *Livestock Sciences*, **119**: 31-41.