

Composition phytochimique et propriétés antipaludiques du *Prunus africana* récolté dans la Région du Kivu en RDC

François ZABENE ZAGABE^{1,2*}, Innocent MANO MACHUMU^{1,2} et Vanessa BALAME¹

¹ Département de Chimie - Physique, Institut Supérieur Pédagogique (ISP) de Bukavu, 32 Avenue Kibombo, Ibanda, BP 854 Bukavu, République Démocratique du Congo

² Laboratoire de Chimie, Institut Supérieur Pédagogique (ISP) de Bukavu, 32 Avenue Kibombo, Ibanda, BP 854 Bukavu, République Démocratique du Congo

* Correspondance, courriel : fzabene@gmail.com

Résumé

Cette étude visait à déterminer la composition phytochimique et l'effet antipaludique du *Prunus Africana* cultivé au Kivu dans l'objectif de révéler sa conformité avec les autres espèces cultivées dans les autres pays africains. Le criblage phytochimique effectué sur les extraits aqueux et organiques, a montré que les écorces de cette plante contiennent : des alcaloïdes, des flavonoïdes, des terpènes, des stéroïdes, des tanins, des phénols et des saponines en forte concentration ainsi que les glucosides en faible concentration. La CCM des extraits n'a donné aucun spot identique à ceux des substances de référence utilisées pour soigner la malaria. Par contre la HPLC a montré la présence de β -sitostérol, qui s'est révélé identique à celui de l'étalon primaire. Le test in vitro sur *Plasmodium falciparum* a confirmé que les extraits aqueux, éthanoliques et alcaloïdes totaux de *Prunus Africana* ont un effet positif, les alcaloïdes étant les plus efficaces. Ainsi, le *Prunus Africana* cultivé dans la région du Kivu en RDC conserve la même composition que le *Prunus* cultivé dans les pays africains.

Mots-clés : *Prunus Africana*, *Plasmodium falciparum*, alcaloïdes, β -sitostérol, composition phytochimique.

Abstract

Phytochemical composition and antimalarial properties of *Prunus africana* harvested in the Kivu region of the DRC

This study aimed to determine the phytochemical composition and anti-malaria effect of *Prunus africana* cultivated in Kivu, intending to reveal its conformity with other species cultivated in other African countries. The phytochemical screening carried out on the aqueous and organic extracts, showed that the barks of this plant contain: alkaloids, flavonoids, terpenes, steroids, tannins, phenols and saponins in high concentration as well as glucosides in low concentration. TLC of the extracts did not give any spots identical to those of the reference substances used to treat malaria. On the other hand, HPLC showed the presence of β -sitosterol, which turned out to be identical to that of the primary standard. The in vitro test on *Plasmodium falciparum* confirmed that the aqueous, ethanolic and total alkaloid extracts of *Prunus africana* have a positive effect, with alkaloids being the most effective. Thus, the *Prunus africana* cultivated in the Kivu region in the DRC retains the same composition as the *Prunus* cultivated in African countries.

Keywords : *Prunus africana*, *Plasmodium falciparum*, alkaloid, β -sitosterol, phytochemical composition.

1. Introduction

Le paludisme est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par des moustiques du genre *Anophèle*. Cette maladie ravage surtout les populations vivant en zone intertropicale (zone endémique) et aussi les voyageurs intercontinentaux [1]. Le paludisme représente une charge financière énorme pour les populations et par conséquent, la maladie constitue un obstacle au développement des pays concernés [1]. Pour toutes ces raisons, la lutte contre le paludisme constitue un des « Objectifs du Millénaire » définis par les Nations-Unies, et le Fond Mondial est destiné à approvisionner les pays demandeurs en médicaments [2]. Vers les années 1961, les allemands ont installé une société agro-industrielle au Kivu dénommée CONGOKINA, pour extraire la quinine, car la disponibilité des terres et l'adaptation de la culture de quinquina étaient plausibles. Cette société grandira au sein de l'Afrique et du monde. En 1999, elle est devenue la Pharmakina S.A produisant la quinine sous plusieurs formes : comprimés, sirop, injectable et exportant l'API Quinine (Active Pharmaceutical Ingredient) en sels sulfate, chlorhydrate et bichlorhydrate [3]. On enregistre actuellement une forte demande des écorces de quinquina. Des sociétés indiennes font la collecte dans les territoires de Beni, Lubero, Masisi, Kisangani, des territoires qui étaient a priori des grands fournisseurs de la Pharmakina S.A. A cela s'ajoute le fléau de dévastation dû aux moisissures qui ravagent les plantations entières du quinquina, ce qui a conduit certains planteurs à déraciner cette plante et à favoriser la culture des autres plantes commercialisées ou vivrières. Ces deux phénomènes causent des difficultés à la Pharmakina S.A. dans l'obtention et le ravitaillement en écorces de quinquina. De ce fait, sa production ne fait que baisser. De ce fait, la société a conçu un projet de cultiver environ 600 hectares du *Prunus africana* pour produire dans l'avenir un médicament contre l'hypertrophie bénigne de la prostate (BHP). Mais seuls quelques hectares ont été cultivés dans les plantations de Kalonge et Buhole [4]. Le *Prunus africana* a fait l'objet de plusieurs études: l'inventaire des espèces [6 - 8], son écologie [5, 9], son potentiel de culture [10], les caractères génétiques [11], ses usages traditionnels [5, 12], des études sur la politique et les aspects de régulation de sa commercialisation [13, 14]. En 2003, le *Prunus africana* était utilisé, en phytothérapie par le peuple autochtone du Cameroun pour soigner 30 maladies d'origine animale ou humaine dont la malaria [5].

De plus, lors d'une enquête ethnobotanique au Kenya, il a été trouvé que cette plante est utilisée non seulement pour soigner l'hypertrophie bénigne de la prostate (BHP) mais aussi les maux d'estomac, la fièvre, la diarrhée et bien d'autres maladies [6]. La propriété thérapeutique du *Prunus* contre la BHP est supposée due au phytostérols (β -sitostérol) bien que l'effectivité du pouvoir curatif fait toujours le doute quel que soit le résultat du test clinique effectué [5, 15, 16]. L'investigation sur le traitement de la malaria n'est pas du tout développée à tel point que le principe actif n'est pas identifié. De même, la disponibilité des métabolites primaires et secondaires est tellement dépendante de la biogénèse de leur précurseur. La biosynthèse du précurseur (comme le cas de flavonoïdes ayant comme précurseur le Diméthyl Allyl Pyrophosphate-DMAPP-) est influencée par les nutriments, la composition chimique du sol ou de la nature dans laquelle la plante se développe [17]. La présente étude est réalisée afin de dégager la similitude des propriétés thérapeutiques du *P. africana* cultivé par la Pharmakina par rapport aux autres espèces cultivées en Afrique partant de la détermination de sa composition chimique et le test anti-malarique. Les résultats contribueront à la connaissance scientifique du *Prunus Africana* et doteront à cette industrie pharmaceutique un appas pour une voie de synthèse d'un API capable de soigner le paludisme en dépit de la disparition des écorces de quinquina. Les objectifs spécifiques visés par cette étude sont de déterminer la composition chimique du *Prunus Africana* et évaluer l'efficacité des extraits de cette plante sur le *Plasmodium falciparum*. De ce fait, nous envisageons répondre aux questions suivantes : (1) Le *Prunus Africana* cultivé par la Pharmakina, contient-il les mêmes principes actifs que les *Prunus Africana* cultivés ailleurs ? (2) Ce *Prunus*, contient-il du β -sitostérol, précurseur du principe actif contre l'Hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP) ? (3) Les extraits totaux et isolés de ce *Prunus* ont-ils un effet anti-malarique?

2. Matériel et méthodes

2-1. Description du matériel végétal

La classification systématique de *Prunus africana* étudié est la suivante : Espèce : *Prunus africana*, famille de Rosaceae, ordre de Fabales, sous-ordre : Eurosidiae I, classe de Rosopsida, sous-classe de Rosidae, sous-embouchement : Rosophyina et l'embouchement est de Magnoliophyta [18]. L'échantillonnage a été effectué dans la plantation de Buhole sur les arbres adultes de plus de sept ans de culture et portant des fruits. Seules les écorces du tronc ont été récoltées sur dix arbres abattues. Après mélanges des écorces brutes, cinq kilogrammes d'elles furent séchées à l'étude à 40°C et ensuite moulues.

2-2. Screening phytochimique

Les substances naturelles dans la plante ont été identifiées grâce à des réactifs spécifiques tel que décrit dans le **Tableau 1**. Les techniques utilisées sont issues des méthodes traditionnelles du screening phytochimique [19] réalisé dans le laboratoire de chimie de l'Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu.

Tableau 1 : Description de la recherche des principes actifs

Principe actif	Extrait utilisé	Réactif	Résultat attendu
Alcaloïdes	Aqueux (2 mL)	Mayer (1 mL)	précipité blanc-jaunâtre ou jaune
		Dragendorff (1 mL)	précipité orange-rouge
		Wagner	précipité rouge, brun ou noir
Tannins	Aqueux (5 mL) : 5 g de poudre végétale infusés pendant 30 minutes dans 50 mL d'eau bouillante	FeCl ₃ 1 % (3 gouttes)	colorations bleue, bleu-vert, bleu-noir ou verte avec ou précipité
Flavonoïdes	Aqueux (2 mL)	Dechène (1 mL)	L'apparition des colorations profondes
		Muti (1 mL)	
Terpènes et stéroïdes	Organique (Etherdiéthyl) (2 mL)	Acide sulfurique 85 %	une coloration mauve virant au vert.
Saponines	Aqueux	Agitation horizontale pendant 10 secondes	Hauteur de la Mousse persistante
Glucosides	Aqueux (3 mL)	Liqueur de Fehling acidulé à HCl 1 %	Colorations particulières : rouge-brique, orange-brun
		Acide sulfurique 98 %	
Phénols	Organique (Ethanolique) : 1 mL	FeCl ₃ 1 % (3 gouttes)	Colorations vives
		H ₂ SO ₄ 98 % (1 mL)	

2-3. Extraction et isolement des alcaloïdes

L'isolement des alcaloïdes est basé sur leur solubilité dans les solvants organiques apolaires et l'insolubilité de leurs sels dans les solvants organiques apolaires alors que les mêmes sels sont solubles dans l'eau. Cette extraction peut se faire soit par voie acide (HCl 5 %), soit par voie basique (NaOH 50 %), soit encore par voie directe en utilisant la liqueur de PROLLIUS [20, 21]. Les alcaloïdes ont été extraits dans le laboratoire de Phytochimie du Centre de Recherche en Sciences Naturelles de Lwiro (CRSN/Lwiro). A cet effet, 20 grammes de poudre de l'échantillon ont été macérés dans 100 mL de NaOH 50 % pendant 12 heures. Après filtration, une solution de diéthyléther, chloroforme, eau et ammoniac (dans les proportions de 25 : 8 : 2,5 : 1) a été ajoutée au filtrat. Le mélange fut versé dans une ampoule à décanter, et agité fortement pendant 2 minutes. Après 24 heures de repos, il s'est formée deux phases dont l'une organique claire, superficielle, contenant les

alcaloïdes et l'autre aqueuse contenant les déchets ; la phase claire a été récupérée dans un ballon en pyrex et soumise à l'évaporation du solvant. Le résidu a été récupéré par la solution d'acide chlorhydrique 5 %. Ce mélange obtenu constituait notre extrait alcaloïdique.

2-4. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Cette analyse fut également effectuée au laboratoire de Phytochimie du Centre de Recherche en Sciences Naturelles de Lwiro (CRSN/Lwiro). Nous avons utilisé une plaque chromatographique, un support de gel de silice 60F₂₅₄, d'une épaisseur de 0,2 mm. A 1cm du bord inférieur de la plaque, nous avons marqué à l'aide d'un crayon, des points équivalents horizontaux de 1cm selon le nombre d'échantillons à analyser. Nous avons préparé deux plaques : la première concerne les échantillons témoins (quinine et ammodiaquine, produits utilisés localement pour soigner la malaria) et les extraits éthanolique, alcaloïdique et aqueux. La deuxième concerne les échantillons témoins et l'extrait alcaloïdique. Nous avons préparé l'éluant composé du butanol, de l'acide acétique et de l'eau dans les proportions en volumes de 4 : 1 : 5. Après décantation, il s'est formé deux phases, l'une claire et l'autre turbide. Grâce à une boule à décanter, nous avons récupéré la phase claire que nous avons transvasée dans la cuve chromatographique [22]. Par des tubes capillaires, les échantillons furent déposés sur la plaque à des endroits bien identifiés. La plaque fut immergée à 1cm de hauteur dans l'éluant et la cuve fut fermée hermétiquement afin que l'atmosphère de la cuve soit saturée en éluant volatil. Le déplacement fut attendu, jusqu'à ce que l'éluant atteigne la ligne de front près soit $\frac{3}{4}$ de la plaque. A cet effet, la plaque était retirée et séchée puis révélée à l'iode. Le facteur de rétention est calculé à partir de *l'Équation 1*.

$$Rf = \frac{x_1}{x_0} \quad (1)$$

avec, x_1 et x_0 représentant respectivement, la distance parcourue par le composé et la distance parcourue par le front d'éluant. Chaque spot représente un extrait quelconque et possède son Rf propre.

2-5. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Le principe de la HPLC est basé sur la nature des molécules qui interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans une colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourant le système chromatographique, l'échantillon est injecté et ses constituants se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité due à l'éluant, le contenu est directement détecté par un détecteur [23]. L'analyse HPLC a été effectuée au laboratoire de contrôle qualité de la Pharmakina-Bukavu. L'appareil de marque Varian, présenté par la *Figure 1a* a été utilisé pour cette analyse. La poudre de *Prunus africana* a été mise en solution (Extrait aqueux) ensuite, la solution fut injectée sous une pression variant entre 3000 et 4500 π dans la colonne dont la phase stationnaire est constituée de silice greffée d'une chaîne de 18 atomes carbone. L'échantillon fut élué par le méthanol comme solvant mobile en mode isocratique [24]. Le réfractomètre fut utilisé comme détecteur en ce sens qu'il est précis et l'analyse s'est faite en phase inverse.



Figure 1 : Kit complet de HPLC (marque Varian) utilisé pour l'analyse de B-Sitostérol (Labo HPLC Pharmakina / Bukavu)

2-6. Détermination du principe actif antipaludique

Afin de déterminer le principe actif de l'activité antipaludique du *Prunus africana*, deux techniques ont été envisagées : le test chimique et le test in vitro.

2-6-1. Test chimique

Il s'agissait de soumettre les extraits du *Prunus africana* à une chromatographie comparative sur couche mince avec certains principes actifs antipaludiques bien connus. Ainsi la quinine sous deux formes, aqueuse et méthanoïque et l'ammodiaquine en solution aqueuse, ont été utilisés comme témoin. L'extrait dont le spot et le Rf correspondaient à ceux de l'un de témoin confirmait l'appartenance au même groupe des composés chimiques.

2-6-2. Test biologique in vitro

Il consistait à appliquer les drogues des extraits totaux et alcaloïdiques de la plante sur le *Plasmodium falciparum*. Le sang utilisé est celui qui a été prélevé sur un sujet qui a fréquenté l'hôpital pédiatrique de Lwiro, lequel n'avait pris aucun antipaludique dans les 72 heures précédant le prélèvement. Une goutte épaisse et un frottis colorés au Giemsa ont été effectués pour identifier et quantifier les parasites [21]. Les charges parasitaires ont été exprimées en nombre de parasites par microlitres de sang, après lecture de 100 champs microscopiques permettant de dénombrer 1000 leucocytes ou 500 parasites et sur la base de 8000 leucocytes par mm³ en moyenne pour le sujet examiné. Ces charges ont été calculées selon **l'Équation 2**.

$$\text{Hématozoaires} = \frac{\text{Nombre d'Hématozoaires comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}} \times 8000 \quad (2)$$

Un échantillon de 5 mL de sang a été prélevé sur tube vacutaire ACD (Becton Dickinson) stérile et sec, dans lequel sont introduites auparavant deux gouttes de glucose 50 % stérilisé à 120°C à l'autoclave. Ensuite deux gouttes d'extraits totaux aqueux, éthanoliques et alcaloïdiques du *Prunus africana*, sont ajoutées dans le tube respectivement par tube. Le tube contenant les deux gouttes est agité délicatement pour bien mélanger son contenu et gardé dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures. La recherche des parasites se fait sur des étalements de sang minces et colorés au Giemsa salin pendant 30 minutes. Les parasites et leucocytes sont comptés à l'aide d'un microscope optique au grossissement X 100 dans 100 champs microscopiques. Le nombre de parasites est ramené au mm³ en considérant qu'il y a en moyenne 6000 leucocytes.

3. Résultats

3-1. Composition phytochimique

3-1-1. De l'analyse qualitative

La composition phytochimique a révélé que les écorces du *Prunus africana* contiennent des Alcaloïdes, des Flavonoïdes, des Terpènes, des Stéroïdes, des Tannins, des Phénols et des Saponines en forte abondance ainsi que des Glucosides en faible abondance (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Résultats du screening phytochimique du *Prunus africana*

Principes actifs	Alcaloïdes	Flavonoïde	Terpène et stéroïdes	Tannins	Phénol	Glucoside	Saponines
Présence	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++

+ : Faible détection ; ++ : Moyenne détection ; +++ : Forte présence

3-1-2. Des Chromatogrammes CCM

3-1-2-1. Chromatogramme des extraits totaux des écorces du *Prunus africana*

Le chromatogramme CCM des extraits totaux éthanoliques, alcaloïdiques, aqueux et les échantillons témoins est présenté à la **Figure 2**. Les extraits totaux aqueux et ceux éthanoliques ont donné chacun 4 spots tandis que les alcaloïdes, la quinine dissoute dans l'eau et l'ammodiaquine ont donné chacun un seul spot. Cependant la quinine dissoute dans le méthanol a donné deux spots. Tous ces spots correspondent donc à des substances spécifiques.

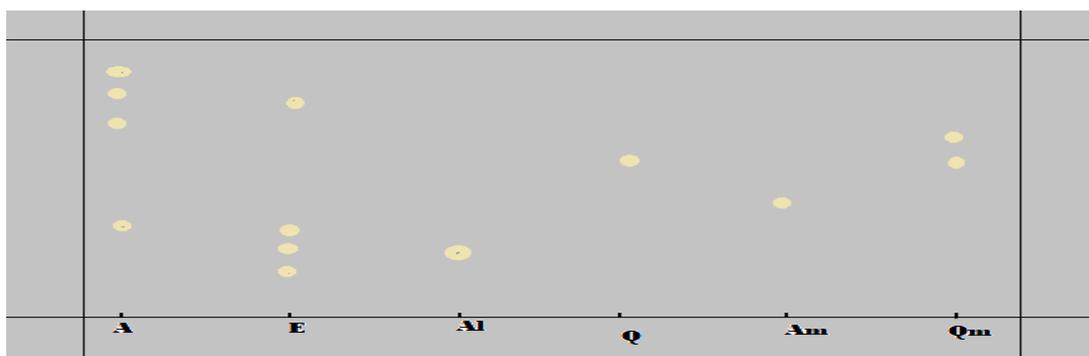


Figure 2 : chromatogramme CCM des extraits totaux aqueux (A) et éthanoliques (E) et les extraits alcaloïdiques (Al), Quinine dissoute dans l'eau (Q), Ammodiaquine (Am), Quinine dissoute dans le méthanol (Qm)

Les extraits totaux aqueux et éthanolique contiennent quatre substances différentes tandis que les autres n'ont qu'une seule gamme de substances naturelles. Le chromatogramme indique que qu'aucun extrait du *Prunus africana* n'a donné un spot correspondant à la quinine ni à l'ammodiaquine, tandis que seul l'extrait éthanolique a un spot (le deuxième) correspondant à celui des alcaloïdes. L'éthanol serait donc un solvant plus collecteur des alcaloïdes que l'eau. Aussi la quinine est plus éluee dans le méthanol que dans l'eau. Par

ailleurs, nous constatons que le facteur de rétention du quatrième spot des extraits totaux aqueux ($R_f = 0,98$) est presque égal à celui du dernier des extraits totaux éthanoliques ($R_f = 0,94$). De plus, le R_f des extraits aqueux demeure supérieur aux R_f des autres extraits ($R_{f_Q} = 0,72$; $R_{f_{Am}} = 0,53$; $R_{f_{Qm}} = 0,72$). Celui des extraits alcaloïdiques étant le plus petit ($R_f = 0,27$) ce qui montre que le coefficient de partage entre le gel silice (phase stationnaire) et l'éluant BAW, favorise la rétention des alcaloïdes par la silice au détriment de leur élution.

3-1-2-2. Chromatogramme des extraits alcaloïdiques totaux

Le même constat est fait lors de la chromatographie comparative des extraits alcaloïdiques isolés et les standards : tous les extraits ont un seul spot. Les spots de deux formes de quinine sont à la même hauteur et ce qui implique qu'elles sont éluées à la même vitesse. Le seul spot des alcaloïdes ne correspond au spot de la quinine ni à celui de l'ammodiaquine. Les résultats de ce deuxième chromatogramme (**Figure 3**) montrent que le facteur de rétention des extraits alcaloïdiques ($R_f = 0,36$) est inférieur à ceux des substances de référence ($R_{f_Q} = 0,64$; $R_{f_{Am}} = 0,48$; $R_{f_{Qm}} = 0,64$).

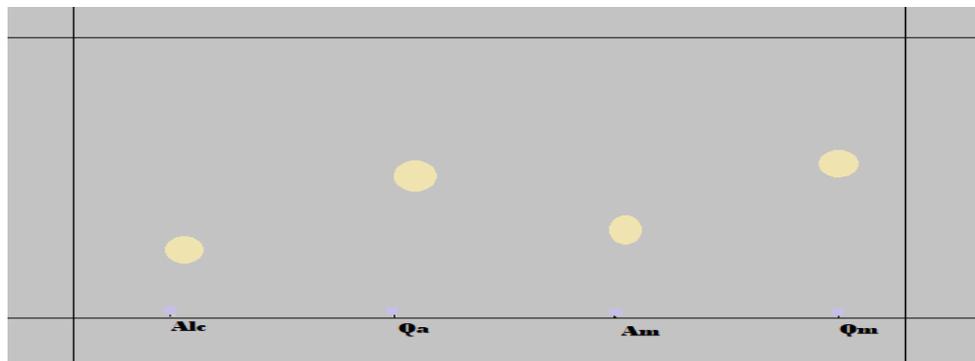


Figure 3 : Chromatogramme CCM des extraits alcaloïdiques (Alc), et les substances antipaludiques de référence : quinine aqueuse (Qa), Quinine méthanolique (Qm) et l'Ammodiaquine (Am)

3-1-3. Chromatogramme HPLC

3-1-3-1. Chromatogramme HPLC du β -Sitostérol

La chromatographie liquide à haute performance du β -sitostérol est présentée dans le **Tableau 3** et à la **Figure 4**. De ce chromatogramme, nous observons un seul pic correspondant au β -Sitostérol dont le temps de rétention est de 4,772 minutes. La hauteur du pic démontre la forte concentration du β -Sitostérol dans la solution et renvoie à sa pureté. Les autres pics sont négligeables car ils correspondent aux bruits de fond. Par ailleurs, il est observé qu'au niveau du **Tableau 3** que l'échantillon de β -Sitostérol utilisé comme standard est pur avec une concentration de 100 %.

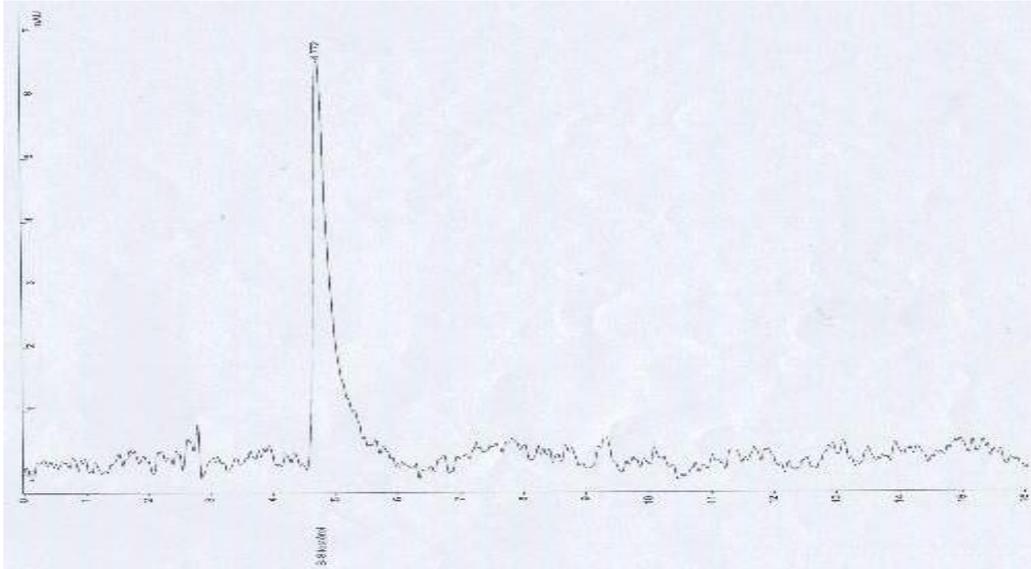


Figure 4 : Chromatographie liquide à haute performance du β -sitostérol (standard)

Tableau 3 : Résultats calculés β -Sitostérol

Numéro du pic	Nom du pic	Résultat (%)	Temps de Rétention (min)
1	β -Sitostérol	100.00	4.772

3-1-3-2. Chromatogramme de l'extrait du *Prunus africana*

La HPLC a été réalisée pour tester la présence du β -Sitostérol, principe actif luttant contre l'hypertrophie bénigne de la prostate. Sept pics ont été identifiés dont le Quatrième a un temps de rétention (4,701) proche de celui de β -Sitostérol (**Figure 5**).

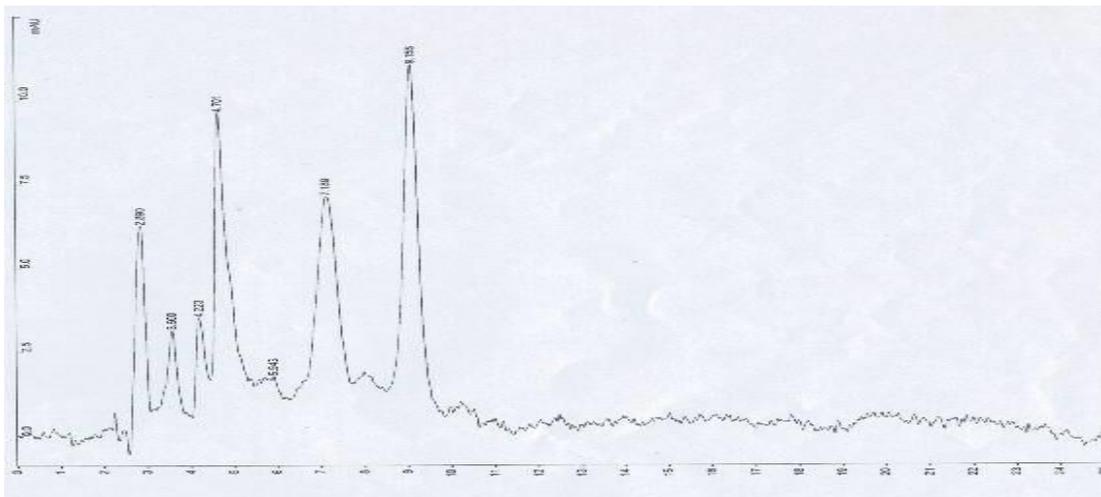


Figure 5 : Chromatogramme HPLC des extraits totaux aqueux du *Prunus africana*

Le **Tableau 4** indique les teneurs de sept substances identifiées dans le prunus *africana* dont les noms ne figurent pas dans la base de données du HPLC de la Pharmakina. Le quatrième pic qui serait le β -Sitostérol a une concentration de 16,6020 % qui est proche du tiers de celle du pic 7 (47,0992 %) mais de loin supérieure à celles des pics 1, 2 et 3.

Tableau 4 : Résultats calculés du HPLC du *Prunus africana*

Numéro du pic	1	2	3	4	5	6	7
Nom du pic				β-Sitostérol			
Résultat (%)	6.8871	4.8773	4.4445	16.6020	1.8039	18.2819	47.0992
Temps de Rétention (min)	2.890	3.600	4.223	4.701	5.943	7.189	9.158

3-2. Test biologique in vitro

Les résultats du test paludéen sont représentés dans le **Tableau 5**. Comparant les charges parasitaires après application des drogues par rapport au Témoin, il s’entrevoit que tous les extraits du *Prunus africana* ont une activité positive sur le *Plasmodium falciparum*. Cependant l’extrait isolé des alcaloïdes présente un pouvoir plus élevé (99,02 %) à la concentration de 66 mg/L. Les extraits totaux éthanoliques et aqueux ont un taux de mortalité approchée à la même concentration de 200 mg/L. Ce taux diminue progressivement dans les dilutions. Le taux des extraits éthanoliques demeurant plus élevé que celui des extraits aqueux. Aucun de ces trois types d’extrait n’a tué à 100 % la charge parasitaire et à la dilution 1000 fois, le taux de mortalité des alcaloïdes demeure de loin supérieur à 50 %, proche celui causé par les plus fortes concentrations.

Tableau 5 : Taux de mortalités de la charge parasitaire du *Plasmodium falciparum* selon la dilution de la dose des extraits

	Extrait aqueux (200 mg/L)	Extrait Ethanolique (200 mg/L)	Alcaloïdes (66 mg/L)
Témoin	0	0	0
Dilution 1	75,25	74,02	99,02
Dilution 10	64,22	72,79	98,28
Dilution 100	53,92	56,37	98,04
Dilution 1000	13,73	22,06	97,3

La dépendance entre la mortalité et la concentration est largement significative pour tous les extraits. Les extraits aqueux manifestent la corrélation la plus élevée à 0,9832 suivi des alcaloïdes à 0,9379 et la petite étant celle des extraits éthanoliques (**Figure 6**).

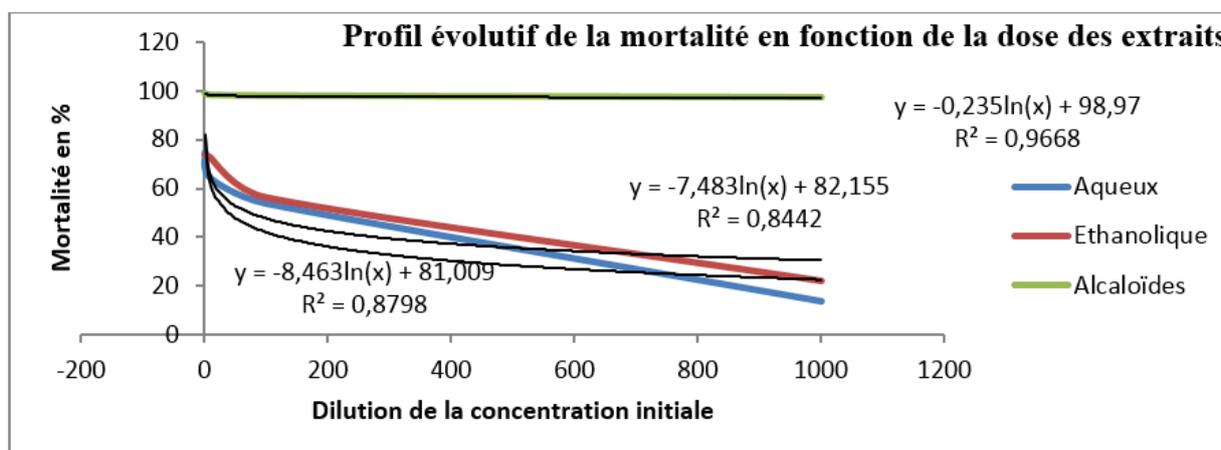


Figure 6 : Profil évolutif de la mortalité en fonction de la concentration des extraits

4. Discussion

Le screening phytochimique du *Prunus africana* cultivé au Kivu montre qu'il contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stéroïdes, des terpènes, des saponines, des phénols et des tannins, en forte abondance ainsi que des glucosides en faible abondance. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus, lors du screening phytochimique du *Prunus africana* cultivé au Kenya et celui du Cameroun [5, 7, 24]. De ce fait, le pouvoir traditionnel et les usages thérapeutiques reconnus au *Prunus africana* sont donc justifiés par son potentiel phytochimique. La présence des tannins dans cette plante justifierait donc son utilisation par les tradipraticiens contre la diarrhée et l'hémorragie car ces principes actifs sont dotés de l'habilité de précipiter les protéines et les muqueuses [25]. De même, les flavonoïdes sont connus, porteurs des composants antioxydants qui permettent ainsi la protection des humains et les animaux contre les dommages causés par les radicaux libres, lesquels sont à l'origine des certaines maladies comme le Cataracte, le Cancer, etc. [26]. Les flavonoïdes seraient donc à l'origine de son effet dans le traitement du Cancer et certaines complications dues au sang [27, 28]. Quant aux terpénoïdes, il leur est reconnu un pouvoir sur les microorganismes. L'étude menée in vivo sur les bactéries a montré que les terpénoïdes ont un effet inhibiteur de la croissance des bactéries [29]. Et en 2008, une autre étude l'a confirmé sur le *Candida albicans* [21]. L'effet vermicide reconnu au *Prunus africana* [30] serait donc dû aux terpénoïdes et glucosides. La détermination de la composition chimique du *Prunus africana* a fait l'objet d'une étude en 1998 ; parmi les substances rencontrées : des phytostéroïdes, des acides gras triterpéniques pentacycliques et bien d'autres [31]. Les résultats obtenus dans la présente étude coïncident avec ce constat. En effet, lors du screening, les stéroïdes et les terpénoïdes ont été détectés. Par ailleurs, lors de la chromatographie HPLC, 7 pics ont été identifiés, et celui correspondant au point 4 a le temps de rétention (4,701 min) proche de celui du β -sitostérol. Ce pic de l'échantillon correspond donc à celui du β -sitostérol en dépit de l'écart non significatif de 0,071 min qui serait dû à l'erreur de purification de l'échantillon et/ou du solvant. Ce résultat confirme donc la présence du β -sitostérol dans le *Prunus africana* cultivé par la Pharmakina.

Ce qui revient à dire que ce *Prunus* peut être utilisé pour traiter la BHP comme jadis confirmé pour les autres espèces [16]. De plus sa concentration étant de 16,6020 %, est donc jugée rentable et peut être exploitée. Le chromatogramme CCM des extraits alcaloïdiques et des substances antipaludiques de référence montre que l'extrait isolé des alcaloïdes a un Rf de 0,36 qui est différent de celui de la quinine sous ses deux formes (aqueuse et méthanolique) et de l'Ammodiaquine. De même, ce Rf ne correspond à aucun des Rf reconnus dans la base des données de Rf des alcaloïdes [22] pour l'éluant butanol-acétique-eau mais s'écarte de deux unités de celui obtenu dans les alcaloïdes (0,38) rencontrés dans les feuilles de *Baphia nilida* [32]. Ces Rf différents expliquent donc que les alcaloïdes rencontrés dans le *Prunus africana* n'appartiennent pas au même groupe structural que la Quinine [2]. Le test biologique in vitro mené sur le *Plasmodium falciparum* selon la dilution de la dose des extraits s'est révélé positif pour tous les extraits. Les deux extraits totaux éthanoliques et aqueux ont des taux de mortalité proches à la concentration de 200mg/L (74,02 % et 75,25 %) et à la concentration de 2mg/L (56,37 % et 53,92 %) tandis qu'une nette différence est constatée à la concentration de 20 mg/L et à la concentration de 0,2 mg/L. Le taux de mortalité dû à la dilution 1000 fois des alcaloïdes isolés (97,30 % à 0,006 mg/L) est de loin supérieur aux taux de mortalité des doses concentrées des extraits totaux. Pour les alcaloïdes, les taux de mortalité n'ont pas sensiblement varié en fonction des dilutions. Entre la dilution 1 fois et la dilution 1000 fois, la différence est de 1,72 %. Les extraits éthanoliques ont un taux de mortalité de 22,06 % à la concentration de 0,2 mg/L. Ce taux étant faible, justifie que ces extraits soient considérés comme efficaces au-delà de la dose de 2 mg/L. Il en est de même pour les extraits aqueux dont la dose minimale doit être située au-dessus de 2 mg/L. La dépendance linéaire entre la dose des alcaloïdes et le taux de mortalité donne un coefficient de corrélation proche de 1, donc fort et significatif. Cela signifie que

les alcaloïdes ont un pouvoir antipaludique plus élevé que les autres extraits totaux étudiés. De plus, cela montre que les alcaloïdes extraits du *Prunus africana* sont très efficaces contre la malaria. Ce constat corrobore mieux avec les résultats obtenus en 2007 pour les extraits glycosidiques du *Kalanchoe crenata* sur les *Plasmodiums*, lesquels ont permis de confirmer l'efficacité antimalarique du *Kalanchoe crenata* [21]. Les résultats de cette recherche viennent confirmer à nouveau la traditionnelle reconnaissance des alcaloïdes comme ayant une activité antipaludique telle la quinine et ses variantes [33]. De toutes ces propriétés, les alcaloïdes sont contributifs au pouvoir thérapeutique doté au *Prunus africana* et qui justifient en ce sens ses usages multiples pour soigner plus de 30 maladies dans la médecine traditionnelle [5, 12, 31].

5. Conclusion

Le screening phytochimique a révélé que le *Prunus africana* contient plusieurs substances naturelles à savoir, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes, les stéroïdes, les tannins, les phénols et les saponines en concentration élevée ainsi que des glucosides en concentration faible. La chromatographie CCM a confirmé la présence des alcaloïdes avec un spot identique à l'un des quatre spots rencontrés dans l'extrait éthanolique. De même, quatre spots sont identifiés dans les extraits aqueux, ce qui renvoie à l'existence de quatre substances différentes. Tous les spots et les Rf des extraits n'ont pas été identiques à la quinine ni à l'ammodiaquine. Cela peut être dû au fait qu'ils n'ont pas la même structure chimique. Aussi la chromatographie HPLC a montré la présence du β -sitostérol avec une teneur de 16,6020 %. D'autre part, le test in vitro du prunus sur le *Plasmodium falciparum* a indiqué des taux de mortalité très élevés et relativement voisins pour les diverses concentrations en alcaloïdes. Tandis que pour les extraits aqueux et éthanoliques, les taux de mortalité étaient relativement inférieurs à celui des alcaloïdes et variables. La composition phytochimique *Prunus africana* cultivé en RDC confirme que cette plante a le même potentiel que celui rencontré dans les autres pays africains. De plus la présence du β -sitostérol confirme que le *Prunus africana* peut être utilisé pour soigner la BHP. Les résultats du test antipaludique confirment que les extraits totaux aqueux, éthanoliques et les extraits alcaloïdiques du *Prunus africana* ont un effet positif fort sur le *plasmodium falciparum*, les alcaloïdes se révélant plus efficaces. Ainsi la société Pharmakina peut envisager :

- l'extraction du β -sitostérol et en produire un API contre la BHP.
- recycler le mélange épuisé de l'extraction du β -sitostérol afin d'extraire les alcaloïdes qui à leur tour peuvent conduire à la fabrication d'un autre API efficace contre la malaria différent de la quinine [34].

Références

- [1] - ANOFEL, *Paludisme*, Université Médicale Virtuelle Francophone, Paris (2014) 17, 21 - 89
- [2] - N. W. LILES, E. E. PAGE, A. L. LILES, S. K. VESELY, G. E. RASKOB and J. N. GEORGES, Systematic Review, *Am JHematol*, Vol. 91, (2016) 461 - 466
- [3] - www.pharmakina.com/about-pharmakina/quinine-manufacturers/company-background/, (Avril 2020)
- [4] - www.pharmakina.com/quality-control/, (Décembre 2019)
- [5] - K. M. STEWART, *Economic Botany*, Vol. 157, (2003) 559 - 569
- [6] - B. N. EWUSI, C. A. ASANGA, S. EBEN EBAI, J. B. N. NKONGO, An evaluation of the quantity and distribution of *Pygeum africanum* on the slopes of Mount Cameroon, Report for *Plantecam-Medicam*, Douala, Cameroon, (1992)

- [7] - P. TCHOUTO, Prunus population on Mount Cameroon. In Glyn D (eds). A strategy for the Conservation of *Prunus africana* on Mount Cameroon., Technical Papers and Workshop Proceedings, 21st and 22nd February, 1996, Limbé Cameroon. Mount Cameroon Project, *Limbe Botanic Garden*, (1996) 12 - 18
- [8] - B. N. EWUSI, C. T. TAKO, J. NYAMBI and J. ACWORTH, Bark extraction: the current situation of the sustainable cropping of *Prunus Africana* on Mount Cameroon. In : A strategy for the conservation of *Prunus Africana* on Mount Cameroon. Technical papers and workshop proceedings (ed Davies G), Limbe, Cameroon, 21-22 February 1996, *Limbe Botanic Garden*, (1997) 39 - 54
- [9] - B. PAGE, The political ecology of *Prunus Africana* in Cameroon, *Area*, 35 (2003) 357 - 370
- [10] - T. C. H. SUNDERLAND and C. T. TAKO, The exploitation of *Prunus Africana* on the island of Bioko, Equatorial Guinea, A report for the People and Plants Initiative, WWF-Germany and the IUCN/SSC, *Medicinal Plant Specialist Group*, (1999)
- [11] - I. K. DAWSON and W. POWELL, *Molecular Ecology*, Vol. 8, (1999) 151 - 156
- [12] - A. B. CUNNINGHAM, F. T. MBENKUM, Sustainability of Harvesting *Prunus africana* Bark in Cameroon, *A Medicinal Plant in International Trade*. People and Plants working paper 2. UNESCO, Paris, (1993)
- [13] - B. B. MUGULA, B. J. De VRIES, S. W BINJI, *International Journal Biodivers Conservation*, Vol. 2, (2010) 180 - 185
- [14] - M. CUNNINGHAM, A. B. CUNNINGHAM, U. SCHIPPMANN, Trade in *Prunus Africana* and the implementation of CITES, *German Federal Agency for Nature Conservation*, Bonn, Germany, (1997)
- [15] - J. L. BETTI, Non-Detriment Findings Report on *Prunus africana* (Rosaceae) in Cameroon. Report prepared for the International Expert Workshop on Non-Detriment Findings, Mexico, November 17th-22th, (2008) 52
- [16] - A. ISHANI, R. MACDONALD, D. NELSON, I. RUTKS and T. J. WILT, *American Journal of Medicine*, 109 (8) (2000) 654 - 664
- [17] - J. BRUNETON, *Pharmacognosie-phytochimie, plantes médicinales*, 4^e éd. Revue et augmentée, Tec & doc, Editions médicales internationales, Paris, (2009) 1288
- [18] - ICCN, Potentiel sur pied de *Prunus africana* (rosaceae) dans la zone de Walikake, province du République Démocratique du Congo, Rapport, (2013)
- [19] - K. KHENAFU, Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) de la racine de *Carlina acaulis* de la région de Tlemcen, Master en Biologie, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, République Algérienne, (2017)
- [20] - L. RUIZ-MESIA, W. RUIZ-MESIA, M. REINA, R. MARTINEZ-DIAZ, C. De INÉS, A. GUADANO, A. GONZALEZ-COLOMA, *J Agric Food clem*. Vol. 53, (6) (2005) 1921 - 1924
- [21] - M. BAGALWA, *Cahier du CERUKI, Nouvelle série*, Bukavu, (35) (2007) 98 - 103
- [22] - R. KURT, *Chromatographie sur couches minces*, 2^e édition revue et augmentée, traduit de l'allemand par NGUYEN-DANG-TAM, Ed. Gauthier- Villars, Paris, (1971)
- [23] - B. S. LATIFA, Etude de la séparation des fluoroquinolones par hplc: application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma ; *Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires ; Université Tunis El Manar*, (2013)
- [24] - C. N. MUTUKU, H. N. MUENI and F. RAMESH, *Journal of Natural Sciences Research*, Vol. 4, (16) (2014) 85
- [25] - J. O. KOKWARO, *Medicinal plants of east Africa*, University Press, Nairobi, (2009) 12 - 26
- [26] - D. K. SHARMA, *Journal of scientific and industrial research*, 65 (2006) 477 - 484
- [27] - S. C. YANKAM, Analyse de l'impact de la gestion actuelle de *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman au Mont Cameroun (Région du Sud-Ouest Cameroun), DESS, Université de Kinshasa, RDC, (2013)
- [28] - A. AWONO, M. TCHINDJANG et P. LEVANG, *Revue Scientifique et Technique*, Cameroun, Vol. 6, (2015) 46 - 59
- [29] - R. E. ANDREWS, L. W. PARKS, K. D. SPENCE, *App. Environ. Microbiol.*, Vol. 40, (1980) 301 - 304

- [30] - A. AWONO et D. MANIRAKIZA, Etude de base *Prunus Africana* dans le nord- ouest et le Sud- ouest Cameroun, CIFOR, Cameroun, Université de Kinshasa, (2015)
- [31] - J. BREZA, *Curr Med Res Opin*, Vol. 14, (1998) 127 - 139
- [32] - C. R. KABRAN, C. AMBEU N'TA B. J. MAMYRBEKOVA et B. Y. AKHANOVNA, *European Journal of Scientific Research*, (2011) 592 - 603
- [33] - D. KAROU, A. SAVADOG, A. CANINI, S. YAMEOGO, C. MONTESANO, J. SIMPORE, V. COLIZZI, and A. S. TRAORE, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, (2) (2006) 195 - 200
- [34] - P. GAYRAL, *Quinine, antipaludiques, résistance des souches de Plasmodium*, Revue d'Histoire de la Pharmacie, Université Paris-Sud, Paris, (1989) 38