



Activités anticholinestérasiques des alcaloïdes totaux extraits des feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de tronc de *Guiera senegalensis*, une plante médicinale Malienne

A.A. SOMBORO^{1*}, D. DIALLO², L. SIDIBE¹, N. TRAORE¹, B. FOFANA¹,
S. BOUARE¹, P. CHALARD³, J.C. CHALCHAT³, G. FIGUEREDO³ et Y. TROIN³

¹Université des Sciences des Techniques et Technologies de Bamako, Faculté des Sciences et Techniques, Bamako, Mali.

²Université des Sciences des Techniques et Technologies de Bamako, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Département de Médecine Traditionnelle, Mali.

³Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand II, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et des Glucides, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière, France.

*Auteur correspondant ; E-mail : aininsomboro@yahoo.fr

RESUME

Guiera senegalensis J. F. Gmel., arbuste d'espèce soudano-sahélienne; surtout abondant en Afrique occidentale. Très connu dans le sahel où il forme des peuplements mono spécifiques qu'on trouve dans les jachères, sur sol argileux ou sableux. Il est largement utilisé en médecine traditionnelle. Dans la perspective de découvrir de nouveaux composés pouvant trouver une application notamment dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, nous avons réalisé les tests d'activité anticholinestérase sur les alcaloïdes totaux extraits des organes des 3 sites de récolte et avec comme produit de référence la Galanthamine. L'action thérapeutique des inhibiteurs des cholinestérases est essentiellement due à l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Les résultats obtenus semble très intéressent avec les fruits des trois sites. Ce qui pourrait être une base solide pour la recherche d'un phytomédicament contre cette affection.

© 2013 International Formulae Group. All rights reserved

Mots clés : *Guiera senegalensis*, alcaloïdes, inhibition acétylcholinestérase.

INTRODUCTION

Avec le vieillissement de la population, la maladie d'Alzheimer est devenue un problème de santé publique. Outre la prise de conscience générale des problèmes que pose cette maladie, son coût global pour la société, déjà très élevé, ne devrait cesser de s'alourdir car sa prévalence croît d'une manière exponentielle avec la croissance de

l'espérance de vie (WWW.medecine.ups-tlse.fr).

Il est à retenir que la majeure partie des recherches pharmacologiques réalisées sur le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) a été guidée par un constat : l'existence d'une relation dans la MA entre le déficit des neurotransmissions cholinergiques et les différents symptômes, en particulier cognitifs. Les recherches ont donc eu pour but essentiel,

jusqu'à présent, d'augmenter l'activité cholinergique centrale (Schneider et al., 1994). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à une plante très connue en Afrique Occidentale et qui est utilisée comme panacée pour soigner diverses affections : *Guiera senegalensis*. Plusieurs propriétés lui sont reconnues principalement des propriétés béchiques, eupnéiques et fébrifuges. Ce sont ces propriétés qui expliquent sa prescription comme antitussif, pour améliorer les états dyspnéiques, pour lutter contre les pneumopathies et les bronchopathies, mais également pour traiter le paludisme. (Kerharo et Adam, 1974 ; Malgras, 1992).

Notre étude a donc pour but, de réaliser une activité anticholinestérasique des extraits des organes des trois sites ciblés et de faire une étude comparative des activités des alcaloïdes totaux des différents organes de la plante (feuilles, fruits, écorces de racines et écorces de troncs) récoltés sur chacun des sites, malgré que la revue bibliographique ne confirme pas l'utilisation de cette plante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Il existe deux types de cholinestérases : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Bien que toutes deux soient présentes dans le cerveau, l'acétylcholinestérase prédominante au niveau central est la principale responsable du métabolisme de l'acétylcholine dans le cerveau, alors que la butyrylcholinestérase a principalement une action périphérique et peut aussi être à l'origine d'effets périphériques indésirables (Crismon, 1998). L'action thérapeutique des inhibiteurs des cholinestérases est donc essentiellement due à l'inhibition de l'acétylcholinestérase au niveau central.

La Tacrine, aminotétrahydroacridine, est un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase. D'abord proposée comme antagoniste des pachycurases, elle est maintenant indiquée dans la maladie d'Alzheimer, caractérisée par une aphasia, une agnosie et une apraxie, survenant chez le

vieillard par dégénérescence des neurones centraux avec déficit de l'acétylcholine (Cohen, 1994). Actuellement, la Tacrine est de plus en plus abandonnée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer au profit de certains alcaloïdes d'origine végétale telle que la Galanthamine (Fulton, 1996).

La maladie d'Alzheimer doit son nom au psychiatre allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) qui a décrit en 1906 pour la première fois les symptômes de la maladie. La maladie d'Alzheimer n'a été reconnue qu'en 1963 comme maladie en tant que telle et non comme un processus normal de vieillissement du cerveau.

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative. Cette démence se traduit par une perte fonctionnelle progressive des cellules nerveuses. Les premières lésions apparaissent dans les zones corticales du cerveau, zones impliquées dans la mémoire. Au fur et à mesure de son évolution, la maladie va affecter de nouvelles régions du cerveau ; ce qui va se traduire par des difficultés du langage, de raisonnement, des capacités gestuelles, mais aussi, par des troubles du comportement (Braak, 1998). Elle est la cause la plus fréquente de démence, avec une prévalence hautement âge dépendante (Orgogozo, 1998).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Pour cette étude nous avons choisi trois sites de récolte situés dans différentes zones climatiques du Mali : Le site de Badougou nafadji dans la région de Koulikoro, au Sud Ouest du pays, a un climat soudano-guinéen caractérisé par un indice pluviométrique de 950 mm à 1250 mm avec une saison pluvieuse unique de 5 mois. La végétation rencontrée sur cette région est la savane.

Le site de Daral, également dans la région de Koulikoro, mais au Nord Est par rapport à Badougou nafadji, a un climat guinéen caractérisé par un indice pluviométrique de 750 à 950 mm. La saison pluvieuse unique a une durée d'environ 4

mois et la végétation est de type savane tropicale.

Le site de Ségué, dans la région de Mopti, a un climat assez aride, de type sahélien caractérisé par un indice pluviométrique de 500 à 750 mm. La saison pluvieuse est de 3 mois maximum et la végétation est de type steppe épineuse et herbacée.

Les différents organes de *Guiera senegalensis* (les feuilles, les fruits, l'écorce de racine et l'écorce de tronc) ont été récoltés en Juillet 2007 dans chacun des trois sites choisis.

Ces échantillons de plantes ont été identifiés par le Département de Médecine Traditionnelle (D.M.T.) de Bamako, Mali et un spécimen est déposé à l'herbier du DMT sous le numéro 2254. Les organes ont été séchés pendant deux semaines à la température ambiante d'une salle aménagée à cet effet, puis pulvériser à l'aide d'un mortier traditionnel et mis dans de grandes enveloppes pour conservation.

Méthodes

Extraits d'alcaloïdes totaux des organes

Les extraits ont été préparés en janvier 2008 dans le laboratoire des Hétérocycles et des Glucides de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand, selon le schéma de l'extraction par un solvant organique non polaire en milieu alcalin sur les différents organes de la plante cités ci-dessus.

Détermination de l'activité anticholinestérase

La révélation de l'activité enzymatique est réalisée avec la méthode d'Ellman (1961), qui utilise un substrat artificiel, l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse conduit à la formation de Thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNB (5,5'-dithiobis-[2 nitrobenzoate]).

Nous pouvons décrire de façon simplifiée en disant que c'est une méthode colorimétrique basée sur la méthode d'Ellman : L'acétylcholinestérase (AChE) agit sur

l'acétylthiocholine iodide (ACTI) en milieu aqueux pour libérer la Thiocholine qui, en agissant avec l'acide dinitrobenzoïque (DTNB), donne une coloration jaune.

C'est une méthode colorimétrique basée sur la méthode d'Ellman AChE + ACTI (milieu aqueux) Acide acétique + Thiocholine Thiocholine + DTNB 5-thio-2-nitrobenzoate + 2-nitrobenzoate-mercaptopthiocholin. Schéma du principe de l'activité Anticholinestérasique :

Les matériels : Plaques C.C.M en aluminium, cuve de migration, lampe UV, micropipettes, hotte, pulvérisateurs, ultra-son.

Réactifs : 5,5'- Dithiobis- 2 nitrobenzoïque acide (5 mM DTNB), Acétylcholinestérase (3 unités/mL AChE), acétylthiocholine iodide (5 mM ATCI), Galanthamine,

Solution étalon de Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane (50 mM tris pH 8,0)

Solvants de dissolution : Les extraits ont été dissous dans le dichlorométhane. Le Tris (Hydroxyméthyl) amino-méthane dans de l'eau distillée.

Etude de l'activité anticholinestérase

Elle est basée sur deux réactions :

Réaction de vrai positif

Appliquer (10 µL) des extraits (10 mg/mL) ou le produit standard sur la plaque Développer les plaques avec un système de solvant : Acétate d'éthyle/Méthanol dans les proportions (9/1). Sécher la plaque ; Pulvériser avec la solution (ACTI + DTNB) ; Sécher la plaque pendant 3-5 minutes ; Pulvériser avec une solution Acétylcholinestérase (3 UI/ml AChE) ; Observer et enregistrer automatiquement les spots blancs sur fond jaune sur la plaque.

Réaction de faux positif

Opérer comme dans la réaction de vrai positif jusqu'à l'étape c).

d) Pulvériser avec la solution d'acide dinitrobenzoïque (5 mM DTNB) ;

e) Sécher la plaque pendant 3-5 minutes ;

- f) Pulvériser avec la solution (ATCI + AchE) ;
- g) Observer et enregistrer le spot blanc sur fond jaune.

Composition des réactifs

Réaction de vrai positif

Dissoudre dans 10 mL de 50 mM tris pH 8.0

ATCI.....14,5 mg

DTNB.....19,8 mg

Dissoudre dans 9940 µL de tris pH 8.0

AchE (3 UI/ml).....60 µL

Réaction de faux positif

Dissoudre dans 9940 µL de 50 mM tris pH 8.0

AchE (3 UI/ml).....60 µL

ATCI.....14,5 mg

Dissoudre dans 10mL de 50 mM tris pH 8.0

DTNB.....19,8 mg. Les tests sont réalisés aux Département de Médecine

Traditionnelle (DMT) de Bamako.

RESULTATS

L'activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase est déterminée par l'apparition des spots blancs sur fond jaune sur la plaque C.C.M après pulvérisation des solutions préparées à cet effet.

Résultat positif

Les spots blancs sur plaque de C.C.M (VP) ne correspondent pas aux mêmes taches blanches sur plaque C.C.M (FP).

Résultat négatif

Les spots blancs sur plaque C.C.M (VP) correspondent aux mêmes taches sur plaque C.C.M (FP). Les résultats sur plaque CCM du vrai et du faux positif aussi bien que le tableau des fronts de retentions se trouvent en annexe1.

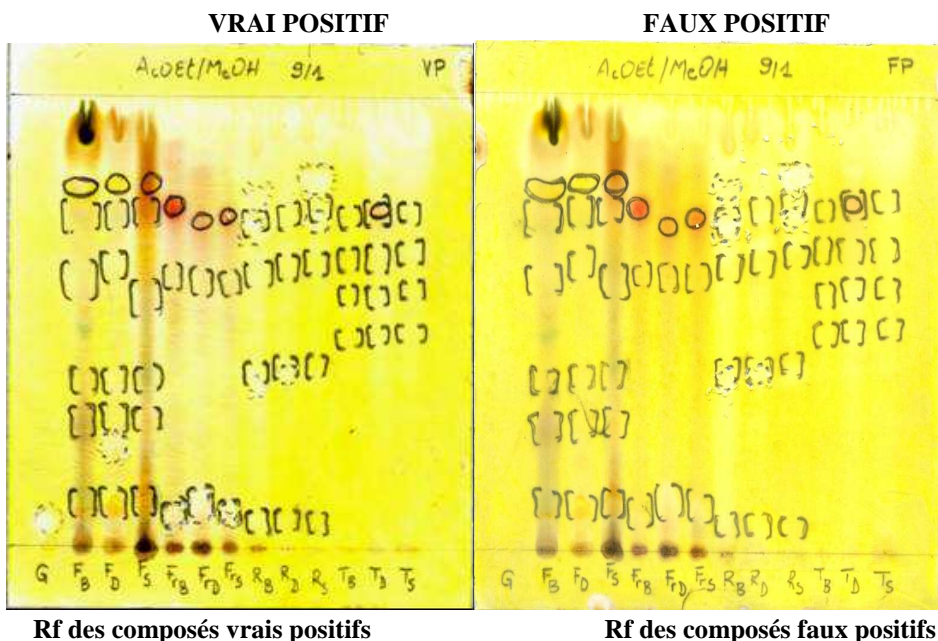


Figure 1: Rf des composés vrais positifs et faux positifs.

Tableau 1 : Calcul de Rf pour les Vrais Positifs et la Galanthamine.

Extraits	Rf
Galanthamine	0,06
A.T. feuilles de Daral	0,22
A.T. fruits de Badougou	0,07 ; 0,59
A.T. fruits de Daral	0,10 ; 0,58
A.T. fruits de Ségué	0,08 ; 0,58
A.T. racine de Badougou	0,6

DISCUSSION

Un résultat positif pour les feuilles du site de Daral au Rf 0,22 a été observé. Des résultats positifs pour les fruits de Badougou nafadji, Daral et Ségué respectivement aux Rf 0,07 et 0,59 ; 0,10 et 0,58 ; 0,08 et 0,58. Un résultat positif pour l'écorce de racine du site de Badougou nafadji au Rf 0,60 a été également observé. Les extraits des feuilles de Badougou nafadji et Ségué, des écorces de racines de Daral et Ségué, et des écorces de tronc de Badougou nafadji, Daral et Ségué n'ont aucunement réagi, mais cela ne signifie pas forcément qu'ils sont inactifs. En effet, il se peut que les substances responsables de l'activité anticholinestérasique soient en faible quantité dans certains de nos extraits ou que ces extraits n'en contiennent pas.

Au vu des résultats positifs observés ceux des fruits des trois sites sont comparables à celui de la galanthamine sur plaque C.C.M. Il ressort également de cette étude que ce sont les fruits qui présenteraient plus de résultats positifs.

Pether et al. (2004), ont mis en évidence par la méthode spectrométrique d'Ellman, l'activité anticholinestérasique des extraits méthanoïques bruts de bulbes de deux espèces de *Crinum* récoltées au Nigéria. Pour eux les substances responsables de cette activité sont les alcaloïdes. Ce qui serait en accord avec les résultats de nos extraits (alcaloïdes). Il se pourrait également que d'autres substances auraient été extraites par

notre méthode d'extraction des alcaloïdes et qui seraient également responsables. Mukherjee et al. (2007) ont rapporté une bonne activité anticholinestérasique des plantes de *Cynanchum atratum* (*Asclepiadaceae*) et *Origanum majorana* (*Lamiaceae*) due respectivement aux glycosides et aux flavonoïdes. Les mêmes auteurs ont cité les alcaloïdes, terpènes, glycosides et coumarines comme des composés pourvus de propriétés anticholinestérasiques (Koné, 2009).

Par conséquent, ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils constituent une contribution à la liste des plantes à activité anticholinestérasique et ils pourraient ouvrir une piste de recherche sur toutes les substances à activité anticholinestérasique.

Conclusion

Les résultats positifs obtenus avec certains organes de la plante nous permettent de croire que cette plante contiendrait une ou des molécules, qui pourront lutter contre les maladies neuro-dégénératives.

La confirmation pourrait être obtenue en faisant des tests bio-guidés en vue d'isoler la molécule possédant l'activité et aussi de valider son efficacité.

Sachant que la maladie d'Alzheimer est l'une de ces maladies, elle est à l'origine de 40 à 70% des syndromes démentiels. Les médicaments actuellement disponibles sur le

marché sont des traitements symptomatiques de la maladie.

Les différents travaux en cours devront pouvoir déterminer dans l'avenir les modalités des traitements préventifs et curatifs de la pathologie de type Alzheimer.

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles de la Faculté des Sciences et Techniques de Bamako pour son soutien matériel. Le Département de Médecine Traditionnelle de Bamako pour la recherche de l'activité anticholinestérasique. Le Laboratoire des Hétérocycles et des Glucides de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand pour les extractions et sa collaboration dans les analyses.

REFERENCES

- Braak H, Braak E. 1998. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, **53**: 127-140.
- Cohen Y. (1994) Abrégés de Pharmacologie 4^{ème} Edition Masson. Paris Milan Barcelone p 441.
- Crismon ML. 1998. Pharmacokinetics and Drug interaction of cholinesterase Inhibitors Administered in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, **18**(2): 47.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88.
- Fulton B, Benfield P. 1996. Galanthamine. *Drugs Aging.*, **1**: 60.
- Kerharo J, Adam, JG. 1974. *La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes Médicinales et Toxiques*. Editions Vigot Frères: Paris; 1011p.
- KONE Dahafolo. 2009. Etude de la phytochimie et des activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante des extraits de quatre plantes du Mali : *Acacia nilotica* Guill. et Perr. (Mimosaceae), *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (Asclepiadaceae), *Euphorbia sudanica* A. Chev (Euphorbiaceae) et *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Thèse de Doctorat.
- Malgras RP, Denis. 1992. *Arbres et Arbustes Guérisseurs des Savanes Maliennes*. Edition KARTHALA et ACCT.
- Orgogozo JM, Forette B, Gamzu E. 1998. La Maladie d'Alzheimer: l'ère thérapeutique.
- Schneider LS, Tariot PN. 1994. Emerging drugs for Alzheimer's disease: mechanisms of actions and prospects for cognitive enhancing medications. *Med Clin. North Am.*, **78**: 911-934.