

BURKINA FASO

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU



Thèse
N°55
1998
Année Universitaire 1997-1998

Thèse N°55

**ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE
DE L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE *Gardenia
sokotensis HUTCH (RUBIACEAE)* CHEZ LA SOURIS NMRI
INFESTEE PAR *Plasmodium berghei***

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 1998
pour l'obtention du DOCTORAT en PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

Par

OUEDRAOGO Adissa

Née le 19 Avril 1970 à Ouagadougou (Burkina Faso)

JURY

Président:

Professeur M. HANOCQ

(U.L.B, Bruxelles)

Membres :

Professeur. T.R.GUIGUEMDE

(F.S.S, Ouagadougou)

Professeur I .P GUISSOU

(F.S.S, Ouagadougou)

Docteur J.B. NIKIEMA

(F.S.S, Ouagadougou)

DIRECTEUR DE THESE

Professeur T.R. GUIGUEMDE

Professeur I .P GUISSOU

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Faculté des Sciences de la Santé
(F.S.S.)

LISTE DU PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen	Pr. Robert B. SOUDRE
Vice-Doyen Chargé des Affaires Académiques et Directeur de la Section Pharmacie (VDA)	Pr. I. Pierre GUISSOU
Vice-Doyen à la Recherche et à la vulgarisation (VDR)	Pr. Ag. Jean KABORE
Directeur des Stages de la Section Médecine	Pr. Ag. Y. Joseph DRABO
Directeur des Stages de la Section de Pharmacie	Dr OUEDRAOGO / Rasmata TRAORE
Coordonnateur C.E.S. de Chirurgie	Pr. Amadou SANOU
Secrétaire Principal	Mr Gérard ILBOUDO
Chef de Service Administratif et Financier (CSAF)	Mr Mohamed Ousmane ZONGO
Conservateur de la Bibliothèque	Mr Salif YADA
Chef de la Scolarité	Mme Kadi ZERBO
Secrétaire du Doyen	Mme Mariam DICKO
Secrétaire du VDA	Mme KABRE Hakiéta
Secrétaire du VDR	Mme BONKIAN Edwige
Audiovisuel	Mr Alain Pascal PITROIPA
Reprographie	Mr Philippe BOUDA
Service Courrier	Mr Ousmane SAWADOGO

Liste des Enseignants de la F.S.S.

Enseignants permanents

Professeurs titulaires

Rambré Moumouni OUIHINGA	Anatomie organogénèse et chirurgie
Hilaire TIENDREBEOGO	Sémiologie et Pathologies médicales
Tinga Robert GUIGUEMDE	Parasitologie
Bobilwindé Robert SOUDRE	Anatomie-Pathologique
Amadou SANOU	Chirurgie Générale et Digestive
Innocent Pierre GUISSOU	Pharmacologie & Toxicologie

Professeurs associés

Ahmed BOU-SALAH	Neuro-chirurgie
Blaise KOUDOGBO	Toxicologie

Maîtres de Conférences

Julien YILBOUDO	Orthopédie -Traumatologie
Bibiane KONE	Gynécologie - Obstétrique
Alphonse SAWADOGO	Pédiatrie
Kongoré Raphaël OUEDRAOGO	Chirurgie -Traumatologie
François René TALL	Pédiatrie
Jean KABORE	Neurologie
Joseph Y. DRABO	Médecine Interne/Endocrinologie
Blaise SONDO	Santé Publique

Maîtres-Assistants associés

Rachid BOUAKAZ

Assistants associés

Caroline BRIQUET

Valérie MURAILLE

Maîtres-Assistants

Lady Kadidiatou TRAORE

Mamadou SAWADOGO

Jean LANKOANDE

Issa SANOU

Ludovic KAM

Adama LENGANI

Omar TRAORE N°1

Si Simon TRAORE

Adama TRAORE

Abdoulaye TRAORE

Kampadilemba OUOBA

Piga Daniel ILBOUDO

Albert WANDAOGO

Daman SANO

Arouna OUEDRAOGO

Joachim SANOU

Patrice ZABSONRE

Jean Gabriel OUANGO

Georges KI-ZERBO

Théophile TAPSOBA

Maladies infectieuses

Chimie -Analytique, Pharmacologie
et Toxicologie

Galénique et Chimie-Analytique

Parasitologie

Biochimie

Gynécologie-Obstétrique

Pédiatrie

Pédiatrie

Néphrologie

Chirurgie

Chirurgie

Dermatologie Vénérologie

Santé Publique

Oto Rhino Laryngologie

Gastro-entérologie

Chirurgie Générale

Chirurgie Générale

Psychiatrie

Anesthésie-Réanimation

Cardiologie

Psychiatrie

Maladies Infectieuses

Biophysique

Assistants Chefs de cliniques

Tanguet OUATTARA

Chirurgie

Sophar HIEN

Chirurgie - Urologie

Timothée KAMBOU

Chirurgie

Philippe ZOURE

Gynécologie-Obstétrique

T.Christian SANOU (in memoriam)

Oto Rhino Laryngologie

Madi KABRE

Oto Rhino Laryngologie

Doro SERME (in memoriam)

Cardiologie

Hamadé OUEDRAOGO

Anesthésie-Réanimation
physiologie

Alexis ROUAMBA

Anesthésie-Réanimation
physiologie

M. Théophile COMPAORE

Chirurgie

Rabiou CISSE

Radiologie

Y. Abel BAMOUNI

Radiologie

Blami DAO

Gynécologie Obstétrique

DAO / Maïmouna OUATTARA

ORL

Alain BOUGOUMA

Gastro-Entérologie

Alain ZOUBGA

Pneumologie

André K. SAMANDOULOUGOU

Cardiologie

KYELEM / Nicole Marie ZABRE

Maladies Infectieuses

Rigobert THIOMBIANO

Maladies Infectieuses

Raphaël DAKOURE

Anatomie-Chirurgie

Assistants

Michel AKOTIONGA

Gynécologie-Obstétrique

Robert O. ZOUNGRANA

Physiologie

Seydou KONE

Neurologie

Boubacar TOURE

Gynéco-Obstétrique

Bobliwendé SAKANDE

Anatomie-Pathologique

Raphaël SANOU (in memoriam)

Pneumo-phtisiologie

Oumar TRAORE N°2 (in memoriam)

Radiologie

Pingwendé BONKOUNGOU

Pédiatrie

Arsène M. D. DABOUE

Ophtalmologie

Nonfounikoun Dieudonné MEDA

Ophtalmologie

Athanase MILLOGO

Neurologie

Boubacar NACRO

Pédiatrie

Vincent OUEDRAOGO

Médecine du Travail

TRAORE / BELEM Antoinette

Pédiatrie

DA S. Christophe

Chirurgie

KARFO Kapouné

Psychiatrie

NIANKARA Ali

Cardiologie

OUEDRAOGO Nazinigouba

Réanimation

SANON Aurélien Jean

Chirurgie

SORGHO / LOUGUE Claudine

Radiologie

YE / OUATTARA Diarra

Pédiatrie

ZANGO Bernabé

Chirurgie

Assistants Biologistes des Hôpitaux

Lassina SANGARE

Bactério-Virologie

Idrissa SANOU

Bactério-Virologie

Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE

Bactério-Virologie

Harouna SANON

Hématologie/Immunologie

ENSEIGNANTS NON PERMANENTS

Faculté des Sciences et Techniques (FAST)

Professeurs Titulaires

Alfred S. TRAORE

Immunologie

Akry COULIBALY

Mathématiques

Sita GUINKO

Botanique-Biologie Végétale

Guy V. OUEDRAOGO

Chimie Minérale

Laya SAWADOGO

Physiologie-Biologie Cellulaire

Laou Bernard KAM (in memorian)

Chimie

Maîtres de Conférences

Boukary LEGMA

Chimie-Physique Générale

François ZOUGMORE	Physique
Patoin Albert OUEDRAOGO	Zoologie
Adama SABA	Chimie Organique
Philippe SANKARA	Cryptogamie

Maîtres-Assistants

W. GUENDA	Zoologie
Léonide TRAORE	Biologie Cellulaire
Marcel BONKIAN	Mathématiques et Statistiques
Longin SOME	Mathématiques et Statistiques
Aboubakary SEYNOU	Statistiques
Makido B. OUEDRAOGO	Génétique
Jean KOULIDIATY	Physique

Assistants

Apolinaire BAYALA (in memoriam)	Physiologie
Jeanne MILLOGO	T.P. Biologie-Cellulaire
Raymond BELEMTUGOURI	T.P. Biologie Cellulaire
Gustave KABRE	Biologie
Drissa SANOU	Biologie Cellulaire

Institut du Développement Rural (IDR)

Maîtres de Conférences

Didier ZONGO	Génétique
Georges Annicet OUEDRAOGO	Biochimie

Faculté des Sciences Economiques et de Gestion (FASEG)

Maître-Assistant

Tibo Hervé KABORE	Economie-Gestion
-------------------	------------------

Assistants

Mamadou BOLY

Gestion

Faculté de Droit et Sciences Politiques (FDSP)**Assistants**

Jean Claude TAITA

Droit

ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mme Henriette BARY

Psychologie

Boukari Joseph OUANDAOGO

Cardiologie

Aimé OUEDRAOGO

Ophtalmologie

R. Joseph KABORE

Gynécologie-Obstétrique

Saïdou Bernard OUEDRAOGO

Radiologie

Dr Bruno ELOLA

Anesthésie-Réanimation

Dr Michel SOMBIE

Planification

Dr Nicole PARQUET

Dermatologie

M. GUILLRET

Hydrologie

M. DAHOU (in memoriam)

Hydrologie

Dr Bréhima DIAWARA

Bromatologie

Dr Annette OUEDRAOGO

Stomatologie

Dr Adama THIOMBIANO

Législation Pharmaceutique

Dr Sidiki TRAORE

Galénique

Mr Mamadou DIALLO

Anglais

Mr KPODA

Anglais

Dr Badioré OUATTARA

Galénique

Dr Tométo KALOULE

Médecine du Travail

Dr Alassane SICKO

Anatomie

Dr Aline TIENDREBEOGO

Chimie Analytique et contrôle médic.

Dr Sény KOUANDA

Santé Publique

Dr Noël ZAGRE
Dr TRAORE / COULIBALY Maminata

Nutrition
Biochimie

ENSEIGNANTS MISSIONNAIRES

A.U.P.E.L.F.

Pr. Lamine DIAKHATE

Hématologie (Dakar)

Pr. Abibou SAMB

Bactério-Virologie (Dakar)

Pr. José Marie AFOUTOU

Histologie-Embryologie (Dakar)

Pr. Makhtar WADE

Bibliographie (Dakar)

Pr. M. K .A. EDEE

Biophysique (Lomé)

Pr. Ag. Mbayang NDIAYE-NIANG

Physiologie (Dakar)

Pr. Ag. R DARBOUX

Histologie-Embryologie
(Bénin)

Pr. Ag. E. BASSENE

Pharmacognosie (Dakar)

O.M.S.

Dr Jean-Jacques BERJON

Histologie-Embryologie
(Creteil)

Dr Frédéric GALLEY

Anatomie Pathologique (Lille)

Dr Moussa TRAORE

Neurologie (Bamako)

Pr. Auguste KADIO

Pathologies infectieuses et
parasitaires (Abidjan)

Pr Jean Marie KANGA

Dermatologie (Abidjan)

Pr. Arthur N'GOLET

Anatomie Pathologique (Brazzaville)

Mission Française de Coopération

Pr. Etienne FROGE

Médecine Légale

Pr AYRAUD

Histologie-Embryologie

Pr. Henri MOURAY

Biochimie (Tours)

Pr. Denis WOUESSI DJEWE

Pharmacie Galénique (Paris XI)

Pr. M. BOIRON

Physiologie

Mission de l'Université Libre de Bruxelles
(ULB)

Pr. Marc VAN DAMME

Chimie Analytique-Biophysique

Pr. Viviane MOES

Galénique

A NOS MAITRES & JUGES

- A notre Maître et Président de Jury

Le Professeur Michel HANOCQ

Directeur du laboratoire de Toxicologie, de chimie bioanalytique et chimie physique appliquée de l'Université Libre de Bruxelles

Responsable de la convention de coopération entre l'Université Libre de Bruxelles et l'Université de Ouagadougou

Vous faites un grand honneur en acceptant de présider la commission du jury chargée de sanctionner ce travail.

Malgré vos multiples occupations et vos lourdes responsabilités, vous avez manifesté un grand intérêt de nous faire profiter de vos connaissances et votre immense expérience .

Soyez assuré de notre grande reconnaissance.

- A notre Maître et Juge

Le Professeur T. Robert GUIGEMDE

Pr titulaire en Parasitologie

Enseignant de Parasitologie à la FSS

Chef de la section Parasitologie- Entomologie du centre Muraz

Expert de l'OMS

Médecin chef du CRCP/ OCCGE

Vous avez initié et dirigé ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous garderons en mémoire, la qualité de vos connaissances lors de vos missions d'enseignement à la FSS (Ouaga), votre rigueur scientifique et votre simplicité.

Puisse ce travail être à la hauteur de vos attentes.

- A notre Maître et Juge

Le Professeur Pierre I GUISSOU

Pr titulaire de Toxico-Pharmacologie

Enseignant de Toxico-Pharmacologie à la FSS

Vice -Doyen aux Affaires Académiques à la FSS

Directeur de la section pharmacie à la FSS

Chef du département du MEPHATRA / PH à l'IRSS

Chef du Laboratoire de Biochimie au CHNYO.

Nous sommes très touchés de l'honneur que vous nous faites en acceptant de codiriger ce travail.

Vos connaissances en Toxico-Pharmacologie et votre souci d'exigence m'ont évité nombre d'approximation et d'oublis. De vous, nous garderons en souvenir vos qualités humaines et votre disponibilité.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

- A notre Maître et Juge

Le Docteur Jean-Baptiste NIKIEMA

Dr ès Sciences pharmaceutiques spécialisé en pharmacognosie

Responsable du laboratoire pharmacognosie et valorisation des plantes médicinales à la FSS

De vous nous avons reçu conseils, suggestions, encouragements et surtout votre disponibilité qui ont permis d'aboutir à cette oeuvre.

Soyez en remercié.

DEDICACES

Je dédie ce travail.....

- *A mon père et ma mère,*
pour toute l'attention et l'amour dont vous faites preuve à mon égard. Puissiez - vous
bénéficier pendant encore de longues années le fruit de ce travail qui est le vôtre.
- *A tous mes frères et soeurs* (Zénabo, Boureima, Saïdou, Fati, Maï)
pour davantage de solidarité.*
- *A tous mes neveux et nièces* (Lili, Modeste, Ramata et Aïda)
- *A mes tantes, oncles, cousins et cousines*
pour votre soutien
- *A Mme OUEDRAOGO Aminata* à la SNTB (Bobo) et son époux
pour leur inépuisable gentillesse.
- *A Mr OUEDRAOGO Christophe* et famille
- *Au Dr SARE Soumaïla* à la pharmacie Ah Rama
- *A Mme KYELEM Véronique* et famille
- *A Mr SOME Jules-Mari et au Dr EKLOU Antoine*
- *A Mr ZOUGMORE François* et épouse

pour leur soutien de tout genre et pour leur patience parfois désespérée du jour de la
soutenance.
- *A tous mes amis et amies* (Yolande, Eugénie, Placide, Alphonse, Raïssa, Sophie, Moussa,
Eustache, Ousséini, Anita, Anasthasie, Carole, Zénabo, Diane, Alice, Delphine)
Trouvez ici ma sympathie.
- *A tous mes camarades de promotion*
pour tous les moments inoubliables passés et pour les souvenirs des amitiés
estudiantines, restons unis.
- A tous ceux qui œuvrent pour la paix et la justice*
Sincères encouragements

REMERCIEMENTS

Je voudrais à travers ces remerciements que tous ceux, qui d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'élaboration de cette thèse, trouvent ici l'expression de profonde gratitude.

Je pense particulièrement à :

* A tous les enseignants et personnel administratif de la FSS

* Au personnel de la banque de sang du CHNYO et de la pharmacie Talba.

* Au personnel de l'IRSS

. Pr KABORE I. Z pour les échanges fructueux, encouragements durant la rédaction de ce travail

. Dr OUEDRAOGO S., Dr KINI ., Dr SOURABIE S., Dr LOMPO M., Mr KADEBA D., Mr YARO B., Dr SOME N., Mr KINDA D., Fati, Léontine, dont la sympathie, l'esprit de collaboration et de contribution à l'intérêt de ce travail n'ont jamais failli.

* Au personnel du Centre Muraz

. Dr OUEDRAOGO J B., Dr COULIBALY S O., Dr TINTO H. , Dr TRAORE M., Dr DIABATE Abdoulaye pour leurs critiques constructives et leurs encouragements.

. Mr BAKARY, Mr TRAORE, Mr OUEDRAOGO Albert, Mr SANOU, Mr DEMBA, Dominique, Mr TAMBOULA, BICABA, Odile, ZOUNGRANA, Patrice, Seydou, Adama pour l'ambiance fraternelle qui a régné entre nous.

* A LABOREX pour la prise en charge de la frappe, impression et papier de la thèse.

* Au Dr SIRINA du CNLP et à Mr NIKIEMA Justin à la FAST qui, chacun à sa manière a avec un dévouement inestimable participé à l'élaboration de ce travail.

* A Mr BOGNOUNOU du CNRST qui a contribué à l'identification de la plante, objet de la présente étude.

* A Mme Dayani pour m'avoir aidé à récolter la plante

« La Faculté des Sciences de la Santé a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation »

SOMMAIRE

I/ INTRODUCTION.....	1
II/ ENONCE DU PROBLEME.....	2
III/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
CHAPITRE 1 : LE PALUDISME.....	4
1-Cycle évolutif du <i>Plasmodium falciparum</i>	4
2. Physiopathologie du paludisme.....	7
3. Les antipaludiques.....	8
4. Les résistances médicamenteuses.....	10
5. Le <i>Plasmodium berghei</i>	11
5.1. Cycle évolutif.....	11
5.2. Biologie-Anatomie.....	11
5.2.2. Anatomie.....	12
5.3. Les antiplasmodiques anti- <i>Plasmodium berghei</i>	12
CHAPITRE 2 : GARDENIA SOKOTENSIS HUTCH (RUBIACEAE).....	14
1. Données botaniques.....	14
1.1. Généralités sur les rubiaceae.....	14
1.2. Caractéristiques de <i>Gardenia sokotensis</i>	14
1.2.1. Caractères botaniques.....	14
1.2.2. Cycle végétatif.....	15
1.2.3. Distribution et habitat.....	15
2. Données ethnobotaniques.....	17
2.1. Noms vernaculaires en Afrique et au Burkina Faso.....	17
2.2. Usages en médecine traditionnelle.....	17
2.3. Autres utilisations.....	17
3. Données phytochimiques.....	18
4. Données pharmacologiques.....	18
IV/ ETUDE REALISEE.....	19
CHAPITRE 1 : OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	19
1. Objectif général.....	19
2. Objectifs spécifiques.....	19
CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....	20
1. Cadre d'étude.....	20
2. Matériel.....	21
2.1. Matériel végétal.....	21
2.2. Matériel biologique.....	21
2.2.1. Le lombric.....	21

2.2.2. La Souris NMRI.....	21
2.2.3. Le <i>Plasmodium berghei</i>	22
2.2.4. Les sangs humain et bovin.....	22
2.3. Matériel d'étude phytochimique.....	22
2.3.1. Matériel pour extraction.....	22
2.3.2. Matériel pour CCM, spectrophotométrie d'absorption et dosage des composés phénoliques.....	22
2.4. Matériel d'étude biologique.....	23
2.4.1. Matériel pour la DL ₅₀ et le pouvoir hémolytique.....	23
2.4.2. Matériel pour le test antiparasitaire sur le lombric.....	23
2.4.3. Matériel pour le test d'activité antiplasmodique chez la souris NMRI.....	23
2.5. Réactifs d'étude phytochimique et biologique.....	23
3. Méthodes.....	24
3-1 Etude phytochimique.....	24
3-1-1 Extraction.....	24
3-1-2. Screening phytochimique.....	25
3-1-3. Chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	31
3-1-4. Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique.....	32
3-1-5. Eléments de standardisation de la drogue.....	33
3-1-6. Dosage des composés phénoliques.....	33
3-2. Etude toxicologique.....	35
3-2-1. Recherche de la DL ₅₀	35
3-2-2. Détermination du pouvoir hémolytique.....	36
3-3. Etude pharmacologique.....	36
3-3-1. Etude de l'activité vermicide sur le lombric.....	36
3-3-2. Etude de l'activité antiplasmodique.....	37
CHAPITRE 3 : RESULTATS D'ETUDE.....	39
1 Résultats de l'étude phytochimique.....	39
1-1 Screening phytochimique.....	39
1-2. Chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	41
1-3. Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique.....	44
1-4. Eléments de standardisation de la drogue.....	45
1-1-5. Dosage des composés phénoliques.....	46
2-Résultats de l'étude toxicologique.....	53
2-1-Etude de la Dose létale 50.....	53
2-2-Détermination du pouvoir hémolytique.....	53
3. Résultats de l'étude pharmacologique.....	55
3-1. Etude de l'activité antiparasitaire sur le lombric.....	55
3-2. Etude de l'activité antiplasmodique chez la souris.....	58
4. Discussion.....	63
4-1. Résultats de l'étude phytochimique.....	63
4-1-1. Screening phytochimique.....	63
4-1-2. Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique.....	64

4.1.3. Dosage des composés phénoliques	64
4.2. Résultats de l'étude toxicologique.....	65
4.2.1. Résultat de la recherche de la dose létale 50.....	65
4.2.2. Résultat de la détermination du pouvoir hémolytique.....	65
4.3. Résultats de l'étude pharmacologique.....	65
4.3.1. Résultat de l'étude de l'activité antiparasitaire sur de le lombric.....	65
4.3.2 Résultat de l'étude de l'activité antiplasmodique.....	66
V/ CONCLUSION ET SUGGESTIONS.....	68
VI/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69

Lexique des sigles et des abréviations

A.F.A.B : Atelier de Fabrication d'Aliment pour Bétail

C.C.M : Chromatographie sur Couche Mince

CH₂Cl₂ : Chlorure de méthylène

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50

C.I.R.D.E.S : Centre International de Recherche-Développement de l'Élevage en Zone Subhumide

Conc : Concentration

Cp : Comprimé

C.R.C.P : Centre de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme

DE₅₀ : Dose Effet 50

DE₉₀ : Dose Effet 90

DE₁₀ : Dose Effet 10

DL₅₀ : Dose Létale 50

E.D.T.A : Acide Ethylène-Diamino-Tétra-Acétique

FeCl₃ : Chlorure ferrique

g/ j : gramme/ jour

G.R.P : Globules Rouges Parasités

HCl : Acide chlorhydrique

H₂O : Eau

H₂SO₄ : Acide sulfurique

IP : Intrapéritonéale

I.R.S.S : Institut de Recherche en Sciences de la Santé

jrs : jours

Kg : Kilogramme

KOH : Hydroxyde de potassium

MEPHATRA/ PH : Médecine -Pharmacopée Traditionnelle/ Pharmacie

mg / ml : milligramme/ millilitre

mg/ kg : milligramme/ kilogramme

μl : microlitre

min : minute

nm : nanomètre

N.M.R.I : Naval Medical Research Institut

O.C.C.G.E : Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les
Grandes Endémies

O.M.S: Organisation Mondiale de la Santé

Q.S.P : Quantité Suffisante Pour

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium

UV : Ultraviolet

I - / INTRODUCTION

Il n'y a pas de doute que le paludisme demeure la maladie parasitaire la plus importante et la plus dévastatrice dans les régions tropicales d'Afrique, d'Asie du Sud et du Sud-Est et d'Amérique du Sud.

Le paludisme constitue un obstacle au développement socio-économique de nos populations. Il porte atteinte à la santé et au bien-être des populations, compromet la survie des enfants, affaiblit la population active. Par les dépenses excessives, la diminution de la productivité et le freinage de la croissance qu'il entraîne, il réduit encore les ressources déjà limitées des états et des populations. (1)

En effet sur une population mondiale d'environ 5,4 milliards d'habitants, 2,2 milliards sont exposés à des infections palustres. Selon les estimations les plus récentes il y aurait 300 à 500 millions de cas cliniques chaque année dont plus de 90% dans les pays de l'Afrique tropicale (2).

Du fait du coût onéreux des médicaments importés, la plupart des populations ont recours aux thérapeutiques traditionnelles. D'après une estimation de l'OMS (3), il y a peut-être 80% de la population qui ont recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire leurs besoins en soins de santé primaires.

On peut présumer sans grand risque d'erreur que la majeure partie du traitement traditionnel consiste à utiliser des extraits de plantes ou à pratiquer de l'opothérapie.

S'il est vrai que "*La question n'est plus de démontrer l'efficacité de la médecine traditionnelle mais plutôt de s'en convaincre et convaincre les autres peuples*" (Pr. Sita Guinko), l'efficacité de certains traitements traditionnels n'est pas toujours démontrée et la toxicité des produits traditionnels n'est pas connue. Ceci aurait peut-être pour causes les mystères qu'il y a autour de la plante (plante ou partie de la plante utilisée, solvants d'extraction peu connus ou limités, associations, mode d'administration etc.), la méconnaissance des doses, des posologies ou de la durée de traitement.

La présente étude portera sur une plante très vendue par de nombreux herboristes de Ouagadougou et qui est nommée *Gardenia sokotensis* Hutch (Rubiaceae). Cette étude consistera à évaluer l'activité antiplasmodique de *Gardenia sokotensis* sur la souris infestée par *Plasmodium berghei*.

II - / ENONCE DU PROBLEME

Les innovations dans la thérapeutique du paludisme sont limitées et de plus en plus on enregistre des souches de plasmodiums résistantes aux antipaludiques de synthèse et des moustiques insensibles aux insecticides. Cette résistance souvent engendrée par l'automédication, ou l'emploi irrationnel des médicaments antipaludiques pose un sérieux problème dans la thérapeutique antipaludique (3).

Face au problème de chimiorésistance du parasite le besoin de développer de nouveaux antimalariques efficaces et bien tolérés n'est pas seulement important mais urgent.

Certaines plantes médicinales dont l'intérêt est historiquement prouvé peuvent permettre d'obtenir des préparations utiles. Et pour mettre au point ces médicaments d'origine végétale, une des principales méthodes consiste à examiner les applications recommandées pour une préparation traditionnelle. Toutefois, il convient de faire passer en premier lieu l'évaluation de l'innocuité, même au détriment de la démonstration de l'efficacité de la préparation (3).

Enfin, afin de mieux adapter les réputations de la médecine traditionnelle, il faut passer à l'étape d'expérimentations en laboratoire.

Au Burkina Faso, les structures de recherche que sont l'IRSS et le Centre Muraz travaillent en partenariat dans le domaine du paludisme.

Il existe un éventail de plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme et des accès fébriles. Ce sont entre autres : *Cassia sieberiana* DC (Caesalpinaceae), *Cochlospermum planchonii* Hook.F (Cochlospermaceae), *Cochlospermum tinctorium* A.Rich (Cochlospermaceae), *Anogeissus leiocarpus* (DC) GUILL .et Perr. (Combretaceae); *Nauclea latifolia* SM (Rubiaceae), *Vitex doniana* SWEET (Verbenaceae) (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

La plupart de ces plantes sont beaucoup vendues par des herboristes des marchés de la ville de Ouagadougou.

Des études soit *in vitro*, soit *in vivo* ont été effectuées sur des extraits de plantes. On peut citer les travaux de Carvalho et coll.(11) qui ont montré une activité schizontocide des extraits de *Vernonia brasiliensis*, *Eupatorium squalidum*, *Acanthospermum australe*, *Esenbeckia febrifuga*, *Lisianthus speciosus*, *Tachia*

guianensis avec 40 à 50 % d'inhibition de la croissance du *Plasmodium berghei* *in vivo* par voie orale.

De l'étude de 43 espèces de plantes médicinales antimalariques en Tanzanie, quatre se sont révélées plus actives sur le *Plasmodium falciparum* *in vitro* : il s'agit de *Cissampelos mucronata*, *Maytenus senegalensis*, *Salacia madagascariensis* et *Zanthoxylum chalybeum* (12).

Des fractions organiques des racines de deux *Cesalpiniaceae* (*Cassia abbreviata* et *Senna petersiana*) ont révélé une CI_{50} inférieure à 3 µg/ ml sur une souche Vietnamiennne de *Plasmodium falciparum* (13).

L'extrait de *Cochlospermum angolense* a montré une inhibition de *Plasmodium berghei* en culture avec 25 µg/ ml (effet sur la synthèse de l'ADN du parasite). Cet extrait entraînait 50 % d'inhibition de *Plasmodium falciparum* avec une concentration de 10 µg/ ml et 100 % d'inhibition à la concentration de 50 µg/ ml (14).

Acanthospermum australe (Compositae) a révélé une activité *in vitro* sur le *Plasmodium falciparum* (15).

Gardenia sokotensis utilisée dans le traitement du paludisme a déjà fait l'objet d'étude *in vitro* (16) pour tester son activité antiplasmodique sur le *Plasmodium falciparum* qui a révélé une CI_{50} qui a permis de la classer dans la gamme des plantes étant actives sur le *Plasmodium falciparum*. La CI_{50} était de 55,15 µg/ ml avec la fraction hydroalcoolique.

Ces résultats ont justifié notre choix de l'étude *in vivo* de l'activité antiplasmodique de l'extrait hydroalcoolique chez la souris NMRI infestée par *Plasmodium berghei*.

III - / RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1 : LE PALUDISME

1-Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum*

La transmission naturelle du paludisme se fait à la suite de la piqure d'une anophèle femelle infectée. La source de l'infection palustre est soit une personne malade soit une personne porteur asymptomatique de plasmodium.

Parmi les quatre espèces de plasmodium pouvant parasiter l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) seul *P. falciparum* est mortel. Malheureusement, c'est l'espèce la plus répandue en Afrique (17).

Le cycle évolutif des espèces plasmodiales se déroule en deux phases :

- une phase sexuée chez l'anophèle femelle(hôte définitif)
- une phase asexuée chez l'homme (hôte intermédiaire)

1.1.Phase asexuée

Elle comprend deux étapes

-étape hépatique (17).:

Lors d'un repas sanguin, les sporozoïtes ou formes infestantes localisées dans les glandes salivaires de l'anophèle femelle sont transférés dans le courant circulatoire de l'hôte intermédiaire.

Selon leur abondance s'ils ne sont pas tous phagocytés, une bonne partie d'entre eux vont atteindre en 30 à 60 min le parenchyme hépatique où ils vont subir une maturation ou rester quiescents. La maturation ou schizogonie intra-tissulaire varie en fonction de l'espèce et va donner les mérozoïtes qui vont infester les érythrocytes après passage dans le sang. Une forme quiescente ou latente a été décrite sous le nom d'hypnozoïte pour *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* expliquant les rechutes tardives.

- étape sanguine (18) :

Après une génération de schizogonie intra-hépatique et une maturation de durée variable de 5 à 15 jours selon l'espèce, plus de 2000 mérozoïtes par cellule hépatique infestée sont libérés; après une vie très courte dans le plasma, ils vont atteindre rapidement les érythrocytes. Le mérozoïte pénètre dans l'érythrocyte en moins de 20 secondes, se développe et devient un trophozoïte.

Le trophozoïte mononucléé, se multiplie par schizogonie en un temps variable selon l'espèce. Le noyau subit 3 à 5 divisions mitotiques; ainsi 8 à 24 noyaux fils peuvent être formés selon les espèces et donner des schizontes intra-érythrocytaires. Ces derniers par condensation du cytoplasme péri-nucléaire, produisent de nouveaux mérozoïtes. La rupture de la membrane érythrocytaire libère les mérozoïtes pour un temps très court dans la circulation sanguine où ils recolonisent de nouvelles hématies.

1.2. la phase sexuée

Elle débute avec la formation des gamétocytes qui apparaissent après plusieurs cycles intra-érythrocytaires. La production de gamétocytes semble sous la dépendance de l'immunité de l'hôte, de la pression médicamenteuse et du métabolisme du parasite.

Pour *Plasmodium falciparum*, les gamétocytes vont se développer uniquement dans les organes profonds (rate, moelle osseuse) et ils apparaissent dans la circulation périphérique lorsqu'ils sont pratiquement matures. Pour les autres espèces, il semble que la gamétocytogonie prenne naissance dans la circulation périphérique.

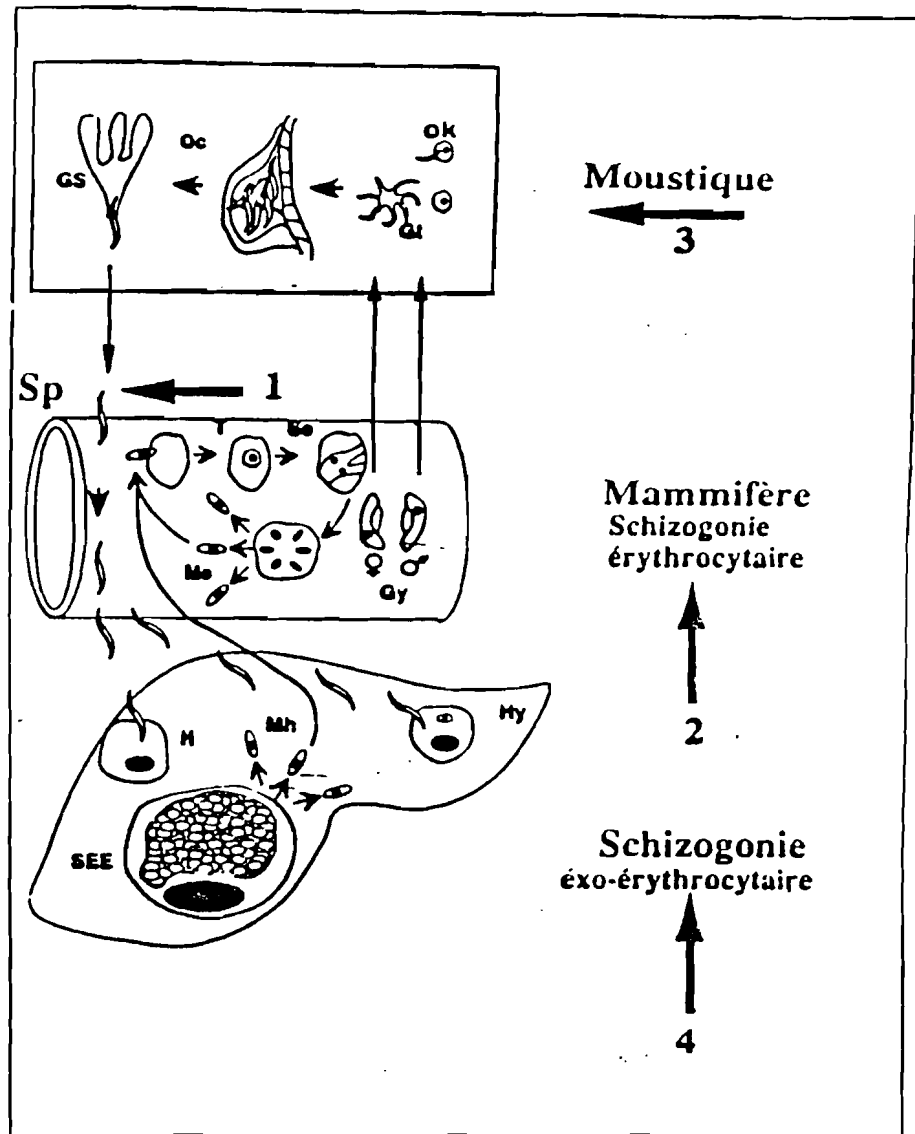
Lors d'un repas sanguin, l'anophèle absorbe les gamétocytes mâles et femelles. La formation de gamètes puis la fécondation des gamètes femelles donne naissance à un ookinète, élément mobile qui selon l'espèce plasmodiale atteint l'épithélium digestif de l'insecte en 15 à 78 heures, où il se transforme en oocyste qui devient mature en 8 à 10 jours renfermant plusieurs sporozoïtes.

Les sporozoïtes matures libérés de l'oocyste s'échappent dans l'hémocèle d'où ils gagnent les glandes salivaires de l'anophèle femelle et où leur pouvoir infestant serait multiplié par 1000.

A l'intérieur des glandes salivaires les sporozoïtes peuvent séjourner jusqu'à 59 jours soit dans une vacuole, soit plus fréquemment à l'état libre dans le cytoplasme des cellules sécrétoires de l'acinus.

On peut dénombrer entre 50 et 70000 sporozoïtes dans les glandes salivaires de l'insecte. Après avoir franchi les cellules des glandes salivaires, le sporozoïte resté dans le canal excréteur sera injecté à l'hôte vertébré au moment du repas sanguin de l'anophèle femelle.

La figure 1 présente le cycle évolutif des plasmodies.



(GS = glandes salivaires ; Oc = oocyste ; Oc : ookinète ; Gi = gamètes ; sp = sporozoïtes ; T = trophozoïtes ; Se = schizontes érythrocytaires ; Me = mérozoïtes érythrocytaires ; Gy = gamétocytes ; H = hépatocyte ; Hy = hypnozoïte ; SEE = schizonte exo-érythrocytaire ; Mh = mérozoïtes hépatiques).

Figure 1 : Cycle évolutif des plasmodies (19)

2. Physiopathologie du paludisme

D'une façon paradoxale, la physiopathologie du paludisme est très mal connue. La symptomatologie dépend de plusieurs facteurs liés soit au malade (niveau d'immunité acquise en particulier) soit surtout au parasite (espèce plasmodiale).

Les manifestations cliniques du paludisme (20) sont diverses dans leur expression et leur gravité. Elles vont de l'accès fébrile aiguë avec ou sans défaillance viscérale grave, au parasitisme sanguin prolongé quasi asymptomatique, en passant par un paludisme subaiguë et chronique avec anémie et cachexie. Les différents tableaux cliniques sont :

- les accès simples (accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique, paludisme viscéral évolutif) qui sont communs à toutes les espèces plasmodiales.
- le neuropaludisme, la fièvre tierce maligne, la fièvre bilieuse hémoglobininurique pour ce qui concerne le *Plasmodium falciparum*.
- la néphrite quartane pour le *Plasmodium malariae*.

Nous allons seulement décrire la physiopathologie de l'accès simple (21).

- Pour la fièvre, le facteur déclenchant est la libération au moment de l'éclatement des hématies parasitées du pigment malarique (hémozoïne) qui se comporte comme une véritable substance pyrogène agissant sur les centres bulbaires de la thermorégulation. Au niveau de chaque hématie parasitée la quantité d'hémozoïne libérée est évidemment négligeable mais lorsque la parasitémie atteint un certain seuil, le pigment pyrogène libéré est suffisant pour entraîner des crises fébriles.

Pendant la phase de début, le cycle endo-érythrocytaire du plasmodium est encore mal synchronisé. La fièvre a alors une allure continue et elle est modérée ou élevée selon la parasitémie. En revanche lorsque le cycle endo-érythrocytaire des plasmodiums présents chez le malade se synchronise progressivement, la libération du pigment malarique est régulièrement répétée ce qui confère à l'accès palustre l'une de ses principales caractéristiques : la périodicité.

- L'anémie résulte d'une part de facteurs mécaniques (éclatement des hématies parasitées) et aussi par d'autres mécanismes:

a/ fixation sur les membranes érythrocytaires d'antigènes plasmodiaux solubles responsables d'immunohémolyse sous l'action des anticorps ou d'auto-anticorps.

b/ action de facteurs plasmatiques libérés par les plasmodiums et fragilisant les parois érythrocytaires.

c/ activité opsonisante d'autres produits du métabolisme parasitaire favorisant la phagocytose des hématies par les cellules monocytaires.

- La thrombopénie est due à une séquestration des plaquettes, des antigènes plasmodiaux solubles induiraient la fixation d'immunoglobulines antiplaquettaires.

- L'hépatomégalie et surtout la splénomégalie sont la conséquence de l'hyperactivité du système monocyte-macrophage chargé de débarrasser l'organisme aussi bien du pigment malarique que des débris érythrocytaires.

3. Les antipaludiques

Le traitement a pour but la guérison radicale, c'est-à-dire la destruction de toutes les formes parasitaires présentes dans l'organisme, encore que chez le sujet exposé à des infections répétées, il se limite parfois à des guérisons cliniques. On distingue les antipaludiques d'origine végétale et les antipaludiques de synthèse.

3.1. Les antipaludiques d'origine végétale (22)

Le premier antipaludique d'origine végétale isolé est la quinine qui est un alcaloïde des racines de *Cinchona cuccirubra* (Rubiaceae) en 1820 par Pelletier et Caventou. On peut citer encore l'artémisinine ou qinghaosu, les quassinoïdes (extraits des Simaroubaceae).

Il existe d'autres principes actifs antiplasmodiques qui sont les terpènes, les quinones les composés phénoliques.

3.2. Les antipaludiques de synthèse (17)

On peut les classer de la manière suivante :

Classification chimique

Classification pharmacologique

Classification selon l'origine

3.2.1 Classification chimique

Cette classification chimique regroupe les composés suivants :

- les quinolyls méthanol (quinine, halofantrine, méfloquine)
- les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine)
- les amino-8-quinoléines (primaquine)
- les sulfones (dapson),
- les sulfamides (sulfadoxine, sulfalène),
- les diaminopyrimidines (pyriméthamine)
- les biguanides (proguanil et chlorproguanil)
- les sesquiterpènes lactones (artémisinine , artésunate, artéméther).
- les cyclines (tétracycline, doxycycline, minocycline)
- les macrolides (érythromycine, lyncomicine, clindamicine)
- les quinolones.

3.2.2 Classification pharmacologique

Selon le délai d'action :

- rapide : (quinolyls méthanol , les amino-4-quinoléines)
- lent : (sulfamides, biguanides, pyriméthamines)

Selon le spectre d'activité :

Schizontocides

- sur les schizontes tissulaires prévenant le passage du parasite vers les globules rouges et réalisant une prophylaxie causale (primaquine, proguanil, pyriméthamine, sulfone, sulfamide).
- sur les schizontes sanguins : amodiaquine, chloroquine, méfloquine,
- sur les hypnozoïtes guérissant les rechutes de *P. vivax*, *P. ovale* : et implique une cure radicale (primaquine).

Gamétocytocides

- sur les gamétocytes coupant le cycle de transmission du paludisme : quinine, amino-4-quinoléines sur *P. malariae* et *P. vivax*, et primaquine sur les quatre espèces.

3.2.3 Classification selon l'origine

- naturelle : (quinine, artémisinine)
- synthétique : (quinolyls méthanol , amino-4-quinoléines , amino-8-quinoléines, antifoliques, antifoliniques).

3.3. Posologies usuelles des schizontocides

La posologie moyenne des schizontocides exprimée en base est consignée sur le tableau 1.

Tableau 1: Posologie moyenne de schizontocides exprimée en base (22)

	Adulte	Enfant
Quinine	1,5 g /j x 5 à 7 jrs	25mg /kg x 5 à 7 jrs
Méfloquine	1,5 g /j en 3 prises	25mg /kg en 3 prises
Halofantrine	idem	idem
Chloroquine et Amodiaquine	1,5 à 2,5 g en 3 à 5 jrs	25 à 35 mg en 3 à 5 jrs
Sulfadoxine-pyriméthamine	3 cp en 1 prise	½ cp / 10 kg de poids
Sulfadoxine-pyriméthamine-méfloquine	idem	idem

4. Les résistances médicamenteuses

Connue dès la décennie 1950-1960 avec le proguanil pour toutes les espèces plasmodiales et dans toutes les régions, étendue quelques années plus tard à la pyriméthamine dans les mêmes conditions, la résistance des hématozoaires aux antipaludiques ne devint un phénomène de santé publique qu’à partir du moment où elle concerna la chloroquine, antipaludique le plus utilisé et le moins onéreux (23).

A partir de 1987, la chloroquinorésistance s’étendit au Golf de Guinée, au Sahel et dans une bonne partie de l’Afrique de l’Ouest. Les premiers cas de chimiorésistance du Plasmodium ont été confirmés sur le continent africain en 1978 au Kenya et en Tanzanie, en 1980 à Madagascar, 1988 au Burkina Faso et au Mali (24).

Au Burkina Faso, le Centre Muraz à travers le C.R.C.P a élaboré un projet de surveillance de la chimiorésistance pour les pays membres (25, 26).

En 1991, Guiguemdé et al. (27) ont publié le bilan de 10 ans de surveillance de la chloroquinorésistance au Burkina Faso (1982 à 1991) faisant état d’une régression des taux de chloroquinorésistance *in vitro* et *in vivo* respectivement de 41 et 15,8 % au

début à 25 et 5,5 % en 1991. Ils ont constaté une stabilité du taux de chloroquinorésistance *in vivo* autour de 14,4 % de 1988 à 1991.

5. Le *Plasmodium berghei*

5.1. Cycle évolutif (28)

Les cycles évolutifs de tous les plasmodiums murins sont similaires.

L'infection commence par l'injection des sporozoïtes provenant des glandes salivaires de l'anophèle infestée (hôte définitif) appelée *Anopheles stephensis* pour le *Plasmodium berghei*.

Au niveau du foie du rongeur (hôte intermédiaire), une schizogonie exo-érythrocytaire commence. Cette phase durera 48 à 60 heures et va donner des mérozoïtes. Chez certaines espèces, une seconde phase de schizogonie exo-érythrocytaire est possible.

Les mérozoïtes issus de cette schizogonie vont ensuite envahir les globules rouges de la circulation sanguine, subir une maturation et devenir des trophozoïtes puis des schizontes pouvant produire 6 à 10 mérozoïtes. Ces mérozoïtes peuvent réenvahir les globules rouges ou devenir des gamétocytes qui sont pris par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin.

Ces gamétocytes vont devenir des gamètes qui donneront après fécondation un ookinète, se transformant par la suite en oocyste. L'oocyste mature va libérer des sporozoïtes qui vont se localiser dans les glandes salivaires de l'anophèle pendant 10 à 12 jours.

5.2. Biologie-Anatomie

5.2.1. Biologie (28)

Le *Plasmodium berghei* est un parasite des rats, des souris, et des hamsters. Il infecte aussi certaines espèces de moustiques telle que *Anopheles stephensi*.

Il est très virulent et fatal pour les jeunes souris et rats.

Chez l'anophèle femelle sa température optimale de développement est de 22°. La taille des oocystes est de 45 μm avec un temps de maturation de 12 heures. La longueur des sporozoïtes est de 11 μm .

Chez le rat et la souris, la schizogonie exo-érythrocytaire va donner des schizontes de 30 μm pouvant produire 8 à 18 mérozoïtes.

Enfin ses cellules de prédilection sont les réticulocytes.

5.2.2. Anatomie (29)

La structure cellulaire du *Plasmodium berghei* est composée :

- d'une membrane plasmique
- d'un cytoplasme contenant un noyau, un appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique, des mitochondries.

La membrane plasmique du sporozoïte se trouvant dans les glandes salivaires du moustique est constituée d'acide protéique de poids moléculaire compris entre 30 à 60 kilodaltons. Au stade de mérozoïte et de schizonte, la structure de la membrane plasmique est complexe et inexplorée.

Dans le cytoplasme du sporozoïte sont synthétisées des protéines, précurseurs de haut poids moléculaire et qui sont incorporées dans la membrane plasmique du parasite. Ces protéines seront impliquées dans la reconnaissance et l'invasion de l'hépatocyte après l'infection chez le mammifère (hôte intermédiaire).

La membrane plasmique des sporozoïtes immatures contient peu ou aucune de ces protéines précurseurs de l'infection.

5.3. Les antiplasmodiques anti-*Plasmodium berghei*

Quatre quassinoïdes (ailanthinone, 2'acéthyglauucarubinone, glauucarubinone et halocantone) après étude *in vivo* chez la souris ont révélé une activité contre le *Plasmodium berghei* (30).

Certaines plantes du Brésil telles que *Vernonia brasiliensis*, *Eupatorium squalidum*, *Acanthospermum australe*, *Esenbeckia febrifuga*, *Lisianthus speciosus*, *Tachia guianensis* ont montré une activité schizontocide avec 40 à 50 % d'inhibition de la croissance de *Plasmodium. berghei in vivo* en per os (11).

Porter.M et al. en 1975 (31) ont démontré que la chloroquine et la quinine avaient respectivement une DE_{50} de 1,1 mg/ kg et de 65 mg/ kg en sous-cutanée sur le *Plasmodium berghei* (31). Les mêmes auteurs ont révélé que la molécule WR 122, 455 (a 9-phenanthrenemethanol) avait une DE_{50} de 5 mg/ kg en intrapéritonéale sur le *Plasmodium berghei*.

Chapitre 2 :GARDENIA SOKOTENSIS Hutch (Rubiaceae)

1. Données botaniques

1.1. Généralités sur les rubiaceae

Selon P.Duvigneaud et L. Van Bockstal (32) (1975-1976), les rubiaceae sont des arbres ou arbustes, rarement des herbes; les feuilles sont opposées ou verticillées, toujours stipulées (400 genres, 5000 espèces toujours tropicales). Ils possèdent un style, un stigmate globuleux ou divisé; on note une préfloraison placentaire, des types de fruits très variables, généralement surmontés des restes du calice. Les graines sont albuminées.

On note une grande richesse en alcaloïdes souvent en quantité importante: dérivés de la quinoléine (quinine etc..), des bases puriques (caféine, etc...). Ces alcaloïdes sont souvent mal définis (émétine, yohimbine, etc...). On retrouve aussi des colorants anthracéniques et des tanoïdes.

Les rubiaceae sont des plantes amères, toniques, fébrifuges, excitatrices, diurétiques etc..

Les feuilles possèdent parfois des scrobicules ou bactériodomaties (fixatrices d'azote) caractéristiques.

En Afrique tropicale, ils constituent une importance phytogéographique. De plus, ce sont de très nombreux arbustes et arbres des forêts ombrophytes, des forêts claires et des régions des savanes. Les rubiaceae sont un suftrutex rhizomateux des steppes.

1.2. Caractéristiques de *Gardenia sokotensis*

1.2.1. Caractères botaniques (33)

Gardenia sokotensis est un abrisseau atteignant 1 à 2m de hauteur. Dans le jeune âge, les branches vertes sont glutineuses.

Les feuilles sont allongées, elliptiques, obtuses aux deux bouts de 4 à 10 cm sur 2 à 4.5 cm, pubescentes, opposées sur les rameaux à fleurs. Les nervures latérales sont au nombre de 8 à 10 et proéminentes en dessous.

Les fleurs sont souvent terminales blanches et géminées. Le pédoncule est fin, long. Le calice glutineux comporte des lobes étroitement lancéolés avec une corolle en forme de cloche de 1.5 cm de longueur légèrement pubescente; les sépales linéaires de 1 cm environ collants de même que tous les bourgeons.

Les fruits sont petits ellipsoïdes de 0.5 à 1 cm de diamètre.

1.2.2. Cycle végétatif (34)

La floraison se fait d'avril à juillet, les fruits mûrissent de mai à juillet.

1.2.3. Distribution et habitat (33)

Espèce soudano-zambézienne, la plante se rencontre en Afrique de l'Ouest où on la trouve dans la végétation autour des affleurements granitiques ou sur les collines et stations rocheuses .

L'étude menée a porté sur un échantillon de *Gardenia sokotensis* prélevé à Kipaliga, localité située à 2 km de Fada N'gourma. Fada N'gourma est une ville située à l'Est du Burkina Faso à environ 400 km de Ouagadougou. La récolte a été faite en saison pluvieuse en Juillet 1997.

Au Burkina Faso *Gardenia sokotensis* est abondante dans les régions de Kourimogho, de Kaya, de Gourcy. Sur le plateau central elle est devenue rare à cause des surexploitations à des fins médicinales.

La figure 2 qui suit présente une photo de *Gardenia sokotensis*.



Figure 2 : Gardenia sokotensis HUTCH (photo prise à Fada au Burkina Faso)

2. Données ethnobotaniques

2.1. Noms vernaculaires en Afrique et au Burkina Faso (34,35)

Mooré : tang-rakwenga, tang-rambrzounga

Bambara : farakoloti

Gulmancema : pkabicain

Senufo : tèghèle nyanke kacerge (des collines)

Hausa : gau dan dute

Malinké : farakolo-ti, koulouté

Dogon : wobusge

2.2. Usages en médecine traditionnelle

Cette plante est utilisée seule ou en association avec d'autres plantes dans plusieurs pathologies :

Accès fébrile : le décocté des rameaux feuillés est prescrit en boisson et bain pendant 4 jours (6).

Paludisme : le décocté des rameaux feuillés prescrit en lavement et bain (7)

Gastro-entérites : le décocté des rameaux feuillés en association au *Crossopteryx febrifuga* est prescrit en boisson (34).

Fortifiant : le décocté des rameaux feuillés est utilisé en bain chez les bébés(d'après quelques tradipraticiens).

Hypertension artérielle : le décocté du mélange des feuilles, racines, écorces est utilisé en boisson à froid (10).

Ictère- fortifiant : la poudre de la partie aérienne délayée dans la bouillie est prescrite en boisson (4).

Asthénie sexuelle masculine : le décocté des racines est prescrit en boisson (4)

2.3. Autres utilisations (34, 36)

Le bois dur est utilisé pour les petits ouvrages d'artisanat tels que cuillers, manches de couteaux.

Les branches servent à faire des épingles à cheveux dans le Fouta-Djalou.

3. Données phytochimiques

Le genre *Gardenia* a fait l'objet de peu d'étude chimique. On peut citer les investigations chimiques effectuées sur l'espèce Nigérienne qui ont mis en évidence la présence d'alcaloïdes ainsi que des saponosides (37).

Les travaux de Coulibaly M à Ouaga en 1996 (16) ont montré la présence de groupes chimiques majeurs de *Gardenia sokotensis*. Ce sont : les saponosides, les tanins, les stérols, les triterpènes, les alcaloïdes.

4. Données pharmacologiques

Les données pharmacologiques sont très limitées mais on peut noter que Hakizamungu et al. au Rwanda en 1988 (38) ont montré que l'extrait méthanolique de *Gardenia ternifolia* Schum. et Thonn avait un effet inhibiteur de l'ordre de 70% sur *Plasmodium berghei* chez la souris à la dose de 1000 mg/ kg/ jour et ceci pendant cinq jours de traitement.

Coulibaly à Ouaga en 1996 (16) a montré que *Gardenia sokotensis* avait une CI50 de 55,15 μg /ml sur le *Plasmodium falciparum in vitro* avec la fraction hydroalcoolique.

IV - / ETUDE REALISEE

Chapitre1 : OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. Objectif général

- Etudier *in vivo* l'activité antiplasmodique de l'extrait hydroalcoolique de *Gardenia sokotensis* chez la souris NMRI infestée par *Plasmodium berghei*.

2. Objectifs spécifiques

- 1- Caractériser par chromatographie sur couche mince et par une analyse qualitative les constituants chimiques des extraits hydroalcoolique et aqueux de *Gradenia sokotensis*.
- 2- Déterminer la toxicité chez la souris et le pouvoir hémolytique des extraits aqueux et hydroalcoolique.
- 3- Mesurer l'activité antiparasitaire des extraits aqueux et hydroalcoolique sur le lombric.
- 4- Mesurer l'activité antiplasmodique *in vivo* de l'extrait hydroalcoolique de *Gardenia sokotensis* sur *Plasmodium berghei* chez la souris NMRI, comparée à la quinine .

Chapitre 2: MATERIEL ET METHODES

1. Cadre d'étude

Cette étude a été menée successivement de juillet 1997 à décembre 1997 à l'I.R.S.S à Ouagadougou et au Centre Muraz dans le laboratoire de Parasitologie/Entomologie à Bobo-Dioulasso de Janvier 1998 à septembre 1998.

1.1 L' I.R.S.S

C'est l'Institut de Recherches sur les Sciences de la Santé comportant deux départements :

- Le département MEPHATRA/PH (Médecine-Pharmacopée traditionnelle/Pharmacie)
- Le département Biomédical et Santé Publique.

Trois unités ont abrité les différents travaux :

- L'unité de culture des plantes médicinales pour la récolte, le nettoyage, le séchage, et le broyage de la matière première.
- Le laboratoire de chimie et de contrôle de qualité pour l'étude chimique.
- Le laboratoire de pharmaco-toxicologie pour l'étude toxicologique et pharmacologique.

1.2. Le Centre Muraz :

Le centre Muraz est un centre de recherche en santé de l'O.C.C.G.E (Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies).

L'étude biologique (test antiplasmodique) s'est effectuée au laboratoire de parasitologie/ entomologie.

2. Matériel

2.1. Matériel végétal

Ce sont des rameaux feuillés de *Gardenia sokotensis* Hutch récoltés à Kipaliga (localité située à deux kilomètres de Fada N’Gourma) en Juillet 1997 (période pluvieuse).

Ces rameaux feuillés sont nettoyés, séchés à l’abris du soleil et broyés finement. Ensuite on a réalisé à partir de la poudre végétale trois extraits (un extrait hydroalcoolique, un décocté et macéré aqueux).

Ces différents extraits ont été lyophilisés par la suite et conservés à l’abri de la chaleur et de l’humidité.

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Le lombric (*Lombricus terrestris*)

Ce sont des lombrics de poids moyen de $0,7 \text{ g} \pm 0,1$ et qui ont été achetés en Septembre 1997 au barrage n°2 de Ouagadougou. Ce sont des organismes hermaphrodites, possédant un système nerveux, un appareil circulatoire et un appareil reproducteur constitué de cellules sexuelles. Ils se reproduisent par accouplement mais coupés en morceaux, ils reconstituent autant de lombrics entiers. Ils font partie de la classe des oligochètes et de l’embranchement des annélides. Ils se nourrissent de matières organiques et surtout végétales en décomposition (39, 40). Ils sont généralement utilisés comme modèle animal bien qu’ils ne soient pas des protozoaires pour étudier la relation Dose/ Effet du produit testé.

2.2.2. La Souris NMRI.

Il s’agit de souris albinos femelles de souche NMRI de poids corporel d’environ 30 g et de 3 mois environ. Elles ont été achetées au CIRDES (Centre International de Recherche-Développement de l’Elevage en zone Subhumide).

Ces souris sont nourries aux granulés provenant de l’Atelier de Fabrication d’Aliment pour Bétail (A.F.A.B) de Bobo-Dioulasso et sont stabulées dans les mêmes conditions de température (25°) et d’humidité.

2.2.3. Le *Plasmodium berghei*

Le *Plasmodium berghei* fourni par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers au laboratoire de Parasitologie/ Entomologie du Centre Muraz est entretenu sur la souris NMRI.

2.2.4. Les sangs humain et bovin

Le sang humain qu'on a utilisé provenait de la banque de sang du CHNYO de Ouagadougou et a été recueilli sur du citrate de sodium (anticoagulant liquide) dans des tubes à essai.

Le sang bovin provenait de l'abattoir frigorifique de Ouagadougou et a été aussi recueilli sur du citrate de sodium dans un flacon stérile.

2.3. Matériel d'étude phytochimique

2.3.1. Matériel pour extraction

Soxhlet

Solvants (eau distillée, éthanol, chlorure de méthylène)

Rotavapor

Ballons et chauffe-ballon

2.3.2. Matériel pour CCM, spectrophotométrie d'absorption et dosage des composés phénoliques

Plaque de silicagel G₆₀ F₂₅₄ (phase stationnaire)

Solvants de migration S₁ et S₂ (phase mobile)

Lampe UV

Révélateurs

Spectrophotomètre UV/ visible Perkin Elmen modèle 550 S

Verrerie (fioles jaugées, tubes à essai,....)

2.4. Matériel d'étude biologique

2.4.1. Matériel pour la DL_{50} et le pouvoir hémolytique

Seringues à insuline 1ml
Sang bovin
Sang humain
Tubes à hémolyse

2.4.2. Matériel pour le test antiparasitaire sur le lombric

Bols pour amibes en pyrex de volume 200 ml environ
Sable fin stérile
Eprouvettes de 60 ml
Entonnoirs en plastique

2.4.3. Matériel pour le test d'activité antiplasmodique chez la souris NMRI

Seringues à insuline 1 ml
Eau Pour Préparation injectable
Tubes EDTA
Microscope
Lames porte objet
Ciseaux
Bistouri
Coton hydrophile

2.5. Réactifs d'étude phytochimique et biologique

Solution d'ammoniaque à 10 %
Solution de HCl à 2 %
Solution de HCl à 10 %
Solution de KOH 0,5 N dans l'éthanol 95°
Solution d'oxychlorure de zirconium
Solution tampon pH : 7,4
Solution de saponine
Solution isotonique de NaCl à 0,9 %
Solution de carbonate de sodium
Réactif de Carr-Price

Réactif de Molisch
 Réactif de Mayer
 Réactif de Styassny
 Réactif de Dragendorff
 Réactif de Folin Denis
 Liqueur de Fehling
 Méthanol à 50°
 Colorant de Field
 Huile à immersion
 Alcool 70°

3. Méthodes

3-1 Etude phytochimique

3-1-1 Extraction (41)

3.1.1.1. Extraction pour les tests toxico-pharmacologiques

- Décoction

La poudre végétale (125 g) est incorporée à 1,5 l d'eau. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 min. La solution filtrée est ensuite centrifugée à 2000t/ min et lyophilisée.

- Macération

Le macéré est obtenu par le système d'extraction enrichie; 125 g de poudre végétale sont mis dans 1 l d'eau sous agitation continue pendant six heures. On ajoute ensuite 125 g de poudre végétale et 150 ml d'eau qu'on laisse macérer pendant 24 h. Le filtrat obtenu sera ensuite lyophilisé.

- Extraction hydroalcoolique

Il est préparé par épuisement au soxhlet. Pour cela, on a utilisé 250g de poudre végétale. Le solvant utilisé est un mélange éthanol/ eau dans les proportions 7/3 (v/v). La solution filtrée sera ensuite lyophilisée après avoir évaporé l'alcool.

3.1.1.2. Extraction pour le screening phytochimique

Elle consiste en un épuisement successif de la poudre végétale en utilisant des solvants de polarité croissante.

Comme solvants apolaires on peut citer, l'éther de pétrole, l'hexane, etc.

Les solvants moyennement polaires sont le chloroforme, le chlorure de méthylène.

Enfin, comme exemple de solvant polaire, l'éthanol, le méthanol, l'eau.

Cinq extraits ont été réalisés dans le but de voir leur différence de composition.

Parmi ces cinq extraits, trois ont été réalisés par épuisement au soxhlet (extrait au chlorure de méthylène, extrait avec l'éthanol 95° et l'extrait avec l'éthanol 70°) les deux autres par décoction et par infusion.

Ainsi donc, l'extrait au chlorure de méthylène a été obtenu avec 50g de poudre végétale et 500 ml de chlorure de méthylène par épuisement au soxhlet.

Pour chaque extrait éthanolique (éthanol 95° et éthanol 70°) on a utilisé 25g de marc séché issu de l'extraction au chlorure de méthylène pour l'épuisement au soxhlet.

Enfin, les marc issus des extraits éthanoliques serviront pour la décoction (25g de marc bouilli dans 500 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 min) ,et pour l'infusion (25g de marc sont mis dans 500 ml d'eau distillée chaude pendant 15 min. Le décocté et l'infusé obtenus sont ensuite filtrés sur coton hydrophile.

3.1.1.3.Extraction pour le dosage des composés phénoliques

Avant l'extraction proprement dite, on procède au dégraissage de la poudre végétale par le n-hexane au soxhlet. Cette opération de dégraissage est nécessaire d'autant plus que les graisses gênent l'extraction des composés phénoliques .A une prise d'essai de 5g de cette poudre dégraissée, on ajoute 100 ml d'éthanol 80 % qu'on porte à ébullition à reflux pendant 45 min. Après filtration sur papier filtre, le marc est à nouveau épuisé dans les mêmes conditions. L'épuisement est total quand la réaction de caractérisation des polyphénols est négative. Les deux solutions éthanoliques sont réunies et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris avec 100 ml d'éthanol 60°.

3.1.2.Screening phytochimique (41).

Le screening phytochimique d'une plante vise à caractériser les différents groupes chimiques présents dans la drogue. Il a été fait selon la méthode classique décrite par Ciulei et utilisée dans le département du MEPHATRA/PH.

3.1.2.1.Extrait au chlorure de méthylène

3.1.2.1.1.Recherche des huiles essentielles

On prélève 20 ml de l'extrait qu'on fait évaporer au rotavapor. L'odeur agréable du résidu témoigne de la présence d'huiles essentielles .

3.1.2.1.2. Recherche des insaponifiables

On procède d'abord à une saponification . Elle consiste à ajouter 10 ml de KOH 0,5 N au mélange composé du résidu et de 30 ml d'éthanol 95° qu'on chauffe à reflux pendant 1 h 30 min.

Après évaporation de l'éthanol, on ajoute 20 ml d'eau distillée chaude. La solution est ensuite transférée dans une ampoule à décanter dans laquelle on ajoute un solvant moyennement polaire (20 ml de chlorure de méthylène). Après agitation, on laisse décanter la solution et il se forme deux phases :

Une phase dichlorométhylénique en bas qui extrait les insaponifiables : stérols, triterpènes, caroténoïdes.

Une phase aqueuse au-dessus contenant les substances hydrosolubles : sucres réducteurs, hétérosides, polyphénols.

3.1.2.1.3. Recherche des stérols et triterpènes

Une phase dichlorométhylénique (10 ml), est passée sur du Na_2SO_4 anhydre, filtrée et évaporée pour donner un résidu auquel on ajoute 0,5 ml d'anhydride acétique puis 0,5 ml de chlorure de méthylène.

La solution est transférée dans un tube à essai . Après agitation forte on dépose 1 ml de H_2SO_4 concentré au fond du tube à essai. Au contact de ces deux liquides, il se forme un anneau rose brique indiquant la présence de stérols et triterpènes : c'est la réaction de Lieberman Burchards.

3.1.2.1.4. Recherche des caroténoïdes

On prélève 10 ml de la phase dichlorométhylénique qu'on fait évaporer; au résidu obtenu, on ajoute 2 à 3 gouttes de réactif de Carr et Price. Une pigmentation bleue est observée en présence de caroténoïdes.

3.1.2.1.5. Recherche des acides gras

La phase alcaline de la saponification ci-dessus est transférée dans un ballon et acidifiée avec du HCl (pour avoir un pH 3 -4). Cette solution est ensuite filtrée et transférée dans une ampoule à décanter, puis on ajoute 15 ml de chlorure de méthylène. On homogénéise et après décantation, on recueille la phase dichlorométhylénique qu'on passe sur du Na_2SO_4 anhydre. Le filtrat est ensuite évaporé. Si la plante contient des acides gras, le résidu est gras au toucher.

3.1.2.1.6. Recherche des alcaloïdes bases

On prélève 10 ml d'extrait dichlorméthylénique qu'on évapore. Le résidu est dissous dans 1, 5 ml de HCl à 2 %. Agiter avec une tige de verre au bain-marie pour faciliter la dissolution.

La solution obtenue est divisée à volume égal dans 3 tubes à essai.

- T1: tube dans lequel on ajoute 2-3 gouttes de réactif de Mayer. Si on constate un trouble opalescent ou blanc jaunâtre, la plante contient des alcaloïdes
- T2 : tube dans lequel on ajoute quelques gouttes de réactif de Dragendorff; si on observe un trouble brun, la plante contient des alcaloïdes.
- T3 : tube qui sert de témoin pour les observations

3.1.2.1.7. Recherche des aglycones flavoniques : test à la cyanidine

Trois (3) ml d'extrait sont évaporés; le résidu est repris dans 1 à 2 ml de méthanol à 50° au bain-marie.

La solution est transférée dans un tube à essai dans lequel on ajoute du Mg métallique et 4 à 5 gouttes de HCl concentré. Il se forme du H_2 naissant qui réagit avec les aglycones flavoniques pour donner une coloration rouge orange.

3.1.2.1.8. Recherche des émodols

Dans un tube à essai, on introduit 3 ml d'extrait et 1 ml d'ammoniaque à 25 %. Après agitation l'apparition d'une coloration rouge indiquerait la présence d'émodols.

3.1.2.1.9. Recherche des coumarines

Le résidu issu de l'évaporation de 3 ml d'extrait est repris avec 5 ml d'eau distillée chaude. La solution obtenue est transférée dans 2 tubes à essai :

- T1 : tube de référence
- T2 : tube dans lequel on ajoute 0,5 ml d'ammoniaque à 10 %. Le tube est observé sous UV. Si on observe une fluorescence bleue verdâtre ou violette dans le tube T2 la plante contient des coumarines.

3.1.2.2. Extrait avec l'éthanol 95°

3.1.2.2.1. Recherche des tanins

On prend 1 ml d'extrait qu'on dilue avec 2 ml d'eau distillée et auquel on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl_3 à 1 %

- Si la coloration est verte-noire, on a des tanins catéchiques
- Si la coloration est bleue, on a des tanins galliques
- Si la coloration est mixte, on a un mélange des 2 types de tanins

Dans le dernier cas, on procède à la réaction de Styassny. La réaction consiste à prélever 3 ml de ce réactif et 10 ml de l'extrait alcoolique qu'on chauffe à reflux. Ainsi les tanins catéchiques vont précipiter (précipité rouge). Le filtrat sera ensuite neutralisé avec de l'acétate de sodium. Par ajout de FeCl_3 on aura une coloration bleue indiquant la présence de tanins galliques.

3.1.2.2.2. Recherche des alcaloïdes sels

Au résidu de 20 ml d'extrait alcoolique on ajoute 5-10 ml de HCl à 10 %.

De la solution aqueuse, les alcaloïdes passent sous forme de bases à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 10 % (pH : 8-9). Sous forme basique, les alcaloïdes sont solubles dans un milieu moyennement polaire tel que le CH_2Cl_2 . Ils sont ensuite extraits avec le CH_2Cl_2 et évaporés dans une capsule et le résidu est dissout avec 4 ml d'une solution de HCl 2 % à chaud qui est un milieu facilitant la réaction avec le réactif de Mayer et de Dragendorff. Cette solution acide est divisée dans trois tubes à essai

- T1 : tube de référence.
- T2 : tube dans lequel on ajoute 2-3 gouttes de Mayer et si on constate une opalescence, la plante contient des alcaloïdes sels.
- T3 : tube dans lequel on ajoute 2-3 gouttes de Dragendorff et si on obtient une coloration rouge brique avec le réactif de Dragendorff la plante contient des alcaloïdes sels.

3.1.2.2.3. Recherche des composés réducteurs (confère 3.1.2.3.2)

3.1.2.2.4. Hydrolyse acide de l'extrait alcoolique

Elle permet de libérer les composés liés aux sucres : les genines

Elle consiste à chauffer à reflux pendant 30 mn un mélange composé de 25 ml d'extrait alcoolique et 15 ml de HCl à 10 %.

Au cours de l'hydrolyse la solution devient opalescente du fait de la précipitation des aglycones. Après refroidissement, la solution est lavée 3 fois avec 10 ml de CH_2Cl_2 dans une ampoule à décanter. On obtient deux phases :

- une phase organique contenant les anthraquinones, les coumarines, les flavonoïdes, les stéroïdes, les triterpènes.
- une phase aqueuse contenant les oses.

3.1.2.2.5. Recherche des anthraquinones

On concentre 4 ml d'extrait jusqu'à 2 ml. Cette solution est transvasée dans un tube à essai dans lequel l'on ajoute 2 ml d'ammoniaque à 25 %. Après agitation on laisse reposer. La coloration rouge cerise indique la présence d'anthraquinones.

3.1.2.2.6. Recherche des coumarines (confère 3.1.2.1.9)

NB : les coumarines peuvent exister sous forme libre ou sous forme liée aux sucres.

3.1.2.2.7. Recherche des stéroïdes

Le résidu de 10 ml de la phase au CH_2Cl_2 est repris avec 0,5 ml d'anhydride acétique de 10 ml de CH_2Cl_2 . Cette solution est transvasée dans un tube à essai et on

ajoute 2 ml de H_2SO_4 concentré au fond du tube : on observe la coloration rouge à l'interface des deux phases.

3.1.2.2.8. Recherche des aglycones flavoniques : Test à la cyanidine

Trois (3) ml d'extrait est évaporé ; le résidu obtenu est repris avec 1 à 2 ml de méthanol à 50° au bain-marie.

La solution est transférée dans un tube à essai dans laquelle on ajoute du Mg métallique et 4 à 5 gouttes de HCl concentré. Il se forme du H_2 naissant si la coloration devient rouge ou orange, l'extrait contient des aglycones flavoniques.

3.1.2.2.9. Recherche des anthocyanes.

Non colorés, ils deviennent rouges en milieu acide à chaud, violets en milieu neutre, bleus en milieu basique.

3.1.2.3. Extrait aqueux (infusé)

3.1.2.3.1. Recherche des tanins (confère 3.1.2.2.1)

3.1.2.3.2. Recherche des composés réducteurs

A 1 ml d'extrait aqueux on ajoute 0,5 ml de Fehling I et 0,5 ml de Fehling II.

On obtient un précipité rouge brique à froid ou après chauffage.

3.1.2.3.3. Recherche des osides

Le résidu de 2 ml d'extrait est repris avec 2 à 3 gouttes de H_2SO_4 concentré.

L'acide sulfurique transformera les molécules de sucres en furfural ou son dérivé qui en présence de phénols réagit pour donner une coloration rouge ou un peu violacée après addition du réactif de Molish.

3.1.2.3.4. Recherche des saponosides

On réalise un mélange de 2 ml d'extrait avec 2 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Ce mélange est secoué pendant 15 min. L'apparition d'une colonne de mousse

d'au moins 1 cm de hauteur persistant au minimum 15 min indique la présence de saponosides.

3.1.2.3.5. Identification des alcaloïdes sels

Au résidu de 20 ml d'extrait aqueux, on ajoute 5 à 10 ml de HCl 10 %.

De la solution aqueuse, les alcaloïdes passent sous forme de bases à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 10 % (pH : 8-9). Sous forme basique, les alcaloïdes sont solubles dans du CH_2Cl_2 . Ils sont ensuite extraits avec le CH_2Cl_2 (15 ml) dans une ampoule à décanter.

Le CH_2Cl_2 est évaporé dans une capsule et le résidu est dissout avec 4 ml d'une solution de HCl 2 % à chaud qui est un milieu facilitant la réaction de Mayer et de Dragendorff. Cette solution acide est divisée dans trois tubes à essai :

- T1 : tube de référence
- T2 : tube dans lequel on ajoute 2 à 3 gouttes de Mayer; si on constate une opalescence la plante contient des alcaloïdes
- T3 : tube dans lequel on ajoute 2 à 3 gouttes de Dragendorff : si on obtient une coloration rouge brique avec le réactif de Dragendorff, la plante contient des alcaloïdes.

3.1.2.4.Extrait avec l'éthanol 70° (confère tests avec l'extrait à l'éthanol 95°)

3.1.2.5.Décocté aqueux (confère tests avec l'infusé).

3.1.3. Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

La C.C.M est une méthode d'analyse fondée sur une séparation des substances suivant leur affinité entre une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. L'objectif de cette C.C.M est de faire une étude comparée des 3 types d'extraits réalisés. Aussi elle nous permettra d'identifier les différents composés généralement responsables d'activité antipaludique. Il s'agit notamment des composés phénoliques, et des terpènes.

Sur des chromatogrammes (11x 4 cm), sont déposés 5 à 10 ml des extraits à analyser. La ligne de dépôt est à une distance de 1,5 cm de la base et le front du solvant est à 9 cm de la ligne de dépôt. Une fois le dépôt des extraits terminé, la plaque est placée dans une cuve préalablement saturée avec la phase mobile. A la fin de l'opération chromatographique la plaque est séchée à l'air libre ou à forte température après révélation et lue soit à la lumière du jour soit à la lampe UV 254 nm et 365 nm.

Deux systèmes de solvants ont été utilisés :

Solvant S₁ : mélange v/ v

Acétate d'éthyle	: 100
Acide formique	: 11
Acide acétique glacial	: 11
Eau	: 27

Solvant S₂ : mélange v/ v

Toluène	: 9
Acétate d'éthyle	: 1

Les phases mobiles liquides sont les solvants S₁ et S₂.

La phase stationnaire solide est le silicagel G₆₀ F₂₅₄.

Les révélateurs utilisés sont :

- La vanilline chlorhydrique à 1 %
- L'anhydride acétique/ acide sulfurique à 95-97 %
- L'anisaldéhyde sulfurique
- Le KOH alcoolique 5 %

3.1.4.Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

Elle permettra de noter la différence qualitative des spectres des 3 extraits étudiés.

Les spectres d'absorption UV de ces extraits ont été réalisés à partir du lyophilisat en solution très diluée dans de l'eau distillée. La concentration de chaque solution est de 0,1 mg/ ml. Le blanc est de l'eau distillée. La cellule est une cuve d'épaisseur 1 cm.

Le défilement de la longueur d'onde : 120 nm/ min

Le défilement du papier : 30 mm/ min

L'ordonnée max : 2,00

L'ordonnée minimale : 0,00

3.1.5. Eléments de standardisation de la drogue

Détermination de la teneur relative en humidité

Cette teneur est déterminée comme suit :

Deux (2) grammes de poudre végétale dégraissés sont placés à l'étuve à 105° pendant 1 heure. On laisse refroidir au dessiccateur pendant 15 min puis on pèse à nouveau. Le taux d'humidité résiduelle est calculé selon la formule : $(P_0 - P' / P_0) \times 100$

P_0 = poids initial de la poudre végétale

P' = poids final de la poudre végétale

Cette opération est répétée une deuxième fois et on prend la moyenne du taux d'humidité.

Détermination du poids sec de l'extrait hydroalcoolique

Dix (10) ml de d'extrait sont évaporés sous pression réduite. Le résidu pesé permet d'évaluer le poids de l'extrait alcoolique.

Détermination du taux de matière grasse

Vingt cinq (25) grammes de poudre végétale sont dégraissés avec du n-hexane par épuisement au soxhlet. Après évaporation du solvant la poudre est pesée. Le taux de matière grasse est calculé selon la formule : $(P_0 - P' / P_0) \times 100$

P_0 = poids initial de la poudre végétale

P' = poids final de la poudre végétale

Le taux d'humidité et le poids sec de l'extrait hydroalcoolique sont deux paramètres qui entreront dans l'évaluation de la teneur en composés phénoliques de la plante.

3.1.6. Dosage des composés phénoliques (42)

Le dosage de ces composés est intéressant dans la mesure où ce sont des principes chimiques qui ont généralement des propriétés antipaludiques.

Dosage des flavonoïdes totaux

Principe : complexométrie par l'oxychlorure de zirconium.

La teneur en flavonoïdes totaux de la drogue est estimée globalement par formation d'un complexe flavonoïde-zirconium selon Hansel.

Le trajet optique est la lampe au tungstène

La coloration jaune obtenue, stable en milieu tamponné permet d'évaluer par spectrophotométrie UV la teneur en flavonoïdes de l'échantillon par rapport à une solution témoin de rutoside de concentration 0,219 mg/ ml (21,9 mg dans 100 ml d'éthanol 95°).

Pour cela dans une série de tubes à essai, introduire 2 ml de chaque série de dilution (au 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6) de la solution mère de rutoside; additionner 2 ml de tampon acétate, 1 ml de réactif de zirconium 3 %, 2 ml éthanol 95°, et 3 ml d'eau distillée.

A 0,125 ml de l'extrait éthanolique sont ajoutés 2 ml de la solution tampon, 1 ml de la solution de zirconium, 2 ml d'éthanol 95°, et de l'eau distillée QSP (quantité suffisante pour) 10 ml.

Après 15 min, l'absorbance est lue à une longueur d'onde maximale égale à 396 mn.

Dans le tube contenant le blanc, on introduit 2 ml de tampon acétate, 1 ml de réactif de zirconium, 2 ml d'éthanol 95° et de l'eau distillée QSP 10 ml.

Dosage des tanins

Principe : Il s'agit d'une complexométrie par le réactif de Folin Denis. Ce réactif est un mélange constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($24\text{W}_6\text{O}_{19} \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$) et d'acide phosphomolybdique ($20\text{Mo}_8\text{O}_{27} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 51\text{H}_2\text{O}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_6O_{19}) et de molybdène (Mo_8O_{27}) (Swain, 1964). La coloration produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques totaux dans les milieux. La solution témoin d'acide tannique est de concentration 11 mg /ml (solution fille).

Le trajet optique est la lampe au deutérium.

Dans une série de fioles (6 fioles) on introduit respectivement un volume correspondant à une teneur en acide tannique de 2,53; 2,97; 4,4; 5,06; 6,05; 9,02 mg,.

On ajoute ensuite 10 ml de la solution de carbonate de sodium, 5 ml du réactif de Folin Denis et de l'eau distillée QSP 100 ml.

A 0,1 ml de l'extrait éthanolique sont ajoutés 10 ml de la solution de carbonate de sodium, 5 ml du réactif de Folin Denis et de l'eau distillée QSP 100 ml.

Dans la fiole Fo, on introduit 10 ml de la solution de carbonate de sodium, 5 ml du réactif de Folin Denis et de l'eau distillée QSP 100 ml.

Après 15 min, l'absorbance est lue à une longueur d'onde maximale égale à 276 mn.

3.2. Etude toxicologique

3.2.1. Recherche de la DL_{50}

L'étude a été faite selon la méthode consacrée (Trevan, 1927) [43] et ses différentes améliorations successives, Miller et Tainter, 1944 ; Lichtfield et Wilcoxon, 1949 ; Prieur et coll. 1973 ; Descotes, 1985), [44,45, 46, 47] et adaptée par le laboratoire de pharmacologie à l'I.R.S.S. L'objectif est de déterminer l'innocuité de la plante étudiée.

Des souris de souche N.M.R.I âgées de 3 mois et d'un poids moyen de 30g préalablement mises à jeûn pendant 24h sont réparties en 9 lots de 5 souris dont un lot témoin.

On administre en intrapéritonéale des doses 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, et 2500 mg /kg) aux différents lots de souris, le lot témoin recevant de l'eau distillée. L'extrait étudié a été préparé par dissolution du lyophilisât dans de l'eau distillée et le volume maximum à injecter est égal à 0,3 ml.

On redonne à manger aux souris après administration du produit et on observe leur comportement pendant 72h. on dénombre les souris qui sont mortes et on détermine la DL_{50} .

La DL_{50} est la dose qui provoque 50 % de mortalité cumulée chez les souris à partir d'une administration unique.

3.2.2. Détermination du pouvoir hémolytique

Il est intéressant de déterminer le pouvoir hémolytique de la drogue dans la mesure celle-ci sera utilisée dans le traitement des parasitoses sanguines (paludisme).

Paris et Moyse en 1965 (48), déterminent le pouvoir hémolytique des drogues à saponosides comme suit :

- Essai préliminaire

Dans une série de 6 tubes à hémolyse contenant des volumes égaux de culot globulaire obtenu après 3 lavages successifs à l'aide d'une solution NaCl 0,9 %, on introduit des volumes croissants de l'extrait de concentration 50 mg/ ml (0,5; 1; 1,5; 2; 3 ml); on ajoute ensuite 2 ml d'une solution tampon dans chaque tube. Après agitation on laisse reposer 6 heures. Les tubes où il y a hémolyse totale contiennent un liquide rouge limpide.

- Essais proprement dits

Dans une série de 12 tubes contenant des volumes égaux de culot globulaire, on ajoute des volumes croissants de solution de saponine de concentration 100 mg/ ml (0,5; à 6 ml) et 2 ml de solution tampon. Après agitation, on laisse reposer pendant 24 heures. La formation d'un liquide rouge limpide témoigne d'une hémolyse totale.

Le pouvoir hémolytique P est donné par la relation :

$$P = \frac{S \cdot a}{b}$$

a = quantité de saponine en g provoquant une hémolyse totale

b = quantité de drogue en g provoquant une hémolyse totale.

S = pouvoir hémolytique de la saponine ou pouvoir hémolytique de référence, S = 30000

3.3. Etude pharmacologique

3.3.1. Etude de l'activité vermicide sur le lombric

Le lombric a été choisi comme modèle animal pour étudier l'activité vermicide de la plante.

Le test de cytotoxicité sur le lombric constitue une approche de l'activité antiparasitaire en vue d'étudier la relation Dose/ Effet. C'est un protocole qui a été validé à l'I.R.S.S (49).

Pour chaque extrait on prépare des solutions de concentrations de 5, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 mg/ ml des différents extraits à tester. Le volume de la solution nécessaire pour mouiller convenablement le sable est de 60 ml.

Les lombrics préalablement lavés à l'eau distillée sont placés dans des bols contenant 300 g de sable mouillé avec les différentes solutions préparées.

Chaque bol contient 5 lombrics et est recouvert par un entonnoir pour empêcher la fuite des lombrics et le dessèchement du milieu.

A côté de ces lots tests on prépare un lot témoin contenant du sable mouillé avec de l'eau distillée et 5 lombrics également. On observe la toxicité (mort des lombrics) du produit chez des lombrics pendant 72 heures. Les courbes Dose/ Effet des différents extraits ont été réalisées après 48 heures d'observation et à la concentration de 20 mg/ ml. Les DE_{50} des extraits ont été déterminées.

3.3.2. Etude de l'activité antiplasmodique

Le protocole utilisé est le test de 4 jours de Peters en 1965 (28).

Des souris sont mises dans les mêmes conditions d'alimentation et de température de l'environnement pendant toute la durée de l'expérience . Pour chaque dose d'extrait étudié un lot de 5 souris sont testées. Le poids moyen des souris est de 30 g. Chaque souris reçoit approximativement en intrapéritonéale (IP) 10^7 érythrocytes parasités obtenus par dilution du sang parasité de souris infestées. A côté de ces lots tests, un lot contrôle reçoit approximativement en intrapéritonéale 10^7 érythrocytes parasités mais n'est pas traité.

L'extrait hydroalcoolique est un lyophilisât dissout dans de l'eau distillée et le volume maximum à injecter est de 0,4 ml (50).

A J_0 (date de l'infestation), on administre les différentes doses à chaque lot de souris par la voie intrapéritonéale (IP)

A J_1 , J_2 , J_3 , on répète les mêmes doses.

A J₄ (5^e jour), on contrôle le niveau de la parasitémie à l'aide d'un frottis mince coloré au Field et lu à l'immersion au microscope optique. Le critère de protection est la réduction de la parasitémie par rapport au lot contrôle. On calcule ensuite la DE₅₀ et la DE₉₀.

Le pourcentage de globules rouges parasités et le taux de réduction de la parasitémie sont calculés à partir des formules qui suivent sachant que chez la souris on compte 8,54 millions de globules rouges /ml de sang $\pm 0,93$ et 527 globules rouges / champ microscopique $\pm 33,85$.

Pourcentage des globules rouges parasités $P = (\text{Nombre de globules rouges parasités de } x \text{ champs} / \text{Nombre de globules rouges de } x \text{ champs}) * 100$

Pourcentage de réduction de la parasitémie $P' = (P_1 - P_2 / P_1) * 100$

P₁ : pourcentage de globules rouges parasités du lot témoin.

P₂ : pourcentage de globules rouges parasités du lot test.

Un test comparatif a été réalisé avec le chlorhydrate de quinine.

Le mode d'administration est celle quotidienne unique pour l'extrait testé (car meilleure activité par rapport à l'administration quotidienne répétée) et celle quotidienne répétée 2 fois pour le chlorhydrate de quinine (du fait de son élimination rapide).

NB : Le test a été répété cinq fois pour chaque dose étudiée aussi bien pour l'extrait étudié que pour le chlorhydrate de quinine.

Chapitre 3 : RESULTATS D'ETUDE

1 Résultats de l'étude phytochimique

1.1 Screening phytochimique

Le screening réalisé à partir de l'extrait dichlorométhylénique a donné les résultats qui sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Groupes chimiques mis en évidence dans l'extrait au chlorure de méthylène et leurs teneurs.

Groupes chimiques	Résultats
Huiles essentielles	+ + +
Acides gras	+ + +
Emodols	+ +
Caroténoïdes	+
Stérols-triterpènes	+ +
Aglycones flavoniques	+
Coumarines	-
Alcaloïdes bases	-

Légende:

- + + + : réaction fortement positive
- + + : réaction très positive
- + : réaction positive
- : réaction négative
- +/- : traces

Au regard de ce tableau, on note la prédominance des huiles essentielles, des acides gras, des émodols, des stérols et triterpènes.

Le tableau 3 ci-dessous présente les groupes chimiques en fonction du degré alcoolique.

Tableau 3 : Distribution des groupes chimiques en fonction du degré éthanolique

	Groupes chimiques	Résultats avec éthanol 95°	Résultats avec éthanol 70°
Extrait non Hydrolysé	Tanins	+ +	+ + +
	Alcaloïdes sels	-	-
	Composés réducteurs	+	+ +
Extrait hydrolysé	Anthraquinones	+ +	+ +
	Flavonoïdes	+	+ +
	Stéroïdes	+	+
	Anthocyanes	-	+
	Coumarines	-	+

Dans l'extrait éthanolique il y a surtout des tanins, des composés réducteurs, des anthraquinones et des flavonoïdes.

Les groupes chimiques présents dans l'extrait aqueux sont présentés dans le tableau 4

Tableau 4 : Distribution des groupes chimiques dans l'extrait aqueux (infusé et décocté)

Groupes chimiques	Dans l'infusé	Dans le décocté
Tanins	+	+ +
Composés réducteurs	+	+ +
Osides	+	+
Saponosides	+/-	-
Alcaloïdes sels	-	-

Enfin dans l'extrait aqueux on note surtout la prépondérance des tanins et des composés réducteurs.

1.2.Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

Le tableau 5 présentent les résultats de la C.C.M

Tableau 5 : Composés chimiques mis en évidence par la C.C.M

Coloration ou fluorescence avant révélation				Coloration ou fluorescence après révélation			
Composés Chimiques	Lumière du jour	UV 254 nm	UV 365 nm	anisal-déhyde sulfurique	anhydride sulfurique	vanilline chlorhydrique	KOH Alcoolique
Tanins Catéchiques	-	coloration brune	Fluorescence bleue claire	-	-	Coloration rouge	-
Tanins Galliques	-	coloration brune	-	-	fluorescence jaune verdâtre	-	-
Flavonoïdes	-	coloration brune	Fluorescence bleue claire	-	-	-	Coloration bleue verdâtre
Composés Terpéniques			-	(bleu-foncé pour les stéroïdes et violette pour les triterpènes)	-	-	-
Caroténoïdes	Coloration Jaune Orange		Fluorescence bleue claire	-	-	-	-

Légende :

FS : front du solvant

LD : ligne de dépôt

HA1 : extrait hydroalcoolique non déchlorophyllé

HA2 : extrait hydroalcoolique déchlorophyllé

D : décocté

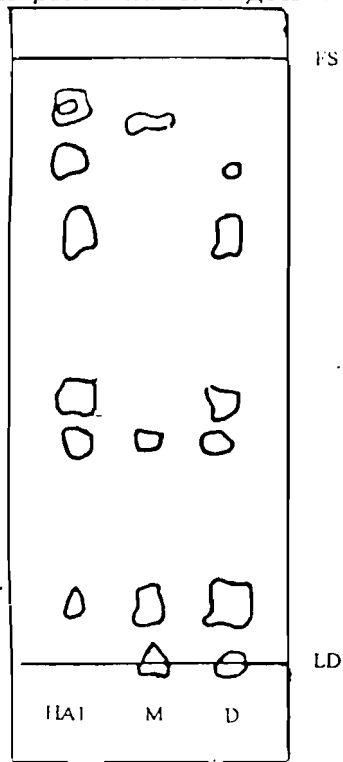
M : macéré

H : fraction hexanique

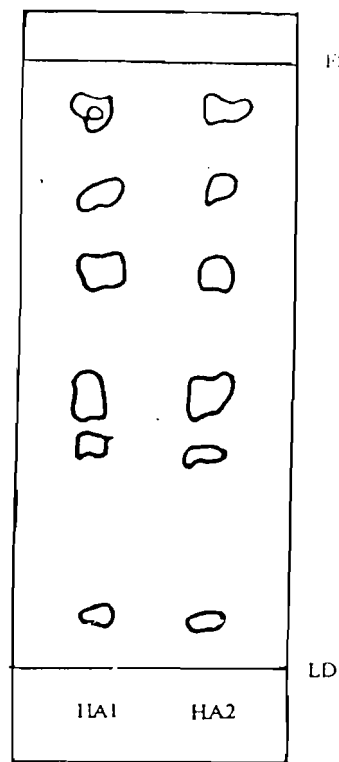
R : rutoside

Rf : référence frontale

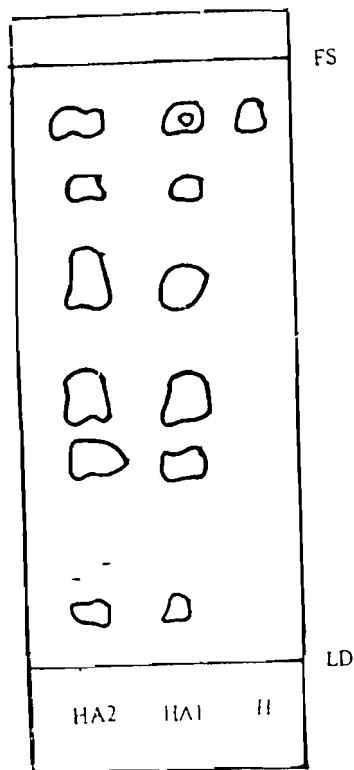
La figure 3a présente les différents chromatogrammes des extraits aqueux et hydroalcoolique dans le système de solvant S₁. Les extraits déposés sont HA1, HA2 M, et D (voir plus haut la légende de ces extraits).



Chromatogramme 1 : CCM dans le solvant S1



Chromatogramme 2 : CCM dans le solvant S1



Chromatogramme 3 : CCM dans le solvant S1

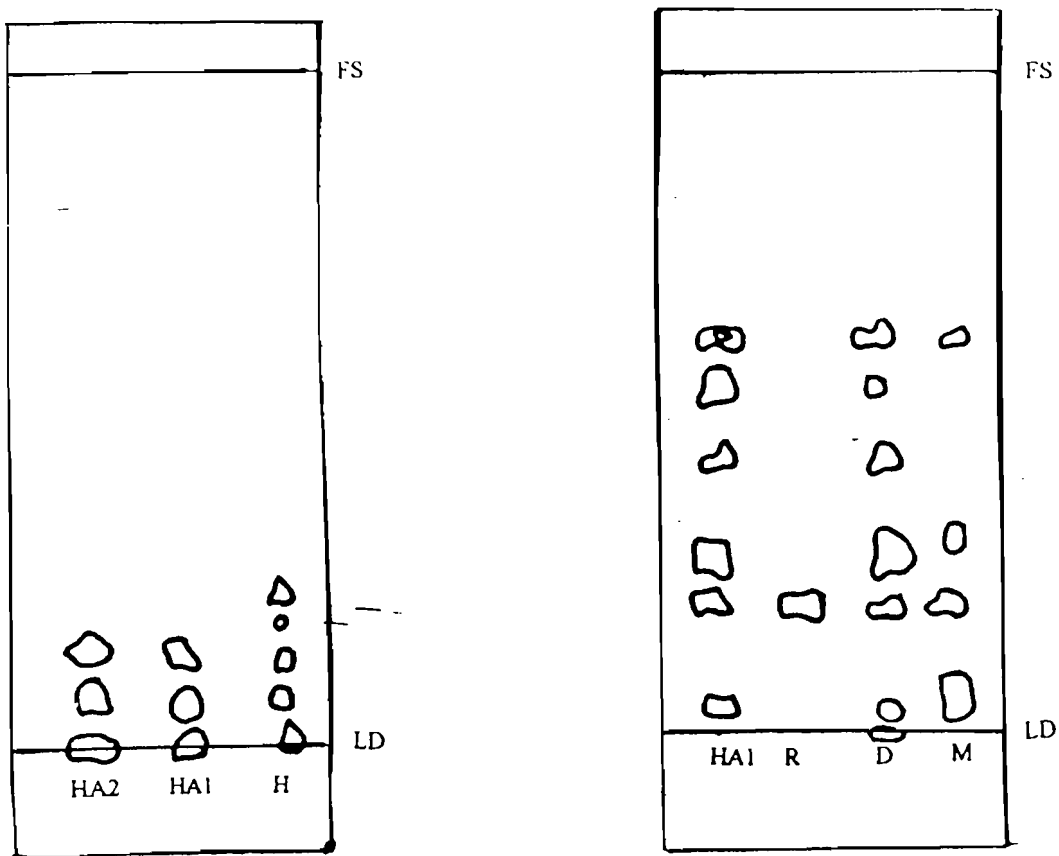
Figure 3a : Copie des chromatogrammes sur couche mince

L'examen du chromatogramme 1 dans le système de solvant S_1 montre que l'extrait non déchlorophyllé présente 7 spots, le décocté 6 et le macéré 4.

Toujours dans S_1 , le chromatogramme 2 montre 7 spots avec l'extrait hydroalcoolique non déchlorophyllé et 6 spots avec l'extrait hydroalcoolique déchlorophyllé. Le spot au $R_f = 0,91$ est vert à la lumière du jour et rouge à l'UV 365 nm

L'examen du chromatogramme 3, dans le système S_1 , révèle qu'avec l'extrait hydroalcoolique non déchlorophyllé, le spot de $R_f = 0,91$ est de la chlorophylle.

La figure 3b présente deux chromatogrammes, l'un dans le solvant S_1 , l'autre dans le solvant S_2 . En plus des extraits précédemment déposés, on a le rutoside et une fraction hexanique.



Chromatogramme 4 : CCM dans le solvant S_2

Chromatogramme 5 : CCM dans le solvant S_1

Figure 3b : Copie des chromatogrammes sur couche mince

Avec la phase hexanique, le spot de $R_f = 0,92$ est un mélange de composés terpéniques à la révélation à l'anisaldéhyde sulfurique (confère chromatogramme 4 dans S₂). Avec l'extrait hydroalcoolique déchlorophyllé, les spots aux $R_f = 0,8$ et $0,64$ sont des tanins catéchiques (coloration rouge après pulvérisation de la vanilline chlorhydrique); le spot au $R_f = 0,45$ est un flavonoïde à la révélation au KOH alcoolique (coloration bleue-verdâtre après chauffage) et par comparaison à un témoin sur le chromatogramme 5 qui est le rutoside; le spot au $R_f = 0,34$ est un tanin gallique (fluorescence jaune- verdâtre après pulvérisation de l'anhydride sulfurique puis chauffage); enfin le spot de $R_f = 0,08$ n'a pas été caractérisé par manque de réactif de révélation disponible mais nous pensons que ce sont des caroténoïdes (coloration jaune orange à la lumière du jour).

Le tableau 6 récapitule les composés chimiques mis en évidence par la CCM.

Tableau 6 : Récapitulatif des composés chimiques mis en évidence par la C.C.M

Rf (cm) des spots révélés	N°du Chromatogramme	Composés chimiques
0,91	2	Chlorophylle
0,92	3	Composés terpéniques
0,8 et 0,64	3	Tanins catéchiques
0,45	3	Flavonoïdes
0,34	3	Tanins galliques
0,08	3	Caroténoïdes

Les résultats de cette C.C.M confirment la présence des tanins, des flavonoïdes, des composés terpéniques mis en évidence par la caractérisation phytochimique.

Toutefois, on note l'absence des tanins dans le macéré et des composés terpéniques dans le décocté aqueux.

1.3.Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

La spectrophotométrie d'absorption UV visible a montré que :
l'extrait HA présente trois bandes d'absorption de longueur d'onde (324, 300, 200 nm).

Le décocté présente trois bandes d'absorption de longueur d'onde (332, 328, 200 nm)

Le macéré présente une bande d'absorption de longueur d'onde 200 nm, les deux autres ne sont pas détectables.

La figure 4 présente les spectres d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

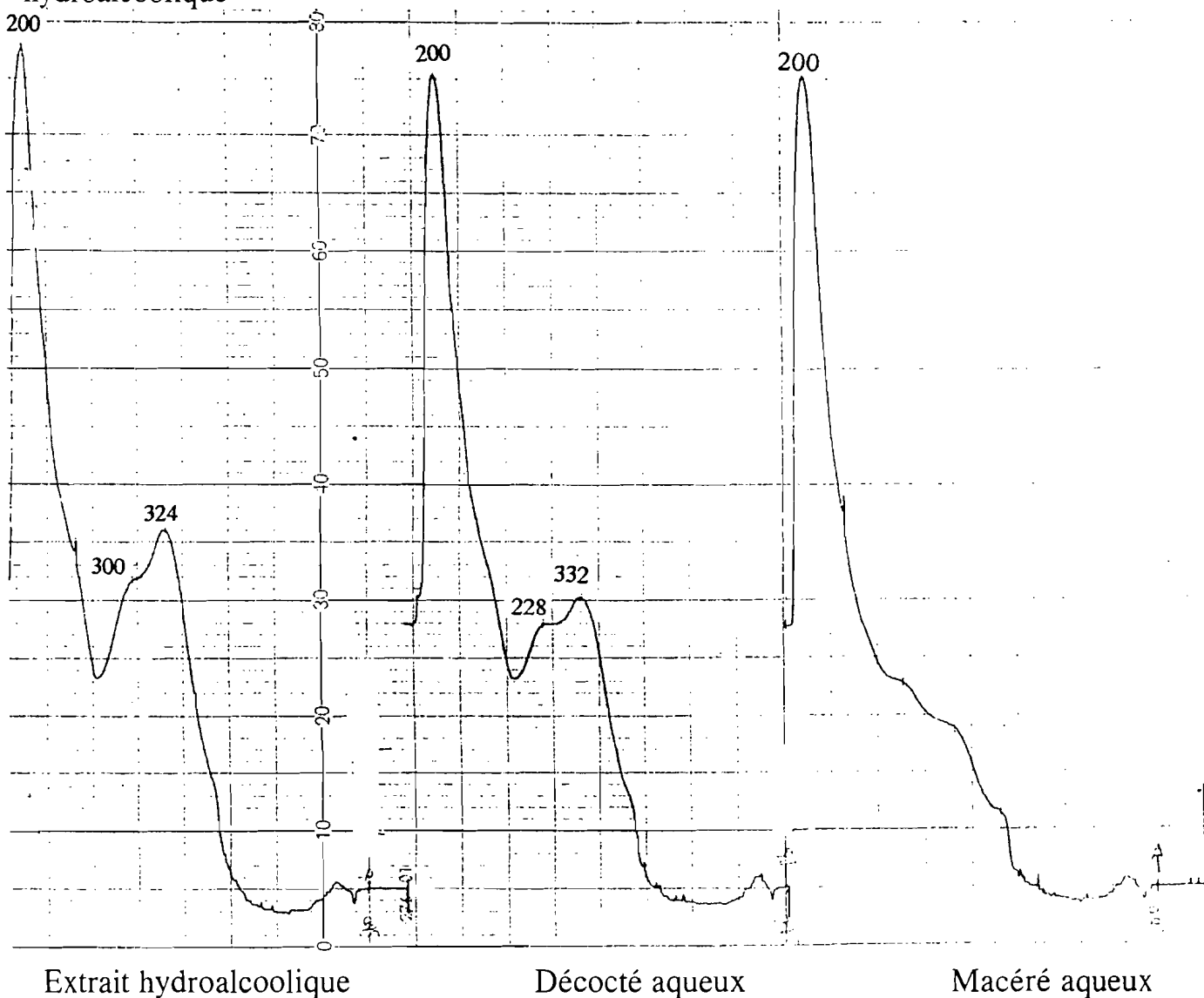


Figure 4 : Spectres d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

1.4. Éléments de standardisation de la drogue

Les caractéristiques de standardisation de la drogue végétale sont :

- La prise d'essai est de **5,00 g**
- La teneur relative en humidité est de **4,73 %**
- Le poids sec de l'extrait éthanolique est de **0,15 g**
- Le taux de matière grasse est de **2,06 %**

1.1.5. Dosage des composés phénoliques

Les résultats du dosage sont présentés sous forme de tableaux 7, 8, 9 et 10 de figures 6 et 7.

1.1.5.1. Dosage des flavonoïdes totaux

Le tableau 7 présente les différentes dilutions qui ont été réalisées à partir d’une solution mère de rutoside de concentration initiale 0,219 mg/ ml (témoin de référence).

Tableau 7 : Tableau des concentrations de rutoside en fonction de la dilution

Tubes	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Dilution		1/2	1/3	1/4	1/5	1/6
Concentration (mg/ ml)	0,219	0,1095	0,073	0,0547	0,0438	0,0365

Ces différentes dilutions vont servir à l’établissement de la courbe étalon.

Dans le tableau 8, sont consignés les absorbances en fonction de la quantité de rutoside.

Tableau 8 : Tableau des absorbances en fonction de la quantité de rutoside

Tubes	To = Blanc	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Quantité de rutoside (mg)	0	0,438	0,219	0,146	0,1094	0,0876	0,073
Tampon acétate (mg)	2	2	2	2	2	2	2
Solution de zirconium à 3 %(ml)	1	1	1	1	1	1	1
Ethanol 95°(ml)	2	2	2	2	2	2	2
Absorbances	0,00	1,240	0,620	0,400	0,310	0,220	0,200

En fonction de la quantité de rutoside, on a une absorbance donnée .

La figure 5 qui suit a été tracée à l'aide du logiciel Excel et présente l'absorbance fonction de la quantité de rutoside.

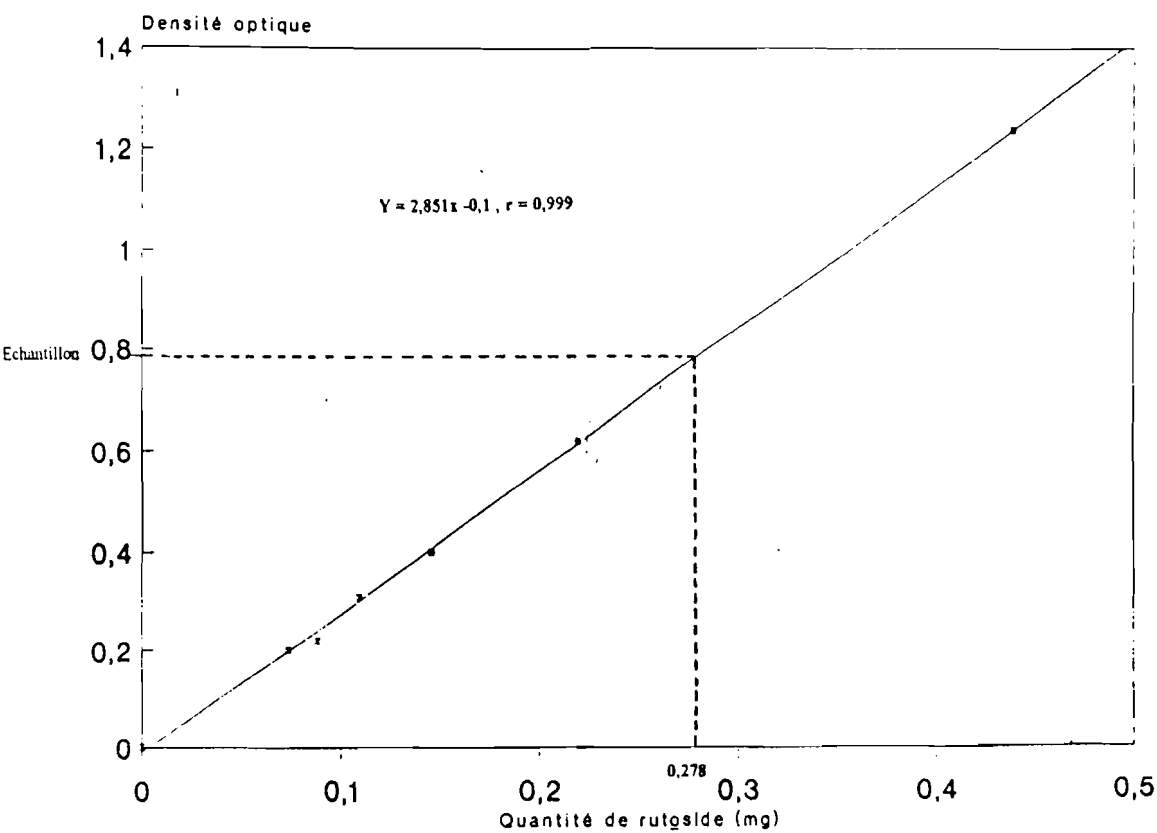


Figure 5 : Courbe d'étalonnage du rutoside

L'absorbance de l'extrait = 0,785 soit une teneur de **0,278 mg** (figure 5)

1-1-4-2-Dosage des tanins

Le tableau 9 présente les absorbances en fonction de la teneur d’acide tannique.

Tableau 9 : Tableau des absorbances en fonction de la teneur en acide tannique

	Fo blanc	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Volume de la Solution fille (ml)	0	0,23	0,27	0,40	0,46	0,55	0,82
Teneur en acide tannique de la solution fille (µg)	0	2,53	2,97	4,4	5,06	6,05	9,02
Solution de carbonate de sodium (ml)	10	10	10	10	10	10	10
Réactif de Folin Denis (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Absorbance	0	0,516	0,620	0,895	1,033	1,240	1,820

En fonction de la teneur en acide tannique, on a une absorbance donnée.

La figure 6 qui suit a été tracée à l'aide du logiciel Excel et présente l'absorbance en fonction de la teneur en acide tannique.

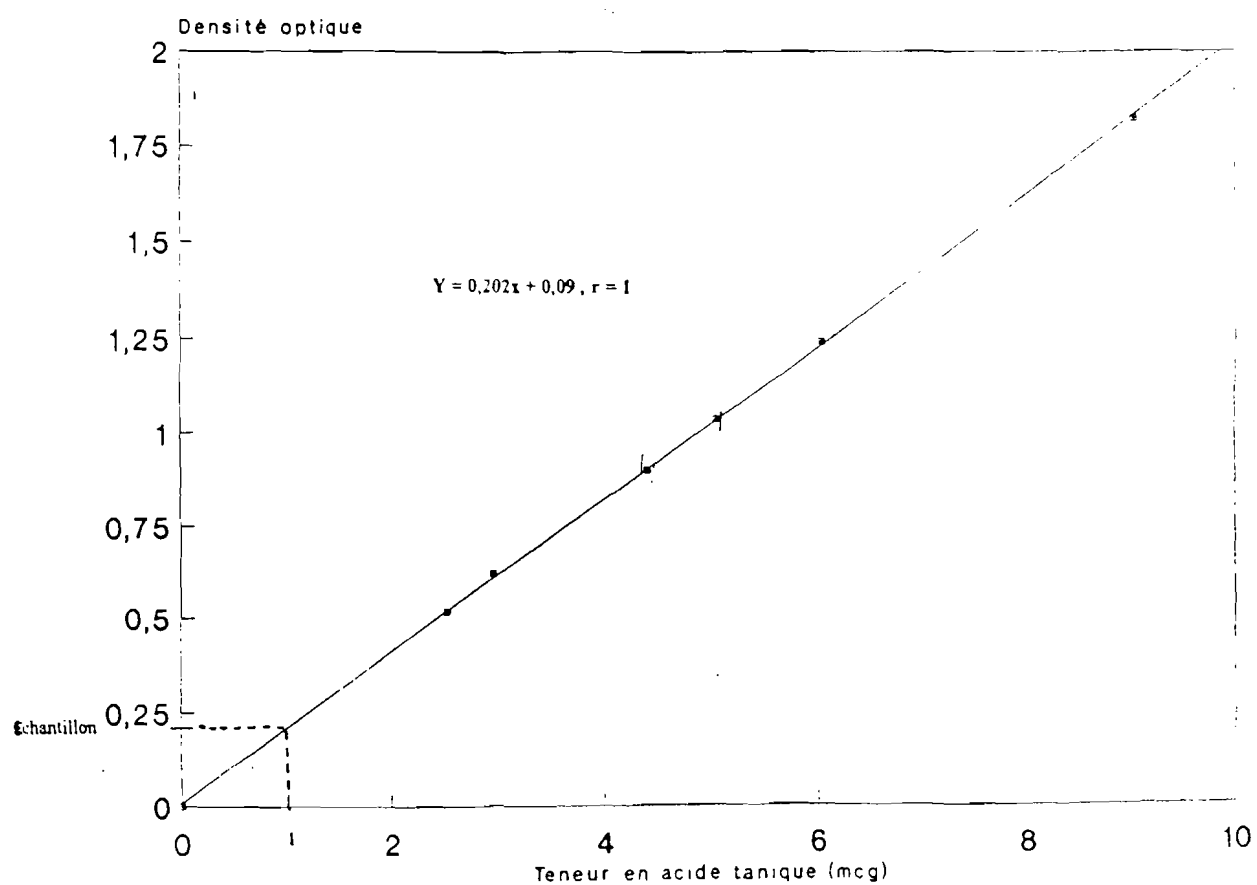


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

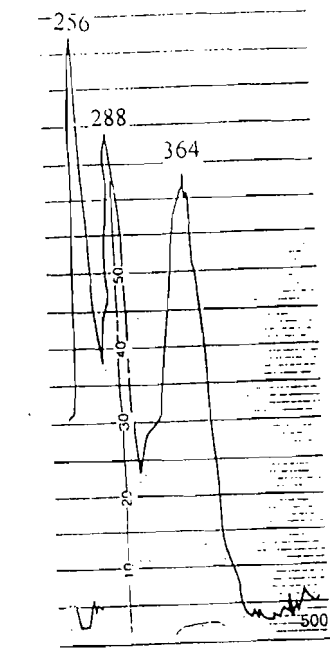
L'absorbance de l'extrait = 0,210 soit une teneur de **1 μg** (figure 6)

Les teneurs en composés phénoliques de la plantes sont consignées dans le tableau 10.

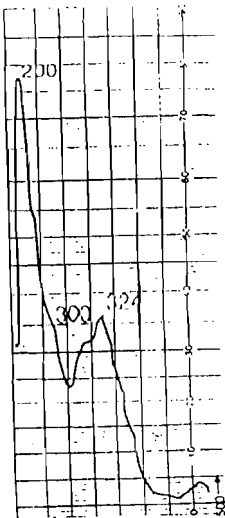
Tableau 10 : Teneur en composés phénoliques de l'extrait sec éthanolique et de la poudre végétale

Composés	Teneur de l'extrait sec éthanolique	Teneur de la poudre végétale anhydre
Flavonoïdes	14,82 %	4,57 %
Tanins	0,2 %	0,06 %

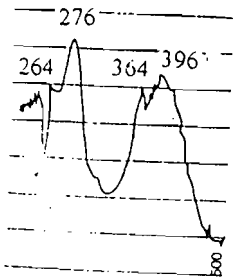
La figure 7a et 7b qui suivent présentent les spectres des témoins (rutoside et acide tannique) et de l'échantillon.



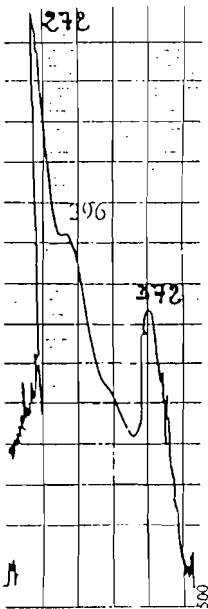
a : rutoside non complexé



b : échantillon non complexé



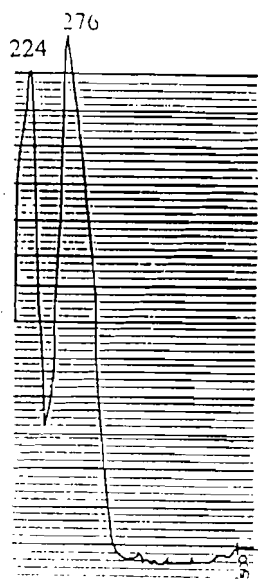
c : rutoside complexé



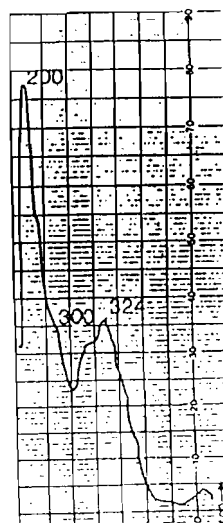
d : échantillon complexé

Figure 7a : Spectres des témoins et de l'échantillon.

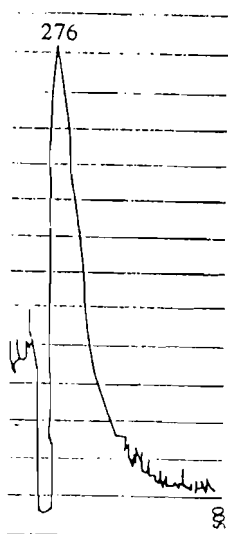
L'échantillon complexé présente un maximum (372 nm) différent de celui du rutoside complexé (396 nm).



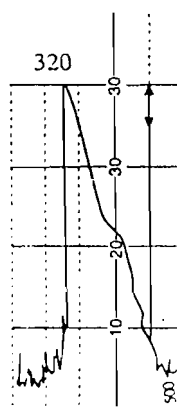
e : acide tannique non complexé



f : échantillon non complexé



e : acide tannique complexé



f : échantillon complexé

Figure 7b : Spectres des témoins et de l'échantillon

On note une différence tant au niveau du nombre de pics qu'au niveau de leurs longueurs d'onde d'absorption maximales. L'échantillon complexé présente une longueur d'onde d'absorption maximale (320 nm) supérieure à celle l'acide tannique complexé (276 nm).

2-Résultats de l'étude toxicologique

2-1-Etude de la Dose létale 50

Aux doses testées de nos différents extraits, nous n'avons noté aucune mort de souris. Ces doses étaient : 10, 50, 100,250, 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 mg/ kg. Du fait d'un problème de solubilisation des lyophilisats, nous ne sommes pas allés au delà de la dose de 2500 mg/ kg.

2-2-Détermination du pouvoir hémolytique

Le tableau 11, présente les résultats de l'action hémolytique des extraits aqueux et hydroalcoolique sur le sang de bœuf.

Tableau 11: Action hémolytique des extraits (décocté, macéré aqueux et extrait hydroalcoolique sur du sang de bovin) en fonction de concentration de l'extrait =100 mg/ ml

Tubes à hémolyse	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Extrait (ml)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Culot globulaire de bœuf (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution tampon (ml)	2	2	2	2	2	2
Quantité de drogue en (g)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Hémolyse	-	-	-	-	-	-

Pour le test préliminaire, il n y a eu hémolyse dans aucun des tubes.

Le tableau 12 indique l'effet hémolytique de la saponine qui a été prise comme référence.

Tableau 12 : Action hémolytique de la saponine sur du sang humain en fonction de la quantité de saponine.

Tubes A hémolyse	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Solution de saponine (ml)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
Culot globulaire (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution tampon (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Quantité de saponine(g)	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,2	0,225	0,25	0,275	0,3
Hémolyse	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Le test à la saponine présente une hémolyse totale à partir du tube 8 c'est à dire à 0,200 g de saponine.

Le tableau 13 ci dessous indiqué présente les résultats de l'action hémolytique de l'extrait sur le sang humain et bovin.

Tableau 13 : Action hémolytique en fonction de la quantité de l'extrait (macéré, décocté, ou extrait hydroalcoolique) sur le sang humain ou sang de bœuf)

Tubes à hémolyse	T1	T2	T3	T4	T5
Extrait (ml)	0,5	1	1,5	2	2,5
Culot globulaire (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution tampon (ml)	2	2	2	2	2
Quantité de drogue (g)	0,250	0,500	0,750	1	1,250
Hémolyse observée avec l'extrait hydroalcoolique	-	-	+	+	+

Une hémolyse est notée avec l'extrait hydroalcoolique à partir du tube 3 c'est à dire à 0,750g de lyophilisat de l'extrait hydroalcoolique aussi bien dans le sang humain

On enregistre un pourcentage de létalité qui varie en fonction la concentration.
Le macéré est aussi inactif à la concentration de 5 mg/ ml et le maximum de létalité est obtenu au bout de 15 heures à la concentration de 60 mg/ ml.

Le tableau 16 présente les résultats de l’effet vermicide de l’extrait hydroalcoolique.

Tableau 16 : Effet de l’extrait hydroalcoolique sur le lombric (pourcentage de létalité)

Temps (h) \ Conc (mg/ml)	5	10	20	24	30	48	55	72
Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	20 %	20 %	20 %	40 %
10	-	-	40 %	40 %	40 %	40 %	40 %	80 %
15	-	20 %	40 %	60 %	100 %	100 %	100 %	100 %
20	40 %	60 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

A partir de ce tableau on note une létalité des lombrics déjà à partir de 5 mg/ ml et le maximum de létalité est obtenu au bout de 30 heures à la concentration de 15 mg/ ml

A partir du tableau 17 nous comparons la cinétique d’effet des différents extraits à la concentration de 20 mg/ ml.

Tableau 17 : Tableau comparatif de la cinétique d’effet à la concentration de 20 mg/ ml

Temps (h) \ Extrait	Délai d’action et % de létalité	Temps d’effet 40 % -50 %	Temps d’effet max (100 %)
Extrait hydroalcoolique	5 heures 40 %	5 à 10 heures	20 heures
Décocté	6 heures 20 %	10 à 15 heures	24 heures
Macéré	48 heures 40 %	48 heures	> 72 heures

Ce tableau ci dessus indique que les délais d’action de l’extrait hydroalcoolique et du décocté sont plus courts que celui du macéré. Au niveau de leurs temps d’effet 50 %, il faut compter 48 heures pour le macéré et entre 5 à 15 heures pour l’extrait hydroalcoolique et du décocté. Le temps d’effet maximum (100% de létalité) est de 20 à 24 heures et plus de 72 heures pour le décocté.

La figure 8 qui suit présente les courbes Dose/ Effet des différents extraits à T_{48} .

Les courbes ont été tracées sur un papier semi-Log

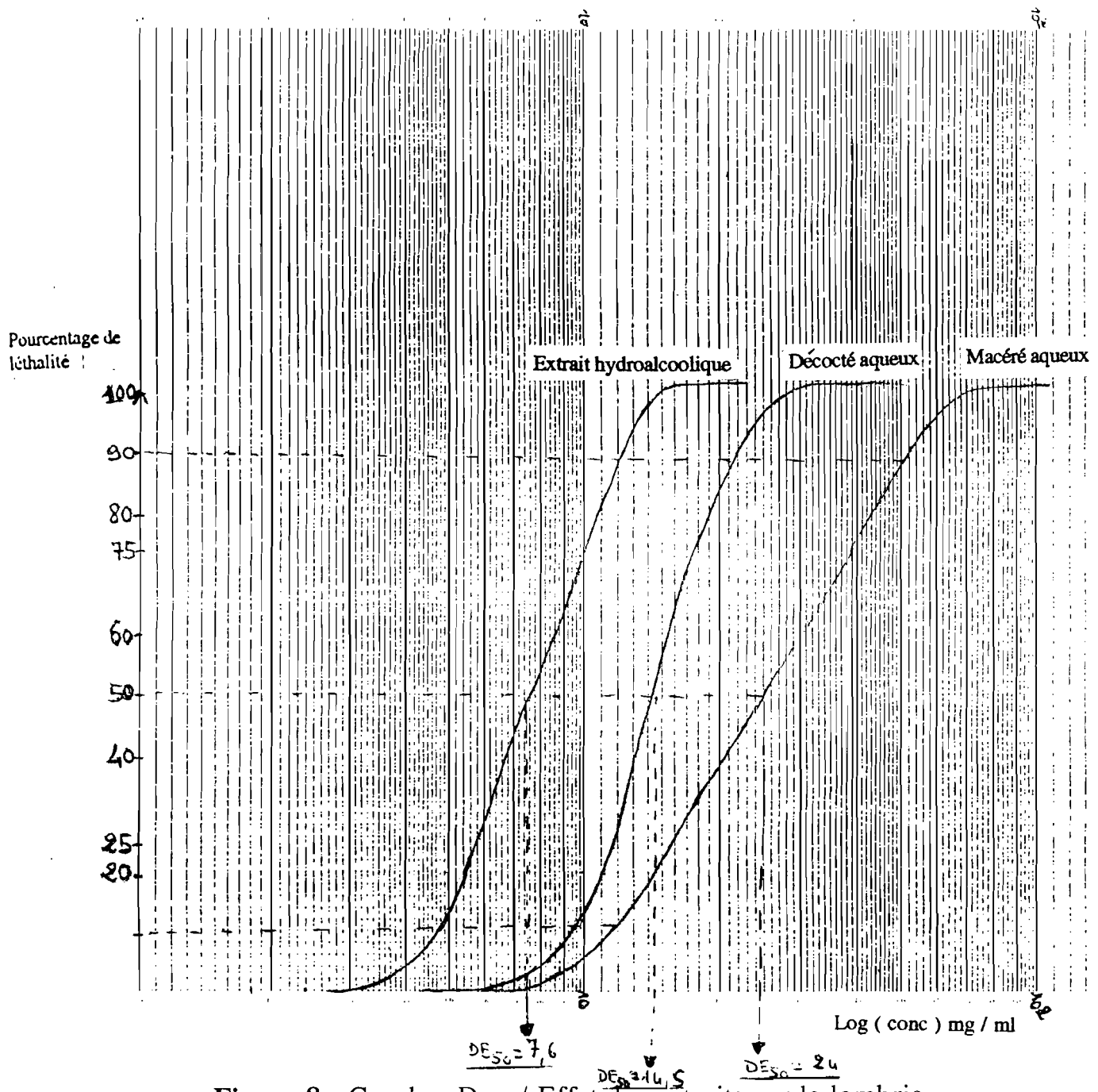


Figure 8 : Courbes Dose/ Effet des extraits sur le lombric

Extrait hydroalcoolique : $DE_{50} = 7,6$ mg/ ml

Décocté aqueux : $DE_{50} = 14,5$ mg/ ml

Macéré aqueux : $DE_{50} = 24$ mg/ ml

La DE_{50} est plus importante pour le macéré. (1440 mg de lyophilisât) par rapport au décocté (840 mg de lyophilisât) et à l'extrait hydroalcoolique (456 mg de lyophilisât).

Chacune des courbes est une sigmoïde dont la partie médiane est une droite confirmée par l'égalité DE_{50}/DE_{10} et DE_{90}/DE_{50} .

La comparaison des rapports DE_{90}/DE_{10} indique que le macéré aqueux est deux fois plus maniable que l'extrait hydroalcoolique et le décocté aqueux.

	Extrait hydroalcoolique	Décocté aqueux	Macéré aqueux
DE_{50}/DE_{10}	1,61	1,52	2,08
DE_{90}/DE_{50}	1,64	1,51	2,08
DE_{90}/DE_{10}	2,65	2,31	4,43

3.2. Etude de l'activité antiplasmodique chez la souris

Le tableau 18 présente le pourcentage de globules rouges parasités en fonction de la dose d'extrait hydroalcoolique administrée.

Tableau 18 : Distribution du % de GRP en fonction de la dose de l'extrait hydroalcoolique

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	% moyen	Ecart- type
Dose administrée (mg /kg)	Pourcentage de globules rouges parasités						
100	10,8 +/-2,7	12,1 +/-1,5	11,5 +/- 1,2	11,1 +/- 1,0	9,8 +/-1,0	11,1	0,8
300	8,4 +/-1,1	11,8 +/-0,3	9,2 +/-1,3	8,5 +/-1,2	8,3 +/-1,2	9,2	1,4
500	6,9 +/-1,0	11,4 +/-0,2	8,2 +/-0,5	8,1 +/-0,6	8,2 +/-0,6	8,6	1,6
800	6,3 +/-0,5	11,2 +/-1,9	8,1 +/-1,1	8,0 +/-2,4	7,8 +/-2,4	8,2	1,6
1000	2,0 +/-0,3	5,1 +/-1,1	3,6 +/-1,3	4,1 +/-0,9	6,4 +/-0,9	4,2	1,6
1500	1,1 +/-0,4	3,1 +/-0,2	1,6 +/-0,5	0,9 +/-0,3	1,2 +/-0,3	1,6	0,8
2000	0,9 +/-0,2	2,1 +/-0,1	1,1 +/-0,4	0,8 +/-0,4	1,0 +/-0,4	1,2	0,5
2500	0,8 +/-0,2	1,8 +/-0,5	0,9 +/-0,2	0,7 +/-0,3	0,8 +/-0,3	1,0	0,4
% de GRP des témoins	14,2 +/-1,3	20,3 +/-2,0	17,4 +/- 0,1	15,4 +/- 2,3	16,2 +/- 1,5	16,7	2,3

Le pourcentage de GRP varie en fonction de la dose administrée. En effet avec les doses plus faibles 100, 300, 500 et 800 mg/ kg de forts pourcentages en GRP mais inférieurs à ceux des témoins.

Le tableau 19 présente le taux de réduction de la parasitémie en fonction la dose administrée.

Tableau 19 : Distribution du Taux de réduction de la parasitémie par rapport aux témoins en fonction des tests et des doses d'extrait administrées

	Test 1	Test 2	Test 3	Test4	Test 5	Taux moyen	Ecart- type
Dose administrée (mg /kg)	Taux de réduction de la parasitémie						
100	23,9	40,4	33,9	27,9	39,5	33,1	7,1
300	40,8	41,9	47,1	44,8	48,8	44,7	3,3
500	51,4	43,8	52,9	47,4	49,4	48,9	3,5
800	55,6	44,8	53,5	48,1	51,9	50,8	4,3
1000	85,9	74,9	79,3	73,4	60,5	74,8	9,4
1500	92,3	84,7	90,8	94,2	92,6	90,9	3,7
2000	93,7	89,7	93,7	94,8	93,9	93,2	1,9
2500	94,4	91,1	94,8	95,5	95,1	94,2	1,7
% de GRP des témoins	14,2	20,3	17,4	15,4	16,2	16,7	2,3

A partir de la dose de 800 mg/ kg d'extrait hydroalcoolique la variation de la réduction de la parasitémie est importante et peu importante à partir de 2000 mg /kg ; mais il existe un rapport entre la dose administrée et le pourcentage de réduction de la parasitémie.

On observe une anémie pendant le prélèvement du sang pour la confection du frottis et une hémolyse lors de la lecture des frottis à partir de la dose de 800 mg/ kg.

Le tableau 20 qui suit présente les % de globules rouges parasités en fonction de dose de chlorhydrate de quinine administrée.

Tableau 20 : Distribution du % de GRP en fonction de la dose de chlorhydrate de quinine

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	% moyen	Ecart-type
Dose administrée (mg /kg)	Pourcentage de globules rouges parasités						
10	7,9 +/- 2,0	11,4 +/- 1,8	8,8 +/- 1,5	11,4 +/- 0,5	7,2 +/- 1,0	9,3	1,9
15	4,5 +/- 0,9	11,3 +/- 1,0	8,3 +/- 0,8	9,3 +/- 2,1	6,8 +/- 1,1	8,0	2,5
25	2,5 +/- 0,5	9,8 +/- 1,5	8,1 +/- 0,8	8,4 +/- 0,4	5,9 +/- 1,9	6,9	2,8
50	2,2 +/- 0,4	3,9 +/- 1,4	2,9 +/- 1,0	2,8 +/- 1,9	2,5 +/- 1,0	2,8	0,6
100	1,1 +/- 0,2	2,5 +/- 0,3	1,2 +/- 0,2	0,9 +/- 0,6	1,1 +/- 0,1	1,4	0,6
200	0,1 +/- 0,1	0,1 +/- 0,0	0,1 +/- 0,0	0,1 +/- 0,0	0,1 +/- 0,0	0,1	0
% de GRP des témoins	14,6 +/- 2,9	20,3 +/- 2,0	17,4 +/- 0,7	15,4 +/- 1,0	14,3 +/- 3,0	16,4	2,4

Le pourcentage de GRP varie en fonction de la dose administrée. En effet avec les doses plus faibles 10 et 15 mg/ kg on enregistre de forts pourcentages en GRP mais inférieurs à ceux des témoins.

Le tableau 21 indique la distribution du taux de réduction en fonction des tests et des doses de chlorhydrate de quinine administrées.

Tableau 21 : Distribution du taux de réduction de la parasitémie par rapport aux témoins en fonction des tests et des doses administrées

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Taux moyen	Ecart-type
Dose administrée (mg /kg)	Taux de réduction de la parasitémie						
10	45,9	43,84	49,4	25,9	49,7	42,9	9,8
15	69,2	44,3	52,3	39,6	52,5	51,58	11,27
25	82,9	51,7	53,5	45,5	58,7	58,46	14,45
50	84,9	80,8	83,3	81,8	82,5	82,66	1,55
100	92,5	87,7	93,1	94,2	92,3	91,96	2,49
200	99,3	99,5	99,4	99,4	99,3	99,38	0,08
% de GRP des témoins	14,6	20,3	17,4	15,4	14,3	16,4	2,49

En analysant la cinétique d’effet du chlorhydrate de quinine, on peut dire que l’inhibition de la croissance des parasites est assez notable à partir de la dose de 50 mg/kg.

Les DE₅₀ et DE₉₀ comparées de l’extrait hydroalcoolique et de la quinine sont représentées dans le tableau 22.

Tableau 22 : Action antiplasmodique comparée de l’extrait étudié et du chlorhydrate de quinine sur *Plasmodium berghei*.

Produit	Dose (mg/ kg) +/- Ecart-type	
	DE ₅₀	DE ₉₀
Extrait hydroalcoolique de <i>Gardenia sokotensis</i>	348,0 +/- 0,1	2631,1 +/- 0,2
Chlorhydrate de quinine	14,8 +/- 0,05	81,3 +/- 0,1

A partir de ce tableau on constate que les doses sont plus élevées pour l’extrait hydroalcoolique que pour le chlorhydrate de quinine.

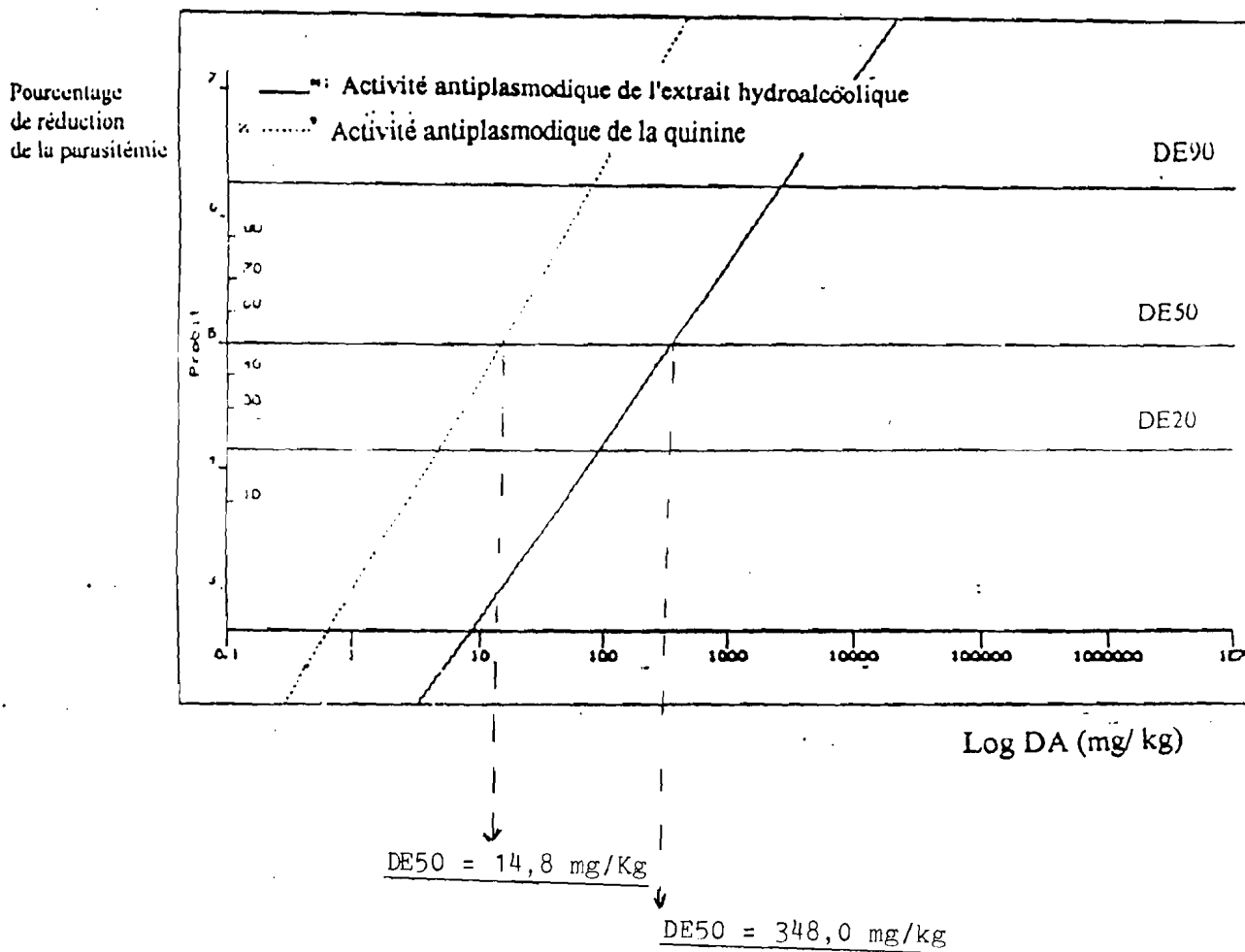


Figure 9 : Activité antiplasmodique de l'extrait hydroalcoolique et du chlorhydrate de quinine

Au regard des DE_{50} on peut dire que le chlorhydrate de quinine est plus active que l'extrait hydroalcoolique.

2. Discussion

2.1. Résultats de l'étude phytochimique

2.1.1. Screening phytochimique

Les groupes chimiques mis en évidence par la caractérisation phytochimique sont en grande partie concordants avec ceux de Coulibaly (16). Cependant une différence est notée au niveau des caroténoïdes et des antraquinones que nous avons trouvés dans la plante et qui étaient absentes lors de son étude. Nous avons aussi noté l'absence d'alcaloïdes sels et de coumarines dans notre échantillon contre des traces dans celui de Coulibaly.

Les différences de composition chimique notées sont dues soit à la différence des deux échantillons (lieu et période de récolte, traitement), soit liées à la méthode du screening. En effet le screening en milieu liquide est une méthode peu fiable car plusieurs substances peuvent réagir avec un même réactif et donner des résultats souvent difficiles à interpréter.

Parmi les différents groupes chimiques révélés dans la plante, nous pouvons citer les composés phénoliques et les terpènes. La littérature indique une activité antiplasmodique de ces principes actifs.

En effet, Nkunya en 1992 (51) a montré l'activité inhibitrice du gossipol (polyphénol) sur le *Plasmodium falciparum*.

Phillipson et Wright en 1991 (52) montrèrent que l'artémétine et la casticine (flavonoïdes) à dose élevée avaient une activité antiplasmodique.

O' Neill et al. en 1987 (53) ont démontré l'activité inhibitrice *in vivo* sur *Plasmodium berghei* par voie orale de quatre quassinoïdes (terpènes) extraits du fruit de *Brucea javanica*. Il en est de même pour les quassinoïdes tels que : ailanthinone, 2'acéthyglaucaurubinone, glaucaurubinone et halocantone, extraits de *Simarouba amara* qui ont révélé une activité antiplasmodique *in vivo* sur *Plasmodium berghei* chez la souris (O' Neill et al 1988) (30).

Carvalho et al. en 1991 (11) ont montré l'activité antiplasmodique de l'artémisinine (sesquiterpène) et ses dérivés (artéméther, artéther, artésunate) sur les

souches résistantes de *Plasmodium falciparum*. De nos jours l'artémisinine et ses dérivés constituent la classe d'antipaludiques d'origine végétale.

2.1.2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a révélé la présence de tanins catéchiques, de tanins galliques, de flavonoïdes, de composés terpéniques et de caroténoïdes dans l'extrait hydroalcoolique. On note l'absence de tanins dans le macéré aqueux et celle des composés terpéniques aussi bien dans le décocté aqueux que dans le macéré aqueux. Ces composés chimiques mis en évidence par la CCM confirment les résultats de la caractérisation phytochimique.

2.1.2. Spectrophotométrie d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

L'analyse qualitative des spectres d'absorption des extraits montre que l'extrait hydroalcoolique et le décocté aqueux présentent les mêmes bandes d'absorption à la différence de leur intensité (les bandes d'absorption de l'extrait hydroalcoolique étant plus intenses que celles du décocté et du macéré aqueux).

Elle permet de dire que l'extrait hydroalcoolique est plus riche en composés que les deux autres extraits (décocté et macéré aqueux).

2.1.3. Dosage des composés phénoliques

Au cours du dosage des composés phénoliques nous avons noté une différence tant au niveau du nombre de pics d'absorption qu'au niveau de leur intensité. En effet la longueur d'onde maximum d'absorption du rutoside complexé est de 396 nm et de 372 nm pour l'échantillon complexé. Cette longueur d'onde maximum est de 276 nm pour l'acide tannique complexé contre 320 nm pour l'échantillon complexé.

Ceci s'explique par le fait que les témoins sont des produits purs tandis que l'échantillon est constitué d'un mélange de composés.

Ce dosage des composés phénoliques par complexométrie a permis d'avoir une estimation de la teneur de l'extrait éthanolique en flavonoïde et tanins qui était respectivement égale à 14,82 % et 0,2 %. Cette teneur est de 4,57 % (flavonoïdes) et

0,06 % (tanins) pour la poudre végétale anhydre. Il ressort donc que l'extrait éthanolique est plus concentré que la poudre végétale.

2.2. Résultats de l'étude toxicologique

2.2.1. Résultat de la recherche de la dose létale 50

Aux doses testées de nos différents extraits, nous n'avons noté aucune mort de souris.

Nous nous sommes limités à la dose de 2500 mg/ kg pour des raisons de solubilité de nos lyophilisats.

Au vu des résultats obtenus avec notre échantillon nous pouvons dire que les différents extraits de la plante (décocté et macéré aqueux et extrait hydroalcoolique) sont pratiquement atoxiques pour la souris par voie intrapéritonéale.

2.2.2. Résultat de la détermination du pouvoir hémolytique

Le décocté et le macéré aqueux ne se sont pas avérés hémolytiques. Par contre, avec l'extrait hydroalcoolique, nous avons observé une hémolyse *in vitro* à la concentration de 500 mg/ ml correspondant à une quantité de lyophilisât de 750 mg.

A la même concentration une hémolyse *in vivo* serait possible si la drogue (extrait hydroalcoolique) est résorbée ou directement déposée dans le torrent circulatoire.

2.3. Résultats de l'étude pharmacologique

2.3.1. Résultat de l'étude de l'activité vermicide sur le lombric

D'après les résultats des tableaux 14, 15, et 16 nous constatons que la concentration de 5 mg/ ml (correspondant à 300 mg de lyophilisât) n'a aucune activité sur le lombric pour ce qui est du décocté et du macéré aqueux. Cependant la même concentration entraîne une létalité de 20 %, 30 heures après le contact des lombrics avec l'extrait hydroalcoolique. L'extrait hydroalcoolique est plus actif que le combantrin^R, sa DE₅₀ étant de 7,6 mg/ ml par rapport à 12,9 mg/ ml pour le combantrin^R.

Si nous nous référons au test d'hémolyse nous pouvons tirer le constat suivant :

La létalité des lombrics ne serait pas due à une hémolyse car d'une part nous n'observons pas d'hémolyse ni avec le décocté, ni avec le macéré, et d'autre part, l'hémolyse observée avec l'extrait hydroalcoolique n'a lieu qu'à la concentration de 500 mg/ ml, concentration que nous n'avons pas atteinte car déjà à 20 mg/ ml de l'extrait hydroalcoolique nous observons le maximum de létalité des lombrics. C'est dire donc que l'hémolyse observée ne peut en aucun cas justifier la létalité des lombrics; elle ne peut être due qu'à l'activité cytotoxique de la drogue.

Si l'on compare le rapport DE_{90}/DE_{10} , le macéré est 2 fois plus maniable que l'extrait hydroalcoolique et le décocté en cas d'utilisation chez l'homme.

Cependant, l'extrait hydroalcoolique s'est montré plus actif que les autres extraits. L'extrait hydroalcoolique serait de pénétration plus rapide au niveau du lombric du fait de son délai d'action court. Par contre la pénétration du macéré au niveau du lombric est pratiquement difficile d'où son délai d'action prolongé.

On pourrait dire que la différence d'activité de ces trois extraits est due à la différence de leur composition chimique d'une part, (chromatogramme 1 de la figure 3a) et de la différence de la concentration des principes chimiques d'autre part. (confère figure 4 présentant les spectres d'absorption des 3 extraits).

Tout ceci a justifié le choix de l'extrait hydroalcoolique pour l'évaluation de l'activité antiplasmodique chez la souris infestée par *Plasmodium berghei*

2.3.2 Résultat de l'étude de l'activité antiplasmodique

Au vu des pourcentages de réduction de la parasitémie en fonction de la dose administrée, nous constatons un effet dose/ dépendant de l'extrait hydroalcoolique. A partir de la dose de 2000 mg/ kg, l'effet a une tendance à la stabilisation c'est à dire que la variation de la réduction de la parasitémie est peu notable.

L'hémolyse constatée chez les souris traitées aux doses fortes pourrait s'expliquer par une éventuelle biotransformation du produit dans l'organisme de la souris le rendant plus hémolytique; cet état de fait nécessite que l'on tienne compte de la dose hémolytique en cas d'utilisation en thérapeutique humaine.

Le test comparatif avec le chlorhydrate de quinine montre que la DE_{50} de l'extrait étudié est environ 23 fois plus grande que cette dernière. Cette dose est seulement 5 fois plus grande que les résultats obtenus par Porter et coll. en 1975 (31) mais qui ont utilisé la quinine par voie sous cutanée.

Nous constatons que l'extrait étudié est beaucoup moins actif que le chlorhydrate de quinine bien que nous ayons utilisé la même voie d'administration.

Par rapport à d'autres types d'extraits de plantes étudiées, nous pouvons classer l'extrait de *Gardenia sokotensis* dans la gamme des plantes ayant une activité *in vivo* sur le *Plasmodium berghei* chez la souris si nous tenons compte seulement de la DE_{50} .

En effet, sont considérés comme actifs les extraits utilisés à une dose comprise entre 5 mg/ kg et 500 mg/ kg. Au delà de 500 mg/ kg, l'extrait est considéré comme ayant une faible activité.

A propos de l'activité de notre extrait, un certain nombre de paramètres tels que les différents constituants chimiques de l'extrait préparé (pouvant développer un antagonisme), la voie d'administration, peuvent influencer l'activité antiplasmodique.

La différence d'activité de l'extrait et du chlorhydrate de quinine pourrait être due aux facteurs suivants :

1/ La différence de composition chimique.

Le chlorhydrate de quinine est un produit pur et dont la formulation galénique présente des caractéristiques favorisant une efficacité optimale. De plus c'est un schizontocide à action rapide connue.

L'extrait hydroalcoolique est un mélange de composés dont l'activité peut être modifiée ou diminuée par l'interaction des différents constituants.

2/ Le mode d'administration (administration quotidienne répétée deux fois pour le chlorhydrate de quinine et administration quotidienne unique pour l'extrait hydroalcoolique).

3/ Le métabolisme de l'hôte (souris) et de sa réponse immune. On pourrait citer l'exemple du proguanil que les rongeurs sont incapables de métaboliser en sa forme active qu'est le cycloguanil.

4/ Les propriétés astringentes des tanins qui réduisent la perméabilité des muqueuses et des vaisseaux. En effet, à travers les membranes des cellules animales, Bruneton J. signale que les tanins réduisent la perméabilité des muqueuses et des vaisseaux (54).

V- / CONCLUSION ET SUGGESTIONS

De notre étude sur l'activité antiplasmodique de *Gardenia sokotensis* Hutch sur les souris infestées par le *Plasmodium berghei*, il ressort que:

Au plan phytochimique, la plante a fait l'objet de peu d'investigations. Nous avons confirmé les résultats chimiques des travaux de Coulibaly. La plupart des groupes chimiques majeurs que sont les composés phénoliques et les terpènes ont été confirmés par CCM et le dosage des composés phénoliques a montré que l'extrait éthanolique est plus riche que la plante.

Au plan toxicologique, *Gardenia sokotensis* Hutch est pratiquement non toxique par voie intrapéritonéale chez la souris lors du test de toxicité générale mais provoque une hémolyse sur le sang de bœuf ou le sang humain avec l'extrait hydroalcoolique à 750 mg de drogue ; donc son utilisation thérapeutique clinique chez l'homme devrait tenir compte de son effet hémolytique.

Au plan pharmacologique, l'étude de l'activité sur le lombric a permis de voir la relation entre la dose administrée et l'effet du produit. L'extrait hydroalcoolique présente une activité antiparasitaire sur le lombric. L'étude de l'activité antiplasmodique a mis en évidence une faible activité de l'extrait par rapport à la quinine (la DE_{50} de l'extrait étant égale à 23 fois celle de la quinine). Par rapport aux données de la littérature l'extrait hydroalcoolique de *Gardenia sokotensis* Hutch est active sur *Plasmodium berghei*. Ces résultats constituent des pré-requis devant orienter vers des études *in vivo* des plantes antipaludiques au Burkina Faso.

Au terme de cette étude nous suggérons les études complémentaires suivantes :

Au niveau de la chimie de la plante : on pourrait envisager l'étude *in vivo* de l'activité antiplasmodique avec d'autres extraits (extrait organique par exemple) afin de comparer l'effet avec celui de l'extrait étudié. Le problème de solubilisation pourrait être résolu par le principe de la solubilisation micellaire c'est-à-dire la solubilisation par des solvants appropriés. Mieux, il faudrait envisager un fractionnement des composés chimiques par des procédés de séparations chromatographiques en vue d'en étudier l'activité antiplasmodique des principes chimiques isolés de la plante.

Au niveau de la toxicité de la plante : prévoir une évaluation des paramètres hématologiques (taux d'hémoglobine, numération des globules rouges et des globules blancs) chez la souris.

Au niveau de l'activité antiplasmodique : envisager une association de l'extrait avec un antipaludique de synthèse (chloroquine par exemple) dans le but de voir la variation de l'activité (synergie ou antagonisme).

VI - / REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-O.M.S

Mise en oeuvre du plan d'action pour la lutte contre le paludisme 1993-2000

Série des Rapports techniques, 1983, 839 : 1-2.

2-O.M.S

Lutte contre les vecteurs du paludisme et autres maladies transmises par les moustiques.

Série des Rapports techniques, 1995, 857 : 1-2

3- Norman R., Olayiwola Akéréle., Audrey S B., Djaja D. S., et Zhengang Guo

Place des plantes médicinales dans la thérapeutique.

Bulletin de l'OMS 1986, 64 (2) : 159-175

4- Adjanohoun E. J., Ahyi MR.A., Aké Assi L., et al.

Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger

Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, A.C.C.T

Paris, 2è édition, 1985 : p 250

5- Adjanohoun E J., Adjakidje U., et Ahyi M R.A., et al.

Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin

Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, A.C.C.T

Paris, 1989 : p 895

6- Aké Assi.L., Guinko. S.

Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest.

Edition Roche, 1991, Suisse : p 151

7- Dakuyo Z.

Le Paludisme en Afrique

Vie et Santé 1992, n° 10

8- Traoré D.

Médecine et Magies Africaines

Présence Africaine, A.C.C.T, 1983 : p 569

9- Guinko S., Zoungrana I., Guenda w., Tamini Z., Millogo Rasolodimbi. J.

Apithérapie : quelques usages médicaux du miel dans l'Ouest du Burkina Faso

Bull-Med-Trad-Pharm., 1989 vol 3, n°2, : 111-115

10- Adjanohoun E.J., Ahyi M. R. A., Aké.Assi. L., et al.

Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo

Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, A.C.C.T

Paris, 1986 : p 671

11- Carvalho L.H., Brandao M.G., Santos Filho. D., Lopes J.L., Krettli A.U.

Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in

Plasmodium berghei infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture.

Brazilian.J.Med.Biol.Res. 1991, 24 (11).: 1113-1123

12- Gessler M.C., Nknuya M.H., Mwasumbi L. B., Heinrich M., Tanner M.

Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity

Acta Tropica, 1994) Feb, 56 (1) : 65-77

13- Connelly M.P., Fabiano E., Patel I. H., Kinyanjui S. M., Mberu E. K., Watkins W. M.

Antimalarial activity in crude extracts of Malawian medicinal plants.

Trop Med Parasitology. (1996) Dec, 90 (6) : 597-602.

14- Presber W., Bärbel H., Hilda Hernandez-Alvarez., Herrmann D., and Brendel. C.

Inhibition of the growth of Plasmodium falciparum and Plasmodium berghei *in vitro* by an extract of Cochlospermum angolense (Welw)

Acta Tropica. 1992, 50 : 331-338

15- Carvalho L. H., et Krettli A. U.

Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined Molecules.

Mem.Inst.Oswaldo.Cruz, Rio de Janeiro, 1991, vol.86.Suppl 11, : 181-184

16- Coulibaly. M.

Contribution à l'étude *in vitro* de l'activité antiplasmodique d'extraits de quelques plantes médicinales du Burkina Faso : activité antiparasitaire des extraits comparée avec quelques médicaments de synthèse.

Thèse de 3è cycle en Science 1996, Faculté des Sciences et Techniques Ouaga p 156

17- Bryskier A., Labro M. T.

Classification des antipaludiques modernes in Paludisme et Médicaments

Edition Arnette SA, 1988 : 35-162

18- Garnham. P. C. C.

Malaria in its various vertebrate hosts.

Malaria, *in* Kreier J P (ed) 1988, vol.1, publ. Academic New-York : 95-144

19- Mazier D.

Epidémiologie. Cycle et Biologie des Plasmodiums, *in* Paludisme
M Danis et J Mouchet. Elipses/ Aupelf ed., 1991 : 25-33

20- Danis M.

Symptomatologie du paludisme, *in* Paludisme
M. Danis et J. Mouchet. Elipses/ Aupelf ed., 1991 : 87-99

21- Ambroise P. Thomas.

Epidémiologie. Physiopathologie-Réceptivité-Résistance innée, *in* Paludisme
M. Danis et J. Mouchet. Elipses/ Aupelf ed., 1991 : 60-65

22- Charmot G., Wolff M.

Protocoles thérapeutiques. Traitements, *in* Paludisme
M. Danis et J. Mouchet. Elipses/ Aupelf ed., 1991 : 168-178

23- Gentilini M.

Introduction. Généralités, *in* Paludisme
M. Danis et J. Mouchet. Elipses/ Aupelf ed., 1991 : 13-16

24- Le Bras J., Basco L.K.

Traitement. Chimiorésistance des plasmodiums, *in* Paludisme.
M. Danis et J. Mouchet. Elipses/ Aupelf ed 1991 : 146

25- Guiguemdé T. R., G Bary A. R., Ouedraogo J. B., Douchet C. J. J., Baudon D.

Le Centre de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme (CRCP/ OCCGE).
Actes de la conférence internationale sur les stratégies de lutte contre le paludisme.
Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, 11-14 avril 1988 : p 240

26- Guiguemdé T. R., G Bary A. R., Ouédraogo J. B.

Rapport final du projet C.E.E-TSD- M-399/ OMS-TDR, 85017 : Surveillance de la
Chimiorésistance des souches de *Plasmodium falciparum* en Afrique de l'Ouest :
Transfert de la technologie aux équipes nationales.
Doc.Tech.OCCGE.1991; 9 : 805-891

27- Guiguemdé T. R., Aouba A., Ouédraogo J. B., Lamizana L.

Ten- years surveillance of drug resistant malaria in Burkina Faso. (1982-1991)
Am.J.Trop.Med.Hyg. 1994 (50) : 699-704

28- Cox F.E.G.

Major animal models in Malaria research : Malaria parasites of rodents. Species, *in* Malaria : Principles and Practice of Malariology. Edited by W H Wernsdorfer Sir J Mc Gregor. vol 2 : Churchill Livingstone. 1988 : 1506-1527

29- Mehlhorn Heinz.

Parasitology in Focus Facts and Trends.
Springer. Verlag Berlin Heidelberg . New York
London-Paris-Tokyo. 1988 : 210-212

30- O' Neill M.J., Phillipson J.D.

Plants as sources of antimalarial drugs, Part6 : Activity of *Simarouba amara* fruits
J.Ethnopharmacology. 1988 Feb, 22 (2) : 183-190

31- Porter M., et Peters W.

The chemotherapy of rodent malaria, XXV : Antimalarial activity of WR 122, 455 (a 9-phenanthrenemethanol) *in vivo* and *in vitro*.
Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1975, vol. 70, N° 3 : p 262

32- Duvigneaud P., Van. Bockstal L.

Systématique des Plantes Supérieures Volume 2 : Dicotylédones
Presses Universitaires de Bruxelles. 1973-1975 : p 289

33- Aké Assi. L., Guinko S.

Plants used in traditional medicine in West Africa
Illustration Amon Aya Lazare. Edition Roche. Basel, Switzerland. 1963 : p 43

34- Denis Malgras R. P.

Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes
Edition Karthala 22-25 bl Arago 75013 Paris A.C.C.T 13 Quai André Citroën. 75015
1992 : p 397

35- Dalziel J. M., et Hutchinson J.

The useful Plants of West Tropical Africa
Crown Agents for Oversea Government. London, 1937 : p 399

36- Aubreville A.

Flore forestière soudano-guinéenne.
Société d'Édition Géographiques Maritimes et Coloniales Paris 1950 : 265-460

37- Boro K.

Quelques Rubiacées utilisés en médecine traditionnelle
 Rapports Bibliographiques de 5^e année.
 Faculté de Pharmacie, Université de Paris V, 1978 : p 30

38- Hakizamungu. E., Weri. M

L'usage des plantes médicinales dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle Rwandaise.
Bull.Med.Trad.Pharm., 1988, vol.2, n°1, : 11-17

39- Grassé P.P., Doumenc D.

Zoologie. Tome I : Invertébrés. Paris : Masson. 1995 ; 5 : 112-119

40- Aron M., Grassé P.P.

Précis de biologie animale. 8^e édition ; Paris : Masson et Compagnie. 1966 : 878-887

41- Ioan Ciulei.

Methodologies for analysis of vegetable drug. Practical Manuals on Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic plants.
 Edited by the Ministry of Chemical Industry , Bucharest, 1982 : 16-27

42- Sourabié S.

Contribution à l'étude chimique de *Nauclea latifolia* sm et *Holarrhéna floribunda* (G.Don) Dur et Schinz : Plantes de la pharmacopée Burkinabè préconisées dans le traitement des gastro-entérites infantiles.
Mémoire de DEA en Biologie Appliquée 1996, FAST, Ouaga. 2 : p 96

43- Trevan A. J.W.

The error of determination of toxicity.
Proc. Royal. Soc., 1927, 101B : 483-514.

44- Miller B L.C., Tainter M.T.

Estimation of LD50 and its error by log-probit graph paper
Proc. Soc. Biol; Exp. Med, 1944, 57 : 261-264

45- Lichtfield C J.T., Wilcoxon F.A.

A simplified method of evaluation of doses-effects experiments
J. Pharmacol. Exp.Ther 1949, 95 : 99-113.

46- Prieur D D. J., et coll.

Procedures of preclinical toxicologic evaluation of cancer chemotherapeutic agents: protocols of the laboratory VI Mouse LD50 study cancer.
Chemother.-Reports Part3, 1973, (4) : 8.

47- Descotes E J.

La DL50 en 1984.

Lyon Pharmaceutique, 1985, 36 (4) : 189-191

48- Paris R. C., Moyse H.

Matière médicale Tome I

Paris R. C., Moyse H., ed. Masson. 1965, 64 : 258

49- Sanfo A., Ouédraogo S., Somé N., Guissou I. P.

Etude de l'effet antihelminthique des amandes de *Balanites aegyptiaca* (L) Del (Balanitaceae).

Burkina Médical 1996, Vol 1, N°1 : 32-37

50- Mc. Led L. J.

Pharmacological experiments on intact preparation by the staff of the Department of Pharmacology. University of Undinburgh. Churchill Livingstone, Undinburgh. London, and New-York 1970 : p 9

51- Nkunya M. H. H.

Progress in the search for antimalarials

Napreca Addis University, Addis Abebe 1992 : p 35

52- David Phillipson. J. Wright C. W.

Antiprotozoal agents from plants sources.

Planta. Med. 1991, 57, Suppl, Issue 1 : 57-58

53- O'Neill M J., Bray D.H., Boardman P Chan K.L., Phillipson J.D., Warshurst D.C., Peters W.

Plants as sources of antimalarial drugs, Part4 : Activity of *Brucea javanica* fruits against Chloroquino resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro* and against *Plasmodium berghei* *in vivo*.

J. Nat. Prod. 1987 Jan, 50 (1) : 41-48.

54- Bruneton J.

Eléments de Phytochimie et Pharmacognosie.

Paris, Technique et Documentation Lavoisier, 1987 : p 584

ANNEXES

Liste des figures

Figure 1 : Cycle évolutif des plasmodies (19)

Figure 2 : *Gardenia sokotensis HUTCH* (photo prise à Fada au Burkina Faso)

Figure 3a : Copie des chromatogrammes sur couche mince

Figure 3b : Copie des chromatogrammes sur couche mince

Figure 4 : Spectres d'absorption des extraits aqueux et hydroalcoolique

Figure 5 : Courbe d'étalonnage du rutoside

Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

Figure 7a : Spectres des témoins et de l'échantillon

Figure 7b : Spectres des témoins et de l'échantillon

Figure 8 : courbe Dose/ Effet des extraits sur le lombric

Figure 9 : Activité antiplasmodique de l'extrait hydroalcoolique et du chlorhydrate de quinine

Liste des tableaux

Tableau 1 : Posologie moyenne de schizontocides exprimés en base

Tableau 2 : Groupes chimiques mis en évidence dans l'extrait au chlorure de méthylène et leur teneur

Tableau 3 : Distribution des groupes chimiques mis en évidence en fonction du degré alcoolique

Tableau 4 : Distribution des groupes chimiques mis en évidence dans l'extrait aqueux (infusé et décocté)

Tableau 5 : Composés chimiques mis en évidence par la C.C.M

Tableau 6 : Récapitulatif des composés chimiques mis en évidence par la C.C.M

Tableau 7 : Tableau des concentrations de rutoside en fonction de la dilution

Tableau 8 : Tableau des absorbances en fonction de la quantité de rutoside

Tableau 9 : Tableau des absorbances en fonction de la quantité d'acide tannique

Tableau 10 : Teneur en composés phénoliques de l'extrait éthanolique de la poudre végétale

Tableau 11 : Action hémolytique des extraits (décocté, macéré aqueux et extrait hydroalcoolique sur du sang de bovin) en fonction de leurs concentrations

Tableau 12 : Action hémolytique de la saponine sur du sang bovin en fonction de sa quantité

Tableau 13 : Action hémolytique en fonction de la quantité de l'extrait (macéré, décocté; ou extrait hydroalcoolique) sur les sangs humain bovin

Tableau 14 : Effet du décocté sur le lombric (pourcentage de létalité)

Tableau 15 : Effet du macéré sur le lombric (pourcentage de létalité)

Tableau 16 : Effet de l'extrait hydroalcoolique sur le lombric (pourcentage de létalité)

Tableau 17 : Tableau comparatif de la cinétique d'effet à la concentration de 20 mg/ml

Tableau 18 : Distribution du pourcentage de GRP en fonction de la dose de l'extrait hydroalcoolique

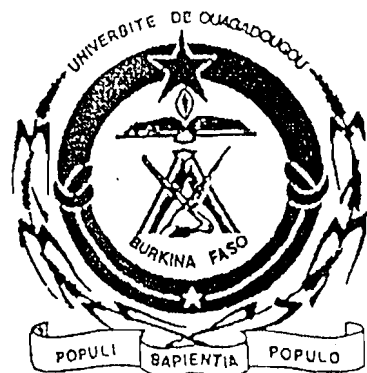
Tableau 19 : Taux de réduction de la parasitémie par rapport aux témoins en fonction des tests et des doses d'extrait administrées

Tableau 20 : Distribution du pourcentage de GRP en fonction de la dose du chlorhydrate de quinine

Tableau 21 : Taux de réduction de la parasitémie par rapport aux témoins en fonction des tests et des doses de chlorhydrate de quinine administrées

Tableau 22 : Action antiplasmodique comparée de l'extrait étudié et du chlorhydrate de quinine sur *Plasmodium berghei*.

UNIVERSITÉ DE OUAGADOUGOU



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA SANTÉ

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

TITRE

In vivo STUDY OF THE ANTIPLASMODIAL ACTIVITY OF THE
HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Gardenia sokotensis* HUTCH (RUBIACEAE)
IN MOUSE INFESTED BY *Plasmodium berghei*.

SUMMARY

Gardenia sokotensis Hutch (Rubiaceae), a small tree of 1 to 2 meters height, is a soudano-zambezian species that grows on hills and rocky areas. Alone or in association with other plants, it is used in malaria treatment, access of febrile diseases and gastro-enteritis.

The main goal of our study was to evaluate the antiplasmodial activity of an hydroalcoholic extract of *Gardenia sokotensis* in mouse infested by *Plasmodium berghei*.

- The phytochemical screening of the extract revealed tannins, flavonoïds, anthracenoids, coumarins, terpenoïds, most of which have been put in evidence by the thin layer chromatographic (TLC).
 - The dosage of phenol compounds produced 14,82 % of flavonoïds and 0,2 % of tannins in the hydroalcoholic extract. Concerning the anhydrous vegetal powder of the plant, the content was 4,57 % (flavonoïds) and 0,06 % (tannins).
 - As for the general toxicity, this plant is practically atoxic in mice by intraperitoneal route. However, it provoked an hemolysis on human and bovine red blood cells with 750 mg of lyophilised hydroalcoholic extract (500mg/ ml).
 - For the pharmacology, this plant is active against lumbricus with an effect Dose/ Dependent. An antiplasmodial activity has been noted, but however weak, in comparison with bichlohydrate of quinine (standard); the effect dose 50 is 348,0 mg/ kg as compared with bichlorhydrate of quinine that is 14,8 mg/ kg.
 - Further studies are to be conducted on the toxicity. In addition, for the chemical study, a fractioning of the chemical compounds must be considered in order to study their activity. Also, for the antiplasmodial activity, an association of the extract with a synthetic antimalarial must be done to see the variation of the activity.
- **Key words** : Malaria, *Gardenia sokotensis*, antiplasmodial activity in vivo, *Plasmodium berghei*
- **Author** : OUEDRAOGO Adissa P.O Box : 01 BP 4055 Ouagadougou 01 Burkina Faso.

Lu et approuvé
Le Directeur de Thèse

Lu et approuvé
Le Président de Jury

Le Doyen

TITRE

ETUDE *in vivo* DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE DE L'EXTRAIT
HYDROALCOOLIQUE DE *Gardenia sokotensis* HUTCH (RUBIACEAE) CHEZ LA
SOURIS INFESTEE PAR *Plasmodium berghei*

RESUME

Gardenia sokotensis hutch (Rubiaceae), arbrisseau haut de 1 à 2 m est une espèce soudano-Zambézienne qui pousse sur les collines et stations rocheuses. Cette plante seule ou en association avec d'autres plantes, est utilisée dans le paludisme, dans l'accès fébrile et dans les gastro-entérites. Notre étude avait pour objectif principal d'évaluer l'activité antiplasmodique de l'extrait hydroalcoolique chez la souris infestée par *Plasmodium berghei*.

- Le screening phytochimique de cet extrait a révélé des tanins, des flavonoïdes, des anthacénosides, des coumarines, des composés terpéniques dont la plupart ont été mis en évidence par la chromatographie sur couche mince (CCM).

- Le dosage des composés phénoliques a donné 14,82 % de flavonoïdes et 0,2 % de tanins dans l'extrait hydroalcoolique. Par rapport à la poudre végétale anhydre de la plante les teneurs étaient de 4,57 % (flavonoïdes) et 0,06 % (tanins).

- Au plan de la toxicité générale, la plante est pratiquement non toxique chez la souris par voie intrapéritonéale. Cependant elle provoquait une hémolyse *in vitro* sur les hématies humaines et bovines à 750 mg d'extrait hydroalcoolique lyophilisé (soit une concentration de 500 mg/ ml).

- Au plan pharmacologique la plante est active sur le lombric avec un effet Dose/ Dose-Dependant. Une activité antiplasmodique a été notée, activité cependant faible par rapport au chlorhydrate de quinine (antiplasmodique de référence); la dose effet 50 est de 348,0 mg/ kg par rapport chlorhydrate de quinine qui est de 14.8 mg/ kg.

- Des études approfondies devront être menées sur la toxicité. De plus au niveau de l'étude chimique, il faut prévoir un fractionnement des composés chimiques afin d'en étudier leur activité. Au niveau de l'activité antiplasmodique il faudrait envisager une association de l'extrait avec un antipaludique de synthèse dans le but de voir la variation de l'activité.

- **Mots clés** : Paludisme, *Gardenia sokotensis*, activité antiplasmodique *in vivo*, *Plasmodium berghei*

- **Adresse de l'auteur** : OUEDRAOGO Adissa 01 BP 4055 Ouagadougou 01. Burkina Faso