

Etude comparative de la toxicité des extraits de deux espèces de *Alstonia* (Apocynaceae) utilisées traditionnellement au Gabon pour soigner le paludisme

Bourobou Bourobou H.P.¹ ; Lekana-Douki J.B.^{2,3} ; Fousseyeni T.-N.² ; Bhattacharya D.⁴

¹ Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelles (IPHAMETRA) ;

² Unité de Parasitologie Médicale – Centre International des Recherches de Franceville, Gabon (CIRMF)

³ Département de Parasitologie – Mycologie, Université des Sciences de la Santé (USS), Gabon

⁴ *Jeevohitayesevamahe; Livingbeing welfare*. Public Health, Indology & Earth Sciences, C/o Sri Radha Krishna, Kedar Gouri Road Bhubaneswar - 751002, Odisha, India.

Date de réception : 07 décembre 2014 ; Date de révision : 11 avril 2015 ; Date d'acceptation : 19 juin 2015

Résumé

Alstonia boonei et *Alstonia congensis* sont deux espèces d'Apocynaceae botaniquement très affines. *Alstonia boonei* a été longtemps confondue avec *Alstonia congensis*, ce qui n'exclut pas que des échantillons de *Alstonia boonei* aient été étudiés par le passé, sous la dénomination de *Alstonia congensis*. Les écorces de ces 2 espèces de plantes sont utilisées par les populations africaines pour traiter différentes affections telles que le paludisme, les helminthiases, les douleurs rhumatismales, etc... En cas de besoin et quel que soit l'espèce, ces populations utilisent l'une ou l'autre des espèces. Ainsi, compte tenu de leurs ressemblances morphologiques mais surtout de l'usage identique que les populations en font à propos du paludisme, ces deux espèces pourraient avoir la même composition chimique, et par conséquent, les mêmes propriétés biologiques. La présente étude a donc pour objectif de comparer le niveau de toxicité des extraits de ces deux espèces d'*Alstonia*. Les résultats obtenus montrent que *Alstonia boonei* et *Alstonia congensis* ont une très faible toxicité sur les cellules embryonnaires humaines : à la concentration de 2g/ml, 90% des cellules restent encore vivantes alors qu'à des concentrations inférieures, la croissance des cellules est stimulée. De tels résultats soutiennent bien que l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle ne représente qu'un risque très limité en termes de toxicité. L'utilisation des deux *Alstonia* pourrait donc être envisagée dans le cadre de la production des phytomédicaments non toxiques, peu onéreux et efficaces comme le recommande l'OMS à nos différents pays. Toutefois, des études complémentaires doivent être envisagées.

Mots clés : *Alstonia*, Paludisme, plantes, toxicité, Gabon.

Comparative study of toxicity of extracts of two species from *Alstonia* (Apocynaceae) traditionally used to treat malaria in Gabon

Abstract

Alstonia boonei and *Alstonia congensis* are two botanically related species from Apocynaceae. *Alstonia boonei* has been for a long mixed up with *Alstonia congensis*. Indeed this doesn't exclude the fact that *Alstonia boonei* was used in the past under the denomination of *Alstonia congensis*. Stem barks of these two plant species are used by African populations to treat different diseases like malaria, helminthiasis, rheumatic pains, etc... When need and regardless of the species, the populations use one or another of these species. Therefore, because of their morphologic similarity and more over the fact that they are used in the same way to treat malaria, these two species might have the same chemical composition and consequently the same biological proprieties. The present study thus aimed at comparing the toxicity level of extracts of these two *Alstonia* species. The results show that *Alstonia boonei* and *Alstonia congensis* have a low toxicity level on human embryonic cells. At a concentration of 2g/ml, 90% of the cells still remain alive, whereas at lower concentrations cell growth is stimulated. Such results justify that the use of these plants in traditional medicine presents a very limited risk in terms of toxicity. The use of these two *Alstonia* can be planned in the context of production of none toxic, cheap and efficacious phytomedicines as recommended by the WHO to our different countries. However, further studies will be needed.

Key words: *Alstonia*, malaria, plants, toxicity, Gabon.

Introduction

Alstonia boonei et *Alstonia congensis* sont des arbres des forêts gabonaises vivant dans des biotopes différents. La première espèce est inféodée aux marécages ; alors que la deuxième se rencontre sur terre ferme. *Alstonia congensis* est un très arbre des forêts humides d'Afrique pouvant atteindre jusqu'à 40 m de haut, avec un fût cylindrique très droit. L'espèce s'étend de la Gambie à l'Ouganda jusqu'en République Démocratique du Congo. *Alstonia congensis* est caractérisé par des feuilles simples, disposées en verticilles par 5 à 8. Le verticille terminal a

l'aspect d'une feuille composée digitée peltée. L'arbre a de grandes fleurs mesurant 1,5 cm de long environ, protégées par des pédicelles de 4-5 mm de long. Les fruits sont composés de deux longues gousses atteignant 50 cm de long (Aubréville, 1959). *Alstonia boonei* est également un grand arbre aux feuilles verticillées en général par 8 d'environ 15 cm de long et 7 cm de large. Les inflorescences sont garnies de fleurs blanchâtres, par paires ; le tube de la corolle mesure environ 9 mm de long (Adjanohoun et al., 1988). Les deux espèces d'arbre ont la grande

(*) Correspondance : e-mail : Henribourobou@yahoo.fr ; B.P. 26641, Libreville, Gabon

réputation de lutter traditionnellement contre les symptômes du paludisme. D'après les travaux de nombreux auteurs sur l'utilisation spécifique de *Alstonia boonei*, il en résulte que l'espèce est diversement utilisée en fonction de sa situation géographique en Afrique. Ainsi on a pu inventorier, les différentes utilisations de cette espèce sur le continent africain et ailleurs (Fofana Souleymane, 2004) :

- Au Nigeria, l'écorce et la racine sont considérées comme fébrifuge et antipaludique ordinaire (Dalziel, 1956) ;
- Au Ghana et au Cameroun la décoction de l'écorce est aussi utilisée contre le Paludisme (Taylor, 1966) ;
- En Inde l'écorce est utilisée contre le paludisme avec diarrhée chronique possédant un effet inférieur à celui de l'écorce du quinquina mais sans effet secondaire (comme le bourdonnement d'oreilles : Fofana Souleymane, 2004) ;
- Au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire (Bouquet et Debray, 1974 ; Fofana Souleymane, 2004), on utilise la décoction de l'écorce pour nettoyer les plaies suppuratives et le traitement des fractures ouvertes ; le macéré de l'écorce est utilisé contre

la jaunisse (ictère) en Côte-d'Ivoire ; la sève est utilisée contre la toux et les douleurs de la gorge et en application externe contre les affections de la peau; la pâte de feuilles permet de réduire aussi les œdèmes ; selon les mêmes auteurs, l'écorce, la racine et les feuilles sont utilisées également pour soulager les douleurs rhumatismales et plusieurs autres douleurs.

Au Gabon, les écorces des deux espèces sont utilisées soit comme antipaludique et anthelminthique, soit comme galactogène (Walker et Sillans, 1961 ; Bourobou et al., 1996).

Par ailleurs, il faut noter que *Alstonia boonei* est une espèce qui a été longtemps confondue avec *Alstonia congensis*. De fait, il ne serait pas exclu que les échantillons d'*Alstonia boonei* aient été étudiés sous la dénomination de *Alstonia congensis*. Ces deux espèces botaniquement très affines pourraient vraisemblablement avoir la même composition chimique ce qui pourrait se traduire par des activités biologiques identiques. Ainsi, l'objectif de la présente étude a été de comparer les niveaux de toxicité *in vitro* sur les cellules d'embryons humains de 12 semaines MRC-5 des deux espèces d'*Alstonia*.

2. Matériel et méthode

2.1. Préparation des extraits de plantes

Conformément aux mélanges traditionnels utilisés au Gabon, les extraits d'*Alstonia* ont été effectués à partir du mélange contenant 100g d'écorces, 62ml de jus de citron et 1,4L d'eau. Ce mélange a été ensuite incubé 5 jours à température ambiante avant évaporation à basse pression à l'aide d'un appareil Rotavapor. L'extrait brut, solide a été ensuite dissout dans le milieu de culture (DMEM+10%SVF+2mM L-Glutamine+ penicillin/streptomycin/neomycin (0,5/0,5/1µg/ml) à une concentration initiale de 20g/L.

2.2. Test de cytotoxicité

La cytotoxicité des extraits a été évaluée sur des cellules embryonnaires diploïdes humaines MRC-5, en utilisant le kit de tetrazolium MTT 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide (Sigma®) qui utilise une méthode colorimétrique basée sur le clivage du réactif par la déhydrogénase mitochondriale dans les cellules vivantes (Mossman, 1983). Ainsi, 5000 cellules ont étéensemencées dans les puits

des microplaques à 96 puits, dans le milieu de culture (DMEM+10%SVF+2mM-L-Glutamine+ penicillin/streptomycin/neomycin (0,5/0,5/1µg/ml). Après 24h, les cellules ont été lavées et incubées pendant 7 jours, à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, en présence de concentrations croissantes de chaque extrait (de 3,9 à 2000 µg/ml). La cytotoxicité a été mesurée par le calcul du pourcentage de réduction d'absorbance à 570 nm, des puits contenant des cellules MRC-5 en présence des extraits par rapport à un contrôle sans extrait. Toutes les expériences ont été faites au moins deux fois.

2.3. Détermination de la concentration inhibitrice et de la dose létale

Les valeurs de la DL (Dose létale) représentées ont été calculées à partir des valeurs moyennes des deux expériences indépendantes. La concentration létale induisant la diminution de 50% des cellules embryonnaires humaines MRC-5 (DL₅₀) a été calculée par analyse d'une courbe sigmoïdale dose-réponse à régression non linéaire (Prism v. 4.0a).

3. Résultats

3.1. Concentrations de matières extraites

Le Tableau 1 montre que la quantité de matière sèche obtenue à partir de 100g d'*A. boonei* est significativement le double de celle observée

avec *Alstonia congensis*, ce qui renvoie directement à une concentration double de matière dans le mélange de *Alstonia boonei*.

Tableau 1. Concentration des extraits

Désignation	<i>A. boonei</i>	<i>A. congensis</i>
Volume évaporé (L)	1,1	1,12
Masse d'extraits récupérée (g)	14,6	8,4
Concentration d'extraits (g/l)	13,26	7,68

A noter que la concentration d'extraits renvoie de facto à la concentration d'extraits dans la

suspension médicinale préparée initialement, telle que les patients la consomment.

3.2. Toxicité des extraits

La toxicité des extraits bruts des 2 *Alstonia* a été comparée à celle des extraits de plante *Omara*® utilisée en gélule pour le traitement antipaludique en Inde. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 1. La figure relative à la toxicité des extraits montre que le pourcentage de survie des cellules baisse ou augmente en ou augmente en fonction des concentrations

d'extraits aqueux des plantes. A partir de la gamme de concentrations utilisée, les deux (2) *Alstonia* ont une DL_{50} à l'infini.

Alstonia boonei : le pourcentage de survie des cellules baisse de 100 % à 70% pour des concentrations de 15,625 $\mu\text{g/ml}$ ou encore de 104% à 80% pour des concentrations de 250 $\mu\text{g/ml}$.

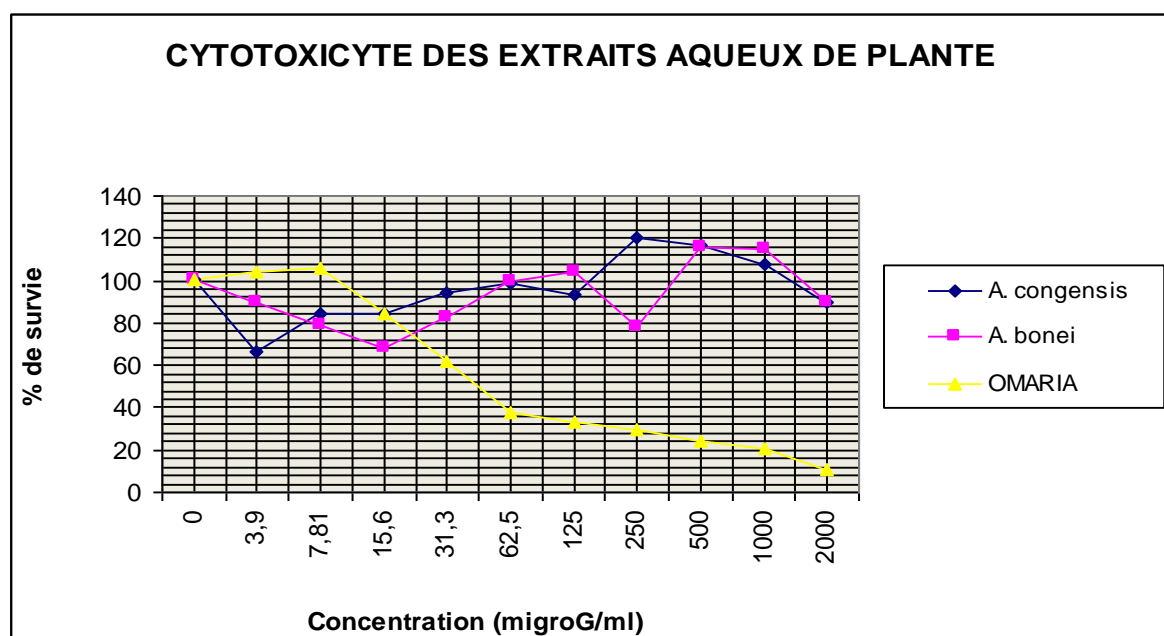


Figure 1: courbes représentatives de la survie des cellules MRC-5 en présence des concentrations croissantes de *A. congensis*, *A. boonei* et *Omara*. *OMARIA* est un contrôle positif de la toxicité ; cette plante est utilisée sous forme de gélule pour le traitement du paludisme en Inde. DL_{50} (*OMARIA*) = 46.9 $\mu\text{g/ml}$

Par contre, on obtient des pics de 104% de survie pour 125 $\mu\text{g/ml}$ de concentrations d'extraits ; les concentrations d'extraits de l'ordre de 500-1000 $\mu\text{g/ml}$ donnent un pic de 116% de survie de cellules ; alors que le pourcentage de survie des cellules baisse jusqu'à 84% pour des concentrations de 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Alstonia congensis : le pourcentage de survie des cellules baisse de 100% à 68% pour des concentrations de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ ou encore de 120% à 104% pour des concentrations de 250-2000 $\mu\text{g/ml}$. Les pics de survie sont obtenus respectivement à 62,5 et à 250 $\mu\text{g/ml}$ de concentrations d'extraits soit 90% et 120%.

Discussions et conclusions

Du fait de la facilité d'accès, *A. congensis* est l'espèce la plus utilisée par les populations au Gabon. Nous montrons à travers cette étude que

les 2 *Alstonia* ont une toxicité moindre par rapport à la plante *Omara* qui est utilisée dans la pharmacopée indienne. Si peu de travaux ont

porté sur *A. congensis*, de nombreux autres travaux ont mis en évidence les effets bénéfiques de *A. boonei* :

- les écorces présentent des propriétés antiinflammatoires, antipyrétiques, et analgésiantes (Olajide et al., 2000). Ces propriétés pourraient s'expliquer par la présence des triterpénoïdes isolés dans ces écorces (Rajic et al., 2000) ;

- l'activité antipaludique de *A. boonei* a été décrite (Odugbemi et al., 2006).

Les deux espèces de *Alstonia* testées ont une très faible toxicité sur les cellules embryonnaires humaines; ceci montre que l'utilisation de telles

plantes en Médecine Traditionnelle comme antipaludiques ne représenteraient après analyse des premiers résultats qu'un risque très limité en terme de toxicité.

Dans la perspective de la recherche de nouveaux médicaments, de telles plantes peuvent faire l'objet d'une fabrication des Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) à défaut d'isoler le(s) principe(s) actif(s) à l'origine des effets médicamenteux de ces plantes; c'est pourquoi, cette étude que nous considérons préliminaire doit être poursuivie pour confirmer davantage les résultats actuels.

Références

Aubrèville, A., 1959. La flore forestière de la Côte d'Ivoire. Tome 3, 2^e édition. CIPT. Nogent sur Marne, France. 321 p.

Adjanohoun E.J., Ahvi A.M.R., Aké Assi L., Baniakina J., Chibon P., Cusset G., Doulou V., Enzanga A., Eymé J., Goudoté E., Keita A., Mbemba C., Mollet J., Moutsambouté J.M., Mpati J., Sita P., 1988. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo. ACCT. Paris. 605 p.

Bouquet A., Debray M., 1974. Féticheurs et plantes médicinales de la Côte-d'Ivoire. ORSTOM. Paris.

Bourobou Bourobou H., Mounzé H., Mbatchi B., Posso P., 1996. Quelques plantes galactogènes utilisées chez les Punu au Gabon. *Revue Méd. Pharm. Afr.* 10 (1): 71-78.

Dalziel J.M., 1956. Useful Plants of west Tropical Africa. Crown Agents for overseas government. Londres.

Fofana Souleymane, 2004. Exploration biochimique sur le pouvoir immunogène de trois plantes en Côte d'Ivoire : *Alstonia boonei* (Apocynaceae), *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) et *Terminalia catappa*

(Combretaceae). Thèse doctorat Pharmacie. Université de Bamako. 123 p.

Mossmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 65: 55-63.

Odugbemi T.O., Akinulire O.R., Aibinu J.E., Fabeku P.O., 2006. Medicinal plants useful for malaria therapy in Okeigbo, Ondo State, Southwest Nigeria. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 4: 191-198.

Olajide O.A., Awe S.O., Makinde J.M., Ekhelar A.L., Olusola A., Morebise O., Okpako D.T., 2000. Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *J Ethnopharmacol.* 71: 179-186.

Rajic A., Kweifio-Okai G., Macrides T., Sandeman R.M., Chandler D.S., Polva G.M., 2000. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med.* 66: 206-210.

Taylor N., 1966. Plants drugs That changed the World. George Allen et Unwin. London.

Walker R., Sillans R., 1961. Les plantes utiles du Gabon. Lechevalier. Paris, 614 p.