

┌

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION DE TABERNANTHE IBOGA SUR LES MECANISMES DE DEFENSE IMMUNITAIRE

Action sur les macrophages sanguins

C. MEFANE*, J.P. AFFANE-NGUEMA**, H. PAMBOU-TCHIVOUNDA**

RESUME

La recherche de l'activité d'un extrait à 10 % de racines sèches de *T. Iboga* a été faite sur les macrophages de différents sujets. On note une baisse importante de l'activité phagocytaire chez tous les sujets, baisse d'autant plus importante que l'extrait est concentré. Cette relation dose-réponse a été étudiée avec une souche de *Torulopsis glabrata*. Les modifications portent tant au niveau des particules ingérées qu'à celui du pouvoir fongicide du phagocyte.

Mots-clés : macrophages, sida, phagocytose, tabernanthe, iboga.

Malades n°1 à 5 = contrôle syphilis : TPHA négatif
Malades n°6 à 10 = TPHA positif
Malades n° 11 et 12 = rubéole positive
Malade n°13 = Sida
Malade n°14 = Séropositif HIV
Malade n°15 = ARC
Malades n°18, 19, 20 = Témoins
Malades n°16, 17, 21 = Hbs. Ag positif

Séparation des lymphocytes

Elle se fait à partir de 10 à 15 ml de sang recueilli sur héparine. Après centrifugation on enlève le plasma et on dilue le culot de centrifugation dans la solution de Hanks (HBSS) préalablement ramené à 22°C et contenant 20 uI d'héparine par millilitre.

La dilution se fait à raison d'un volume de sang pour 2 à 3 volumes de HBSS hépariné. Le sang dilué est déposé à la surface du Ficoll-Paque (Pharmacia) dans un tube à centrifuger conique à raison de 15 ml de sang dilué pour 4 ml de Ficoll. La centrifugation se fait à 2200 tours/minute pendant 30 minutes en centrifugeuse réfrigérée à 20°.

On recueille la couche de cellules mononuclées. Celle-ci est diluée dans trois volume d'HBSS à 5 % de sérum foetal de veau inactivé (FCS). Le culot est lavé trois fois avec du HBSS à 5 % FCS inactivé.

Après le dernier lavage, le culot est remis en suspension dans 1 ml de liquide de culture (M.C.) qui est du RPMI 1640 contenant de la L. Glutamine à 0,1 mg/ml, du sérum de veau foetal (10 %), du sérum humain AB (Rh+) (10 %), de la gentamycine à la concentration finale de 50 micro

INTRODUCTION

Tabernanthe Iboga est une apocynacée psychotrope utilisée en médecine traditionnelle et dans des cérémonies initiatiques par certains groupes ethniques du Gabon (4, 5, 13). Cette plante est classée comme stupéfiant aux USA, mais ne figure jusqu'alors sur aucun tableau dans la législation gabonaise. Nous avons été amenés à étudier les effets de *T. Iboga* sur les mécanismes immunitaires à la suite du décès de deux de nos malades atteints de SIDA qui en désespoir de cause se sont fait soigner chez des tradipraticiens : ils leur ont fait absorber de la poudre d'Iboga, sans succès, car ils sont décédés quelques temps après. Notre travail avait pour principale problématique de savoir quels pouvaient être les effets de l'Iboga sur les défenses immunitaires. Nous reportons ici les premiers résultats.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée sur des malades de la consultation MST de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de Libreville :

* Département de Microbiologie - Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. B.P. : 4009 - Libreville.

** Institut de Pharmacopée et de Médecine Traditionnelles. B.P. 842 - Libreville.

grammes/ml et de la pénicilline G à 100 UI/ml. La suspension de lymphocytes est ajusté à 2.10^6 cellules/ml après numération à la cellule de Malassez (18, 19).

Cultures cellulaires et obtention de macrophages

Les monocytes sont séparés à partir de la suspension lymphocytaire précédente par culture sur lamelle en boîte de Pétri sous CO_2 à 95 % d'air - après 120 à 180 minutes d'incubation les cellules adhérantes au verre ou au plastique sont essentiellement des macrophages.

Pour les différentes expériences nous avons mis les lymphocytes à incuber pendant 3 heures à raison de 0,25 ml de suspension lymphocytaire par lamelle. Le liquide de culture contenant les cellules non-adhérantes sont lavées délicatement à trois reprises dans du HBSS à 5 % de sérum de veau foetal.

Phagocytose

Pour les expériences de phagocytose, nous avons utilisé une souche de *Torulopsis glabrata* que nous a donnée le Professeur M.Y. KOMBILA (Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé). Nous utilisons une souche de 24 heures cultivée sur le milieu de Saboureaud chloramphénicol.

Les levures sont mises en suspension dans du liquide de Hanks. Après centrifugation à 2400 tours/minute ; on procède à 3 lavages le culot est remis en suspension dans du liquide de culture (M.C.) de façon à avoir un rapport macrophage/levure d'environ 1 : 3. On recouvre alors les lamelles contenant les macrophages avec 0,25 ml de liquide de culture contenant environ 5.10^6 levures/ml. Les incubations se font à différents temps suivant le protocole choisi.

Extrait de T. Iboga

C'est un extrait aqueux de racines sèches d'Iboga à 10 % (P/V). Les réactions de Meyer et de Dragendorff mettant en évidence les alcaloïdes sont positives. Cet extrait ETI/W est utilisé à différentes concentrations mélangé à du liquide de culture (1/2, 1/5, 1/10, 1./100). Nous avons ainsi évalué l'action des alcaloïdes totaux de T. Iboga à différentes concentrations et à différents temps de contact. Après ce

temps, les lamelles sont lavées dans du HBS montées sur lame, fixées au méthanol et colorés au May Grönwald Giemsa. La lecture se fait sur au moins 200 macrophages, ceci pour la phagocytose.

Détermination de l'activité fongicide

Elle est faite en rajoutant sur les lamelles lavées une solution de bleu de méthylène de 0,025 % dans du liquide de Hanks - Après 30 minutes de contact les lamelles sont lavées, montées sur lames et recouvertes d'une seconde lamelle. La lecture se fait au microscope en comptant au moins 200 phagocytes. Les levures mortes prennent le bleu alors que les levures vivantes restent incolores (7, 17).

Les expériences de phagocytose sont faites en double et nous avons pris la moyenne des résultats. Nous avons par ailleurs utilisé les paramètres suivants :

	Nombre de levures phagocytées (mortes et vivantes)
Index phagocytaire	————— 100 macrophages
	Nombre de macrophages contenant 2 ou + de 2 levures
Activité phagocytaire	————— 100 macrophages
	Nombre de levures mortes
Activité fongicide	————— Capacité phagocytaire

RESULTATS ET COMMENTAIRES

Il ressort de cette première étude que l'extrait aqueux de T. Iboga aurait une action négative sur la phagocytose du moins in vitro. Le pouvoir phagocytaire des macrophages est considérablement diminué en présence des alcaloïdes de T. Iboga qu'il s'agisse de l'index phagocytaire, de

l'activité phagocytaire ou de l'activité fongicide vis-à-vis de *T. Glabatra* (Tableau I, II, fig. 1, 2, 3, 4). Nous avons pu établir une relation dose-activité, l'extrait à 10 % dilué au 1/2 faisant passer l'index phagocytaire d'un de nos témoins de 267 à 7 avec une baisse corrélative de l'activité phagocytaire et fongicide, alors que ces paramètres remontent pour le même sujet respectivement à 159,36 et 22,3 avec l'extrait au 1/100 Tableau II Fig. 1, 3. Quant au temps de contact pour une dilution donnée - dilution au 1/5 - il entraîne aussi une variation significative de l'activité phagocytaire (Tableau III, fig. 2 et 4).

Il est à signaler que l'activité phagocytaire des macrophages du malade atteint de SIDA est effectivement très abaissée et dans le cas précis de cette étude, notre malade avait un index phagocytaire de 19, une activité phagocytaire de valeur 4 et une activité fongicide estimée à 2,3.

Mais malheureusement la quantité de matériel - lymphocytes - ne nous a pas permis de tester l'activité de *T. Iboga* sur les macrophages de ce malade. Il a été démontré par certains auteurs travaillant sur la lèpre lépromateuse expérimentale de la souris que la prise en charge de l'antigène par les polynucléaires ou les macrophages était un phénomène non spécifique, indépendant de la capacité immunitaire de l'animal (12).

Cependant les valeurs observées chez ce malade atteint de SIDA peuvent nous faire avancer l'hypothèse de modifications notables au niveau des protéines d'adhésion du macrophage ou d'autres facteurs.

Tout comme il s'avère nécessaire d'établir les mécanismes d'action des alcaloïdes de *T. Iboga* sur le système phagocytaire, car il existe également une baisse de l'activité phagocytaire des polynucléaires (non publié).

Les alcaloïdes de *T. Iboga* agiraient-ils sur les antigènes spécifiques des leucocytes, LFA-1, CR3 et p. 195-95, molécules impliquées dans diverses fonctions d'adhésion, ces trois antigènes étant présents sur les monocytes et les macrophages (1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 14, 15).

Nous avons défini l'activité bactéricide ou fongicide comme étant le rapport entre le nombre de levures mortes et la capacité phagocytaire. Nous reconnaissons que le protocole utilisé dans ce travail, s'il est d'exécution facile, n'a

cependant pas la précision du marquage par des radio-isotopes beaucoup plus compétitifs (19). Il y a lieu cependant de retenir la validité de cette méthode (7).

La question se pose alors de savoir si l'activité bactéricide serait effectivement liée à une modification des mécanismes intimes du phagocyte - métabolisme respiratoire, production d'ion superoxyde et autres (9, 11, 16). Dans tous les cas, cette baisse d'activité a été observée tant chez nos témoins que chez nos malades quelle que soit la valeur des paramètres du départ (Tableau I).

CONCLUSION

Les résultats préliminaires que nous reportons ici sur l'action in vitro de l'extrait aqueux de *T. Iboga* sur la fonction phagocytaire des macrophages devraient nous amener à beaucoup plus de prudence et de circonspection dans son utilisation chez les malades immunodéprimés en médecine traditionnelle, car la thérapeutique par l'*Iboga* relève beaucoup plus du domaine de l'irrationnel (13).

Dans le cas du Syndrome d'Immunodéficience Acquise, nous savons que les affections opportunistes constituent un facteur aggravant : l'absorption de *T. Iboga* chez ces malades pourrait alors précipiter l'évolution fatale de la maladie.

T. Iboga est une plante utilisée dans les cérémonies initiatiques au Gabon (13). Il est possible que le contexte dans lequel se fait sa "manipulation" par le tradipraticien et le cocktail dans lequel il se trouverait associé pourrait inhiber les effets constatés in vitro sur la phagocytose.

Toutefois, des recherches doivent être poursuivies pour mieux cerner l'action des alcaloïdes de *T. Iboga* sur les mécanismes immunitaires et notamment sur la libération des médiateurs chimiques. Il restera aussi à voir si ces mêmes effets sont observés chez l'animal et s'ils sont ou non transitoires.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame le Professeur M. KOMBILA du Département de Parasitologie de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé pour avoir mis à notre disposition sa souche de *Torulopsis glabrata* et Monsieur D. EDOU pour son assistance technique.

TABLEAU 1
Action de T-Iboga sur le pouvoir phagocytaire de macrophages

Extrait de T. Iboga ETI/W dilué 1/5 dans RPMI 1640	Sujets examinés																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 (a)	14 (b)	15 (c)	16	17	18	19	20	21
Incubation 30 minutes																					
Index phagocytaire %	151,1	95,3	83,2	121,2	79,1	75,4	43,1	35,2	103,7	74,1	68,4	74,1	-	-	-	114	159	120,1	76	-	-
Activité phagocytaire %	42,1	25,4	23,6	33,1	17,3	18,2	14,5	9,1	32,2	15,5	17,3	21	-	-	-	30,1	25,2	32,4	18,2	-	-
Activité fongicide %	25,2	13,5	13,8	23,3	10,84	8,35	5,81	22,4	9,6	15,7	-	-	-	-	-	22,6	19,1	18,9	13,1	-	-
Incubation 60 minutes																					
Index phagocytaire %	115	76,2	70,1	91	60,1	45,2	33	23	86,2	59,6	51	63,1	-	-	-	89	97,2	95,6	62,1	173	-
Activité phagocytaire %	35	20,1	14,5	25	13,3	14,7	8,1	71,2	28,3	12,4	13,1	15,4	-	-	-	25,2	23	22,1	14,2	42,1	-
Activité fongicide %	21,4	12,7	8,12	17,5	7,5	9,5	4,9	4,2	18,2	7,8	9,7	10,5	-	-	-	16,7	15,8	13,4	9,8	28,8	-
Incubation 120 minutes																					
Index phagocytaire %	75,1	51,3	48	65,1	43,6	34,2	22,1	15	54,6	41,5	38,2	47,1	-	-	-	70,1	85,3	65,2	41,3	-	-
Activité phagocytaire %	18	13,1	11,2	16,6	10	7	4	3,3	14,1	9,2	10,1	14,4	-	-	-	18	19,2	15,1	12,1	-	-
Activité fongicide %	10,8	7,54	6,4	9,9	5,7	4,1	2,7	2,2	8,9	5,7	6,9	10,1	-	-	-	10,7	11,9	9,75	8,4	-	-
Témoin sans ETI/W																					
Index phagocytaire %	207,2	147,2	132,2	190	125	103,2	68,3	52,5	168,1	123	113,4	139	19	90,2	47,1	190,2	195,2	267	118,2	277	189
Activité phagocytaire %	72,1	40,3	31,6	65,1	35,1	30	18,2	13,2	53,2	38	31,2	35	4	29	13,3	61,4	58,6	66,6	34,1	68	52
Activité fongicide %	41,6	28,3	19,7	40,5	23,5	20,4	10,9	6,5	31,7	24,7	18,1	21,2	2,3	17,5	9,1	37,8	35,8	31,9	23,8	39,8	36

(a) - Malade SIDA

(b) - Séronégatif HIV

(c) - Malade ARC

TABLEAU II - Influence de la dilution sur le pouvoir phagocytaire des macrophages

	Index phagocytaire (I)	Activité phagocytaire (A.P.)	Activité phagocytaire (A.B.)
A	267	66	31,9
B	7	4	3,1
C	44	14	11,1
D	69	21	13,2
E	159	36	22,3
F	45	16	

A = Témoin sans ETI/W

B = ETI/W : DILUTION 1/2

C = ETI/W : DILUTION 1/10

D = ETI/W : DILUTION 1/20

E = ETI/W : DILUTION 1/100

F = ETI/W : AU 1/2 MELANGE A TORULOPSIS GLABRATA

TABLEAU III

Influence de temps d'exposition sur la phagocytose

	Index phagocytaire (I)	Activité phagocytaire (A.P.)	Activité bactéricide (A.B.)
I	76	18	12,5
II	62	14	10,3
III	42	12	8,3
IV	118	34	23,6

Temps d'exposition à l'action de l'ETI/W

I = 30 minutes

II = 60 minutes

III = 120 minutes

IV = Témoin sans ETI/W

FIGURE 1
Relation dose-activité - M 18

FIGURE 2
Influence du temps de contact - M 19

FIGURE 3
Relation dose-activité - M 18

FIGURE 4
Influence du temps de contact - M 19

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ARNAOUT M.A., TODD R.F., DANA N., MELAMED J., SCHLOSSMAN S.F. and COLTEN HR.
Inhibition of phagocytosis of complement C3 or immunoglobuline G-Coated particules and of C3 binding by monoclonal antibodies to a monocyte - granulocyte membrane glycoprotein (MOI) - J - clin - Invest, 1983, 72, 171-179.
- 2 - ARNAOUT M.A., SPITS H., TERHORST C., PITT J., TODD R.F. (1984)
Deficiency of leucocyte surface glycoprotein (LFA-1) in two patients with MOI deficiency - J - clin - Invest, 74, 1291-1306.
- 3 - BROWN E.J., GOODWIN J.L.
Fibronectin receptors of phagocytes characterisation of the Arg - Gly - Asp binding protein for human monocytes and polymorphonuclear leukocytes - J - Exp - Med, 1989, 167 - 777 - 793.
- 4 - DENIKER P.
Psychopharmacologie, Presses universitaires de France, 1976, (1216).
- 5 - EBERT M., MARCY R., QUEROLONNE M.A., COTELLE M., KOCH M.
Non amphetamine central stimulating alkaloids from *Iboga* vasobasic series. *Planta Medica* ISSN 0032 0943, CODESN PLMEAA ; DEU ; DA. 1988, (3), pp. 191-192.
- 6 - FRYER D.R., MORGANROTH M.L., ROGERS C.E., ARNAOUT M.A., TODD R.F.
Modulation of surface CD11/CD18 glycoproteins Mol, LFA-1, p 150, 95 by human mononuclear phagocytes - Clin - Immunol - Immunopath, 1988, 46, 272-283.
- 7 - FUNG-YEE-SHUN, TAM. CHUNG-WANG SIU-YIN, YAN PAYEE CHEUNG MING-TAK, SIN MAN-SHIN and Jaky WOO
Enhancement of specific and non specific Immune functions in ginseng sapinim-treated Mice. In *Advances in Biosciences 1987 Vol 68*, Pergamon Press (Immunomodulators and non specific host defense mechanism against microbial Infections) pp 126-133.
- 8 - GRAHAM I.L., GRESHAN H.D., BROWN E.J.
An immobile : subset of plasma membrane CD11b/CD18 (mac. 1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple factors. *J. Immunology* 1989, 142, 2352-2358.
- 9 - WILSON
Effect of bactericidal endotoxins on neutrophil functions. *Rev. Infectious Dis.*, 1985, 7, 404-418.
- 10 - KUYPERS T.W., ROOS D.
Leucocytes membrane adhesion proteins LFA-1 CR3 and P 150, 95 : A review of functional and regulatory aspects - *Res. Immunol*, 1989, 140, 461-486.
- 11 - RONEHIRO Nakata, TOSCHIO TOMITA, SHIRO KANEGASAKI
Inhibitory effect of antibiotic cerulenin on the respiratory burst in phagocytes - I - Effects of cerulenin on active oxygen - generation and lipid metabolism in phagocytes - *The Journal of Antibiotics* 1989, XLII, (7), 1171-1177.
- 12 - NATAN MOR
Intracellular location of *Mycobacterium leprae* in Macrophages of Normal and Immune - Deficient Mice and Effect of Rifampin. *Infection and Immunity* 1983, 42, (2), 802-811.
- 13 - OTTO G., SILLANS R.
Recherche sur le Mysticisme MITSOGO, peuples montagnards du Gabon Central. Dans *Réincarnation et vie mystique en Afrique Noire*. P.U.F. 1965.
- 14 - POMMIER C.G., SHEA O., CHUSED J., YANCEY T., FRANK K., TAKAHASHI T., BROWN E.J.
Studies on the fibronectin receptors of human peripheral blood leucocytes - *J. Exp - Med*, 1984, 159, 137-45.
- 15 - RODRIGUEZ-ORTEGA M., OFEK I, SHARON N.
Membrane glycoprotein of human polymorphonuclear leucocytes that act as receptors of mannose - specific. *Escherichia coli*. *Infect. Immun*, 1987, 55, 968-97.
- 16 - SHIGETOSHI MIBUTANI, HIDEHARU ODAI, TORU MASUDA, MZSATOMI IJIMA, MICHIO OSONO, MASA HAMADA, HIROSHI NAGANAWA
Biological activities of IC 201 (35,8 E) - 1,3 dihydroxy 8 - decen - 5 - one, a low molecular weight immunomodulator produced by *STREPTOMYCES*. *The Journal of Antibiotics* 1989, XLII, (6), pp 952-59.
- 17 - SMITH D.L., ROMMEL F.J.
A rapid micromethod for the simultaneous determination of phagocytic and microbicidal activity of human peripheral blood leukocyte in vitro. *J. Immunology Methods* 1977, 17, 241-47.
- 18 - UNSGAARD G.
Cytostatic and phagocytic capacity of lymphokine activated human monocytes. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect C*, 1979, 87, 325-35.
- 19 - VIKEN K.E., O DEGARD E.
1974, Phagocytosis of heat killed radiolabelled *Candida albicans* by human blood monocytes cultured in vitro. *Acta path. Microbiol Scand. Section B* 1984, 82, pp. 235-244.