

BURKINA - FASO

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

FACULTE DES SCIENCES DE LA SANTE (F.S.S.)

Section Pharmacie

Année universitaire 1999 -2000

Thèse N°15

**CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION DES PRINCIPES
ANTIPLASMODIQUES DE *COCHLOSPERMUM*
TINCTORIUM A. RICH (COCHLOSPERMACEAE)**

THESE :

Présentée et soutenue publiquement le 30 Septembre 2000
Pour l'obtention du grade de **Docteur en PHARMACIE**
(Diplôme d'Etat)

Par

GUIGUEMDE Wendyam Armand
Né le 30 Juillet 1974 à Bordeaux (France)

JURY

Directeur de thèse :
Pr I. Pierre GUISSOU

Président : Pr Blaise KOUDOGBO

Codirecteurs :
Dr Jean Baptiste NIKIEMA
Dr Halidou TINTO

Membres : Dr K. Lady TRAORE
: Dr Jean Bosco OUEDRAOGO
: Dr Jean Baptiste NIKIEMA

LISTE DU PERSONNEL

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

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

LISTE DU PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen	Pr. Ag. Daniel Piga ILBOUDO
Vice-Doyen Chargé des Affaires Académiques (VDA)	Pr. Ag. Adama LENGANI
Vice-Doyen à la Recherche et à la vulgarisation (VDR)	Pr. Ag. Issa SANOU
Directeur de la Section Pharmacie	Pr. I. Pierre GUISSOU
Directeur des Stages de la Section Médecine	Pr. Ag. Y. Joseph DRABO
Directeur de la Section Technicien Supérieur de Laboratoire	Pr. Blaise KOUDOGBO
Directeur des Stages de la Section de Pharmacie	Dr Rasmata OUEDRAOGO/ TRAORE
Coordonnateur C.E.S. de Chirurgie	Pr. Amadou SANOU
Secrétaire Principal	Mr Fakouo TRAORE
Chef de Service Administratif et Financier (CSAF)	Mme Christine NARE
Conservateur de la Bibliothèque	Mr Salif YADA
Chef de la Scolarité	Mme Kadi ZERBO
Secrétaire du Doyen	Mme Mariam DICKO
Secrétaire du VDA	Mme Hakiéta KABRE
Secrétaire du VDR	Mme Edwige BONKIAN
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 OUIMINGA	Anatomie organogenèse et chirurgie
Hilaire TIENDREBEOGO (in memoriam)	Sémiologie et Pathologie médicales
Tinga Robert GUIGUEMDE	Parasitologie
Bobilwindé Robert SOUDRE	Anatomie-Pathologique
Amadou SANOU	Chirurgie Générale et Digestive
Innocent Pierre GUISSOU	Pharmacologie & Toxicologie
Bibiane KONE	Gynécologie - Obstétrique
Alphonse SAWADOGO	Pédiatrie

Professeurs associés

Blaise KOUDOGBO	Toxicologie
-----------------	-------------

Maîtres de Conférence Agrégés

Julien YILBOUDO	Orthopédie -Traumatologie
Kongoré Raphaël OUEDRAOGO	Chirurgie -Traumatologie
François René TALL	Pédiatrie
Jean KABORE	Neurologie
Joseph Y. DRABO	Médecine Interne/Endocrinologie
Blaise SONDO	Santé Publique
Jean LANKOANDE	Gynécologie-Obstétrique
Issa SANOU	Pédiatrie
Ludovic KAM	Pédiatrie
Adama LENGANI	Néphrologie

Oumar TRAORE N°1

Orthopédie-Traumatologie

Kampadilemba OUOBA

Oto Rhino Laryngologie

Piga Daniel ILBOUDO

Gastro-entérologie

Albert WANDAOGO

Chirurgie Pédiatrique

Maîtres-Assistants

Lady Kadidiatou TRAORE

Parasitologie

Mamadou SAWADOGO

Biochimie

Si Simon TRAORE

Chirurgie

Adama TRAORE

Dermatologie Vénérologie

Abdoulaye TRAORE

Santé Publique

Daman SANO

Chirurgie Générale

Arouna OUEDRAOGO

Psychiatrie

Joachim SANOU

Anesthésie-Réanimation

Patrice ZABSONRE

Cardiologie

Jean Gabriel OUANGO

Psychiatrie

Georges KI-ZERBO

Maladies Infectieuses

Théophile L. TAPSOBA

Biophysique - Médecine Nucléaire

Rabiou CISSE

Radiologie

Blami DAO

Gynécologie Obstétrique

Alain BOUGOUMA

Gastro-Entérologie

Boubacar TOURE

Gynéco-Obstétrique

Michel AKOTIONGA

Gynécologie-Obstétrique

Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE

Bactério-Virologie

Alain ZOUBGA

Pneumologie

Boubacar NACRO

Pédiatrie

Abel KABRE

Neuro-Chirurgie

Assistants Chefs de clinique

Timothée KAMBOU	Chirurgie
T.Christian SANOU (in memoriam)	Oto Rhino Laryngologie
Doro SERME (in memoriam)	Cardiologie
Hamadé OUEDRAOGO	Anesthésie-Réanimation physiologie
Alexis ROUAMBA	Anesthésie-Réanimation physiologie
M. Théophile COMPAORE	Chirurgie
Y. Abel BAMOUNI	Radiologie
Maïmouna DAO /OUATTARA	ORL
André K. SAMANDOULOGOU	Cardiologie
Nicole Marie KYELEM / ZABRE	Maladies Infectieuses
Rigobert THIOMBIANO	Maladies Infectieuses
Raphaël DAKOURE	Anatomie-Chirurgie

Assistants

Robert O. ZOUNGRANA	Physiologie
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
Vincent OUEDRAOGO	Médecine du Travail
Antoinette TRAORE / BELEM	Pédiatrie

Christophe S. DA	Chirurgie
Kapouné KARFO	Psychiatrie
Ali NIAKARA	Cardiologie
Nazinigouba OUEDRAOGO	Réanimation
Aurélien Jean SANON	Chirurgie
Claudine LOUGUE / SORGHO	Radiologie
Diarra YE / OUATTARA	Pédiatrie
Bernabé ZANGO	Chirurgie
Jean Baptiste NIKIEMA	Pharmacognosie
Blandine THIEBA	Gynécologie-Obstétrique
Abdel Karim SERME	Gastro-Entérologie
Moussa BAMBARA	Gynécologie-Obstétrique
Fatou BARRO	Dermatologie
Olga LOMPO	Anatomie Pathologique
Appolinaire SAWADOGO	Gastro-Entérologie
Martial OUEDRAOGO	Pneumo-Phtisiologie
Moussa KERE	Santé Publique
Laurent OUEDRAOGO	Santé Publique
Dieudonné OUEDRAOGO	Chirurgie maxilo-faciale

Assistants Biologistes des Hôpitaux

Lassina SANGARE	Bactério-Virologie
Idrissa SANOU	Bactério-Virologie
Harouna SANON	Hématologie/Immunologie
Issa SOME	Chimie Analytique

Assistants associés

Caroline BRIQUET

Pharmacologie et Toxicologie

Valérie MURAILLE

Galénique et Chimie-Analytique

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 memoriam)

Chimie

Patoin Albert OUEDRAOGO

Zoologie

Maîtres de Conférences

Boukary LEGMA

Chimie-Physique Générale

François ZOUGMORE

Physique

Philippe SANKARA

Cryptogamie-Phytopharmacie

Adama SABA

Chimie Organique

W. GUENDA

Zoologie

Gustave KABRE

Biologie Générale

Odile Nacoulma

Biochimie

Maitres-Assistants

Léonide TRAORE

Biologie Cellulaire

Makido B. OUEDRAOGO

Génétique

Jeanne MILLOGO

T.P. Biologie-Végétale

Assistants

Apolinaire BAYALA (in memoriam)

Physiologie

Raymond BELEMTOUGOURI

T.P. Biologie Cellulaire

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

Aimé OUEDRAOGO

Ophtalmologie

R. Joseph KABORE

Gynécologie-Obstétrique

Dr Bruno ELOLA

Anesthésie-Réanimation

Dr Michel SOMBIE	Planification
Dr Nicole PARQUET	Dermatologie
M. GUILLERET	Hydrologie
M. DAHOU (in mémoires)	Hydrologie
Dr Bréhima DIAWARA	Bromatologie
Dr Annette OUEDRAOGO	Stomatologie
Dr Adama THIOMBIANO	Législation Pharmaceutique
Dr Sidiki TRAORE	Galénique
Mr Mamadou DIALLO	Anglais
Dr Badioré OUATTARA	Galénique
Dr Alassane SICKO	Anatomie
Dr Aline TIENDREBEOGO	Chimie Analytique et contrôle médic.
Dr Noël ZAGRE	Nutrition
Dr TRAORE / COULIBALY Maminata	Biochimie
Dr Seydou SOURABIE	Pharmacognosie

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)

Pr M. BADIANE

Chimie Thérapeutique (Dakar)

Pr B. FAYE

Pharmacologie (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 (Grenoble/France)

Pr. M. BOIRON

Physiologie

Mission de l'Université Libre de Bruxelles (ULB)

Pr. Marc VAN DAMME

Chimie Analytique-Biophysique

Pr. Viviane MOES

Galénique

Pr. Jean Neve

ChimieThérapeutique

DEDICACES

A PAPA et à MAMAN

Je vous dédie ce travail. Simplement Merci

A mes frères

Que ce travail vous inspire une voie ambitieuse

A Papi, mes oncles et tantes

A Haoua, Djénéba

Pour avoir toujours été à mes côtés

A Didier, Seydou, Adama

**A mes amis : Antoine, Baker, Bernard, Cyrille, Damien,
Ludovic, Pascal**

En témoignage de notre amitié

**A Lambert, Raoussoun, Mahamoudou, Karim, Moktar,
Jacques**

Pour les belles années passées ensemble

A Désiré, Ismaël, Evance

Pour le chemin parcouru pendant la thèse

**A mes promotionnaires de fac, du Collège de Tounouma et
du C.E.G. de Bobo-Dioulasso.**

A NOS MAÎTRES ET JUGES

A notre Maître et Président de jury

Professeur Blaise KOUDOGBO
Enseignant de toxicologie

C'est un honneur et un grand privilège pour nous le fait d'accepter de présider le jury de notre thèse. Nous admirons votre simplicité et votre disponibilité. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Innocent Pierre GUISSOU
Enseignant de Pharmacologie-Toxicologie

Nous avons eu l'honneur de bénéficier de vos enseignements théoriques et pratiques, et nous avons été marqués par votre rigueur scientifique. Malgré vos nombreuses sollicitations, vous avez accepté de nous accorder votre temps pour nous guider dans ce travail, le teintant ainsi de votre autorité. Nous vous témoignons notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Dr Jean-Baptiste NIKIEMA
Enseignant de Pharmacognosie

Nous avons été heureux de travailler avec vous. Votre spontanéité, votre disponibilité, votre bonne humeur nous ont marqués. Puisse ce travail être à la hauteur de vos attentes.

Merci.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Dr Halidou TINTO
Chercheur au Centre Muraz

Notre travail à vos côtés s'est déroulé dans une atmosphère fraternelle, et une disponibilité constante. Nous vous présentons nos sincères remerciements.

A notre Maître et Juge

Dr Lady Kadidiatou TRAORE
Enseignante de parasitologie

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury. Nous savons que votre contribution améliorera certainement la qualité de notre travail.

A notre Maître et Juge

Dr Jean Bosco OUEDRAOGO
Maitre de recherche
Enseignant de Parasitologie

C'est un acte honorable que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury. Trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

REMERCIEMENTS

Au personnel du laboratoire du Centre Muraz

Au personnel de l'IRSS

Au Dr Traoré Maminata

A mes maîtres de stage (Dr Dao, Dr Sangaré, Dr Zigani, Dr Paré)

A Sanou Marius

A Drabo Sidiki Boubacar

"Par délibération, 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 pas leur donner aucune approbation ni improbation".

ABREVIATIONS

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

CH₃OH : méthanol

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%

DE₅₀ : Dose-Effet 50%

EDTA : éthylène diamine triacétate

FSS : Faculté des Sciences de la Santé

H₂O : Eau

nM : nanomole

nm : nanomètres

NMRI : Naval Medecin Research Institute

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P.f. : *Plasmodium falciparum*

P.m. : *Plasmodium malariae*

P.v. : *Plasmodium vivax*

P.o. : *Plasmodium ovale*

P. berghei : *Plasmodium berghei*

Rf : Référence frontale

R I : Résistance de niveau I

R II : Résistance de niveau II

R III : Résistance de niveau III

UO : Université de Ouagadougou

WHO : World Health Organisation

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
II. ENONCE DU PROBLEME	2
III. OBJECTIFS	3
III.1. OBJECTIF GENERAL	3
III.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES	3
IV. GENERALITES	4
IV. 1 LA PLANTE : COCHLOSPERMUM TINCTORIUM	4
<i>IV.1.1. Données botaniques</i>	4
<i>IV.1.2. Données ethnobotaniques et ethnopharmacognosiques</i>	4
<i>IV.1.3. Chimie</i>	7
<i>IV.1.4. Pharmacologie</i>	7
IV.2 LES MEDICAMENTS ANTIPALUDIQUES	8
<i>IV.2.1. Rappels sur le paludisme</i>	8
<i>IV.2.2. Les molécules antipaludiques</i>	17
<i>IV.2.2. Les molécules antipaludiques</i>	17
V. MATERIEL ET METHODES	27
V.1. CADRE DE L'ETUDE	27
V.2. MATÉRIEL	27
<i>V.2.1. Matériel végétal</i>	27
<i>V.2.2. Matériel biologique</i>	27
<i>V.2.3. Autres matériels</i>	27
V.3. METHODES	29
<i>V.3.1. L'extraction</i>	29
<i>V.3.2. Fractionnement de l'extrait le plus actif</i>	30
<i>V.3.3. Screening chimique</i>	33
<i>V.3.4. Les tests pharmacologiques</i>	34
<i>V.3.5. Traitement des données</i>	36
VI. RESULTATS	37
VI.1. RESULTATS DE L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE	37
<i>VI.1.1. Résultats de l'extraction</i>	37
<i>VI.1.2. Résultats du fractionnement</i>	37
<i>VI.1.3. Résultats de la CCM</i>	38
VI.2. RESULTATS DE L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE	41
<i>VI.2.1. Recherche de l'extrait antiplasmodique le plus actif</i>	41
<i>VI.2.3. Recherche de la fraction antiplasmodique la plus active</i>	45

VII. DISCUSSION.....	46
VIII. CONCLUSION ET SUGGESTIONS	49
IX. REFERENCES.....	53

I. INTRODUCTION

INTRODUCTION

Endémie parasitaire majeure, le paludisme ou malaria est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Cet hématozoaire est transmis à l'homme par un moustique, l'anophèle femelle. Ce protozoaire s'installe dans le foie puis parasite les globules rouges qu'il détruit en libérant des substances pyrogènes.(1)

Maladie remarquée déjà deux siècles avant Jésus-Christ par les Romains et les Grecs, la connaissance et les moyens de lutte contre le paludisme n'ont cessé de croître. En effet, dès 1630, Francisco Lopez observa les effets antipyrétiques des écorces de quinquina. En 1880, Laveran découvrit le cycle de l'agent pathogène (2). Après la seconde guerre mondiale, il y eut l'utilisation massive des insecticides et l'émergence de nouvelles molécules antipaludiques telles que les amino-4-quinoléines, les amino-alcools et les antimétabolites.

Malgré ces progrès, le paludisme demeure un problème de santé publique avec une mortalité annuelle de 1,5 à 2,7 millions dans le monde (3). Des défis majeurs restent à relever. C'est le cas de la chimiorésistance du *plasmodium* aux antipaludiques financièrement accessibles comme la chloroquine, la résistance des vecteurs aux insecticides, le coût élevé de certains médicaments, et l'absence de vaccins.

C'est pour pallier toutes ces difficultés que de nouvelles stratégies de lutte contre le paludisme ont été élaborées. Nous pouvons citer entre autre, la lutte antivectorielle avec l'utilisation des moustiquaires imprégnées qui pourrait réduire de 15 à 35 % la mortalité infantile totale (3). La recherche d'une chimiothérapie plus efficace et plus accessible que la chloroquine fait également partie de cette stratégie. En effet, l'OMS souligne que " bien que quelques médicaments nouveaux soient apparus au cours des 20 dernières années (méfloquine, halofantrine, artémisinine et dérivés, malarone, atovaquone/proguanil), il existe un besoin urgent de mettre au point des médicaments nouveaux (et surtout économiques et faciles à obtenir) et des formes plus pratiques de médicaments ou de composés existants. "(3)

Aussi, dans le cadre de la recherche de nouvelles alternatives pour la chimiothérapie du paludisme, notre étude s'est portée sur une plante médicinale : *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae). Le but de l'étude était de contribuer à l'identification des principes antiplasmodiques de cette plante pour ouvrir la voie à la mise au point de nouveaux médicaments antipaludiques d'origine naturelle.

II. ENONCE DU PROBLEME

II. ENONCE DU PROBLEME

Le paludisme est la plus importante des maladies parasitaires tropicales dans le monde. Il constitue un problème de santé publique dans plus de 90 pays et concerne plus de 40% de la population mondiale. L'incidence mondiale est estimée entre 300 et 500 millions de cas clinique par année avec une mortalité d'un million par an (3). Au Burkina Faso, elle est estimée à près de 600 000 accès palustres par an (4). Le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde (3). Butler et coll. estiment que le paludisme tue généralement un enfant de moins de 5 ans toutes les 12 secondes (5). En outre, le paludisme pose un problème d'ordre économique au niveau des communautés (6). En effet, les coûts directs et indirects du paludisme en Afrique subsaharienne, d'après des estimations de 1997, dépasseraient 2 milliards de dollars US (3). Il engendre une incapacité de travail de 5 à 20 jours selon Mbugua J.K. (7). Au Burkina Faso, des études ont établi que le coût direct moyen de la prise en charge d'un cas de paludisme grave s'élevait à 21160 FCFA dont 80% à l'achat des médicaments (8).

Les médicaments constituent actuellement une des alternatives dans la lutte antipaludique. Seulement on ne dispose que d'un nombre limité. Compte tenu de la progression de la résistance du *plasmodium* aux médicaments existants, il devient de plus en plus difficile de traiter efficacement le paludisme. La chimiorésistance a été démontrée vis-à-vis de la chloroquine, du proguanil, des sulfamides, de la quinine, de la méfloquine (9). Bryskier et coll. reconnaissent « qu'il devient nécessaire de renouveler l'arsenal thérapeutique qui devient progressivement défaillant ». Ces arguments nous amènent à plaider pour un renforcement urgent de la recherche de nouvelles thérapeutiques antipalustres.

Les plantes médicinales constituent l'un des supports pour la recherche de nouvelles molécules si l'on considère que la première molécule antipaludique, la quinine, a été isolée du Quinquina. Dans le sens de la recherche de nouvelles molécules antipaludiques, nous avons choisi de travailler sur une plante, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae). Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle au Burkina Faso pour le traitement des accès palustres (10, 11). Des études antérieures ont montré une activité antiplasmodique *in vitro* et *in vivo* à partir d'extraits isolés de cette plante (12, 13, 14). L'objectif de la présente étude est de contribuer à l'identification des principes antiplasmodiques de cette plante, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae).

III. OBJECTIFS

III. OBJECTIFS

III.1. Objectif général

Contribuer à l'identification des principes antiplasmodiques de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich . (Cochlospermaceae)

III. 2 Objectifs spécifiques

1. Réaliser des extraits de la poudre des rhizomes de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich . (Cochlospermaceae) à l'aide de solvants de polarité croissante.
2. Déterminer l'extrait antiplasmodique le plus actif grâce à des tests d'inhibition de *P. berghei* *in vivo* chez la souris.
3. Réaliser un screening chimique de l'extrait antiplasmodique le plus actif par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice G₆₀F₂₅₄.
4. Fractionner l'extrait le plus actif par chromatographie sur une colonne de gel de silice.
5. Déterminer la fraction antiplasmodique la plus active grâce à des tests d'inhibition de *P. berghei* *in vivo* chez la souris.
6. Analyser la fraction antiplasmodique la plus active, par CCM de gel de silice G₆₀F₂₅₄.

IV. GENERALITES

IV. GENERALITES

IV. 1 LA PLANTE : *Cochlospermum tinctorium* (Cochlospermaceae)

IV.1.1. Données botaniques

C'est une plante ligneuse géophyte dont les racines et les tiges vivaces restent enterrées; seuls se développent dans l'air, l'appareil végétatif annuel et l'appareil florifère. Les feuilles, émises pendant les pluies, mesurent 30 à 80 cm de hauteur. Elles sont palmatilobées à lobes effilés. Les fleurs sont jaune-d'or et apparaissent au ras de terre. Le fruit est une dapsile ovoïde contenant des graines noires entourées de longs poils. (15,16)

IV.1.2. Données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques

IV.1.2.1. Repartition géographique

Cochlospermum tinctorium A. Rich. est un genre pantropical essentiellement répandu dans les savanes et les formations forestières. Il se retrouve fréquemment sous le tapis herbacé disséminé dans toutes les savanes boisées et arborées du domaine phytogéographique soudanien. Elle est appelée espèce omnisoudanienne du fait de sa répartition dans toute la bande soudanienne entre le huitième et le neuvième parallèle. Les *Cochlospermums* sont représentés par des arbrisseaux ou sous arbrisseaux fleurissant couramment au ras du sol, après les feux. Au Burkina-Faso, les mois de floraison sont Novembre et Décembre. (17)

IV.1.2.2. Usages traditionnels

Les usages de cette plante sont variés du point de vue des indications, des parties de la plante utilisée, que de la région.

Au Mali, la décoction aqueuse des racines, suivant l'état avancé de la maladie, est réputée efficace dans le traitement des ictères aigus, en boisson à la place de l'eau jusqu'à guérison complète (15).

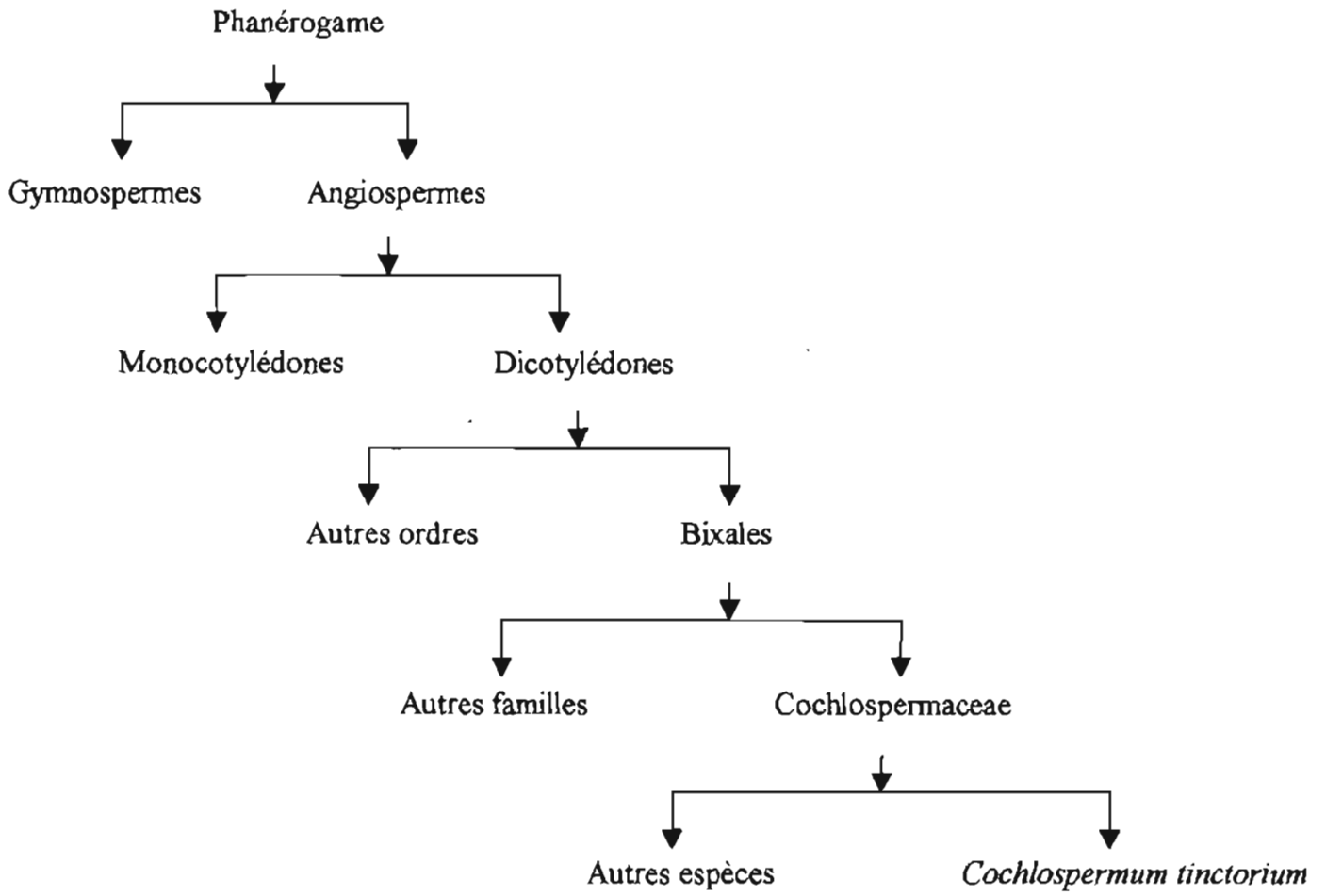
Au Togo, le décocté des tubercules est bu en cas de dysménorrhée et est utilisé en bain de siège pour traiter le prolapsus anal. En macération dans l'urine de bœuf, les tubercules sont réputées anti-ictériques par voie interne (16).

En Côte-d'Ivoire, la plante est utilisée par les guérisseurs: sous forme de décoction des tiges et surtout des racines, l'utilisation se fait en boisson ou en bain dans le traitement des affections génito-urinaires, rénales et des douleurs intercostales. La pulpe des feuilles sert à confectionner des pansements humides destinés à faire avorter les abcès et furoncles (18).

Au Burkina Faso, la plante est utilisée dans les accès fébriles : le décocté de la partie centrale de la racine est prescrit en boisson ou en ablution. La décoction des écorces de racines est indiquée dans le traitement du paludisme. Le décocté des racines entières associé à *Terminalia macroptera* est prescrit en boisson dans le traitement de la jaunisse. En zone lobi, la racine mastiquée et imprégnée de salive, appliquée sur des boutons (pustules dues aux bactéries charbonneuses) guérit le malade de ses affections cutanées. Pour atténuer les troubles causés par la jaunisse, le malade doit absorber l'eau dans laquelle on a fait macérer les racines préalablement pilées (19).

Les indications de cette plante sont nombreuses selon la littérature : affections hépato-biliaires, fièvres bilieuses hématuriques, rachitisme, coliques, helminthiases, orchites, bilharziose, épilepsie, pneumonie, conjonctivites, hémorroïdes, ascite, bérubéri, blennorragie, affections des bronches, œdèmes généralisés.

SITUATION DE *COCHLOSPERMUM TINCTORIUM* A. RICH DANS LE REGNE
VEGETAL





Cochlospermum tinctorium A. Rich (Cochlospermaceae) (photo tirée de la flore du Sénégal)

IV.1.3. Chimie

L'étude phytochimique réalisée par Diallo et coll. (12) à partir d'extraits aqueux a permis d'isoler les constituants chimiques suivants :

- acides galliques
- ellagitanins
- flavonoïdes
- apocaroténoïdes (dont la cochloxanthine et la dihydrocochloxanthine)
- triterpènes pentacycliques (acide arjunolique)
- triacylbenzènes

Coulibaly (13) a identifié dans l'extrait chloroformique des matières grasses, des stérols et triterpènes, des caroténoïdes et des acides gras. Dans l'extrait éthanolique non hydrolysé ont été identifiés des tanins ainsi que des composés réducteurs; et dans l'extrait hydrolysé des glycosides stéroïdiques, triterpéniques et des leucoanthocyanes. Les tanins, les composés réducteurs, les glucides ont été identifiés dans l'extrait aqueux.

IV.1.4. Pharmacologie

Diallo et coll. ont montré en 1989, les effets inhibiteurs des triterpènes (l'acide arjunolique) sur l'activation du virus Epstein Barr (21). En 1995, ils ont montré l'effet inhibiteur de ces triterpènes sur la carcinogenèse de la peau chez la souris. (22)

Nkiani et coll. ont montré que la cochloxanthine et la dihydrocochloxanthine avaient des propriétés antifongiques et antibactériennes. Ces pigments inhiberaient la croissance de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Escherichia coli* à des concentrations élevées de l'ordre de 500 mg/ml. (12)

L'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux, hydroéthanolique et éthanolique a été évaluée par Diallo et coll. Les composés phénoliques et les caroténoïdes et les triterpènes seraient responsables de cette activité (23).

Une activité fébrifuge a également été suspectée (24).

L'activité antiplasmodique a été mise en évidence *in vitro* par les études menées par Benoît-Vical et coll. (14) sur l'infusé et le décocté des racines de *Cochlospermum tinctorium*. Ces mêmes auteurs, à partir d'extraits des feuilles et des huiles essentielles de *Cochlospermum tinctorium* et *Cochlospermum planchonii*, ont mis en évidence l'activité antiplasmodique *in*

in vitro. Cette étude a aussi montré une cytotoxicité sur la souche cellulaire K562 avec des CI_{50} allant de 33 à 2000 $\mu\text{g/ml}$.(25)

Coulibaly a aussi montré l'activité antiplasmodique à partir d'extraits des rhizomes de la plante *in vitro*. Balkouma a montré à partir de tests *in vivo*, l'activité antiplasmodique de l'extrait hydroéthanolique des rhizomes de la plante avec une DE_{50} de 36,5 mg/kg.

IV.2 LES MEDICAMENTS ANTIPALUDIQUES

IV.2.1. Rappels sur le paludisme

IV.2.1.1. Epidémiologie

IV.2.1.1.1. Les agents pathogènes

Les quatre espèces plasmodiales parasites de l'homme sont : *Plasmodium falciparum* (P.f.), *Plasmodium ovale* (P.o.), *Plasmodium malariae* (P.m.), *Plasmodium vivax* (P.v.) . Ce sont des protozoaires intracellulaires. Ils appartiennent à l'embranchement des sporozoaires et à l'ordre des Haemosporidia. La multiplication est asexuée (ou schizogonique) chez l'homme et sexuée (ou sporogonique) chez le moustique vecteur, l'anophèle femelle. Au cours de leur cycle biologique, les plasmodies changent sans cesse d'aspect et de taille, par suite de l'alternance de phases de croissance et de phases de division (nucléaire et cytoplasmique).

IV.2.1.1.2. Cycle des plasmodies

Chez l'homme s'effectue la multiplication schizogonique. Au cours de la piqûre, le moustique infesté injecte avec sa salive des centaines de parasites, sous forme de sporozoïtes. Ils gagnent le foie où s'effectue le **cycle exoérythrocytaire** : les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes, se multiplient pour donner les schizontes. Ces schizontes s'éclatent et libèrent de nombreux mérozoïtes qui passent dans la circulation sanguine.

Dans le sang s'effectue le **cycle érythrocytaire** : chaque mérozoïte pénètre par endocytose dans une hématie et s'y transforme en trophozoïte. Il grossit, et son noyau se divise : c'est alors un schizonte. Ce schizonte éclate et libère des mérozoïtes qui vont parasiter des hématies vierges et effectuer de nouveaux cycles schizogoniques. Après plusieurs cycles schizogoniques,

apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexuel, les gamétocytes mâles et femelles. Le cycle érythrocytaire dure 48 heures pour *P.v.*, *P.o.* et *P.f.* et 72 heures pour *P.m.*

Chez l'anophèle femelle s'effectue le cycle sexué ou sporogonique. En prenant son repas sanguin chez un paludéen, l'anophèle femelle absorbe des trophozoïtes, des schizontes, des rosaces, des gamétocytes. Les gamétocytes ingérés assurent la poursuite du cycle. Dans l'estomac a lieu la fécondation qui donne un œuf mobile, l'ookinète qui se fixe sur la paroi externe de l'estomac pour donner l'oocyste contenant les sporozoïtes. Libérés par éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent avec prédilection les glandes salivaires. La durée du cycle sporogonique varie de 10 à 40 jours selon la température et l'espèce plasmodiale.

IV.2.1.1.3. Les vecteurs

Ils appartiennent tous au genre *Anopheles* (comprenant 400 espèces dont 20 vectrices du paludisme) de la famille des *Culicidae* de l'ordre des diptères. Les mâles se nourrissent uniquement de jus sucrés, ils ne piquent pas. Les femelles ont besoin de protéines pour assurer le développement de leurs ovaires : elles les puisent dans le sang qu'elles prélèvent sur les vertébrés dont l'homme.

IV.2.1.2. Symptomatologie

Nous nous intéresserons aux tableaux cliniques communs à toutes les espèces plasmodiales, même si l'on observe des nuances ou des degrés dans l'intensité des signes selon le parasite : ce sont les accès simples qui comprennent la primo-invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique. De même le paludisme viscéral évolutif peut en principe, être déterminé par toutes les plasmodies. En revanche, d'autres tableaux sont spécifiques ou compliquent une infection par une espèce précise : l'accès pernicieux, la fièvre tierce maligne et la fièvre bilieuse hémoglobinurique pour *P.f.*, la néphrite quartane pour *P.m.* Enfin, l'âge de l'hôte ou son état impriment des particularités cliniques.

IV.2.1.2.1. Accès de primo-invasion

Il apparaît chez un sujet neuf, non immun, c'est-à-dire chez l'enfant de 4 mois à 4 ans, autochtone d'une zone d'endémie, mais aussi à tout âge, y compris chez l'adulte, pour les sujets récemment transplantés d'une région exempte de paludisme vers une zone d'endémie,

pour peu qu'ils ne se soumettent pas à une prévention efficace.

Incubation : 7 à 21 jours, parfois plusieurs mois

Invasion : fièvre progressivement croissante qui devient continue atteignant 39-40°C, malaise

général : myalgies, céphalées, douleurs abdominales, nausées, vomissements, parfois une diarrhée, parfois une splénomégalie

Evolution : elle est favorable, si la maladie est correctement traitée, en quelques jours; sinon, il y a une persistance de la fièvre avec des rémissions et des recrudescences pendant 8 à 15 jours.

Il y a un risque de passage à l'accès pernicieux pour *P. f.*

Pour les autres espèces, la guérison spontanée est possible mais des accès de reviviscence ultérieurs, des mois plus tard ne sont pas exclus.

IV.2.2.2.2. Accès palustres à fièvre périodique

Ils succèdent à l'accès de primo-invasion, ou correspondent à des accès de reviviscence schizogonique par réveil d'un hypnozoïte intrahépatique (*P.v.* et *P.o.*) ou par exacerbation d'une schizogonie sanguine latente (*P.m.*).

Ils sont identifiés par une triade symptomatique :

- stade de frissons : fièvre à 39°C, splénomégalie, hypotension artérielle. Ce stade dure une dizaine d'heures.
- stade de chaleur : les frissons cessent, la peau devient brûlante, la température atteint 40°-41°C. Ce stade dure 3 à 4 heures.
- stade de sueurs : sueurs abondantes, effondrement brusque de la température, remontée de la pression artérielle. Durée : 2 à 4 heures.

Le rythme des accès est variable selon l'espèce plasmodiale. Ils surviennent tous les 2 jours lorsque la schizogonie est de 48 heures et réalisent alors une fièvre tierce (*P.v.*, *P.o.* et *P.f.*).

Une schizogonie de 72 heures donne lieu à une fièvre quarte (*P.m.*).

IV. 2.1.3. Physiopathologie

IV.2.3.1.1. Accès simple

La fièvre est due à l'éclatement des rosaces qui libère dans le torrent circulatoire du pigment malarique. Celui-ci se comporte comme une substance pyrogène.

L'anémie résulte de la lyse des hématies parasitées.

La splénomégalie et l'hépatomégalie, habituelles au bout d'un certain temps témoignent de l'hyperactivité et de la congestion de ces organes.

Le subictère provient de l'activité phagocytaire des cellules de Küppfer transformant l'hémoglobine en bilirubine qui colore les conjonctives.

IV.2.1.3.2. Accès pernicieux

Ses particularités symptomatiques sont dues à la multiplication de *P.f.* dans les capillaires viscéraux qui engendre une anoxie des tissus nobles, prédominant au niveau de l'encéphale, puis des reins, des poumons et du foie, par anémie hémolytique, troubles de la microcirculation et phénomènes cytotoxiques.

IV.2.1.4. Traitement étiologique

IV.2.1.4.1. Formes sévères et pernicieuses

Il est basé sur l'administration intraveineuse d'un sel de quinine. La posologie est de 8 mg/kg de base (environ 10 mg de sel) à passer en 4 heures dans du soluté glucosé à 5% (250 ml pour un adulte), et à renouveler chaque 8 heures, soit 25 mg/kg par 24 heures. Une dose de charge (16 mg/kg pour la première perfusion) aurait pour les uns l'avantage d'une action plus rapide, et pour les autres l'inconvénient d'accroître les risques d'hypoglycémie et d'effets cardio-vasculaires.

Au Burkina Faso, le médicament de premier choix pour le traitement du paludisme grave est aussi la quinine (26). La posologie recommandée par l'OMS est de 10 mg/kg toutes les 8 heures. Cependant, pour plus d'efficacité, si le malade n'a pas pris de quinine dans les 24 heures ou de la méfloquine au cours de la semaine, commencer le traitement par une dose de charge de 20 mg/kg de sels de quinine en perfusion dans du soluté à 5% (10 ml/kg), à passer en quatre heures. Sinon, commencer directement par la dose de 10 mg/kg toutes les 8 heures.

IV.2.1.5.2. Formes non graves

1°) Absence de chloroquino-résistance

Au Burkina Faso le premier choix pour le traitement du paludisme simple est la chloroquine (26). La posologie recommandée pour la chloroquine est la suivante :

1^{er} jour de traitement : 10 mg/kg en prise unique

2^{ème} jour de traitement : 10 mg/kg en prise unique

3^{ème} jour de traitement : 5 mg/kg en prise unique

2°) Chloroquino-résistance présumée ou prouvée

Plusieurs protocoles peuvent être proposés, chacun avec ses avantages et ses inconvénients. Certains ne peuvent être que par voie orale. En cas d'intolérance gastrique, on ne pourra utiliser que la quinine ou le Fansidar®. Les molécules utilisables sont les suivantes : la méfloquine, la quinine, l'association sulfadoxine-pyriméthamine, l'association méfloquine-sulfadoxine-pyriméthamine, les amino-4-quinoléïnes (chloroquino-résistance modérée : absence de R-III)

3°) Multi-résistances

Les plus fréquentes concernent les amino-4-quinoléïnes et les divers antimétabolites. On s'adressera alors à la quinine, la méfloquine ou l'halofantrine.

En cas de résistance à la quinine, on prescrira :

- soit un traitement de 7 jours, voire 10 jours de l'association quinine-antibiotique (doxycycline, tétracycline, lincosamine ou érythromycine).
- soit la méfloquine ou l'halofantrine.

Les tableaux suivants présentent d'une part les avantages et les inconvénients des antimalariques dans le traitement du paludisme, et d'autre part les posologies moyennes pour le traitement.

TABLEAU I

Avantages et inconvénients des antimalariques dans le traitement du paludisme à *P. falciparum*.

	AVANTAGES	INCONVENIENTS ET LIMITES
Quinine	Efficacité rapide, sauf dans certaines régions (Asie)	Traitement de plusieurs jours. Effets secondaires fréquents
Méfloquine	Très efficace – Résistance Rare. Traitement de 24 heures	Coût – Tolérance médiocre Pas de présentation injectable
Halofantrine	Résistance rare Traitement de 24 heures	Coût – Absorption irrégulière – Pas de forme injectable
Chloroquine	Faible coût – très active sur les souches sensibles. Bien tolérée.	Extension des résistances
Amodiaquine	Active sur les souches modérément résistantes à la chloroquine	Extension des résistances
Suladoxine-Pyriméthamine	Prise unique. Pas de résistance croisée avec la chloroquine	Apparition de résistances
Suladoxine-Pyriméthamine-Méfloquine	Actif sur les souches chloroquino-résistantes. Restriction dans la sélection de souches résistantes.	Coût – Tolérance moyenne

TABLEAU II

Posologies moyennes des schizonticides (exprimée en gramme de la molécule base)

	ADULTES	ENFANTS
Quinine	1,5 g par jour x 5 à 7 jours	25 mg/kg x 5 à 7 jours
Méfloquine	1,5 g par 24 heures en 3 prises	25 mg/kg en 3 prises
Halofantrine	Idem	Idem
Chloroquine et Amodiaquine	1,5 à 2,5 g en 3 à 5 jours	25 à 35 en 3 à 5 jours
Suladoxine-Pyriméthamine	3 comprimés en 1 prise	½ comprimé / 10 kg de poids
Suladoxine-Pyriméthamine-Méfloquine	Idem	Idem

IV.2.1.5. Chimiorésistance

IV.2.1.5.1. Définition

La résistance médicamenteuse est la capacité qu'a un parasite à se multiplier ou à survivre en présence de la concentration d'une substance qui, normalement, détruit les parasites de la même espèce ou empêche leur maturation. La résistance peut être partielle (amenant à augmenter les doses de médicaments tolérées par l'hôte) ou complète (dépassant les doses maximum tolérées par l'hôte) (27).

La chimiorésistance des plasmodiums a apparu différemment selon les molécules (28) : quinine (1910), chloroquine (1945), amodiaquine (1947), proguanil (1948), pyriméthamine (1951), pyriméthamine + sulfadoxine (1964), méfloquine (1972). Au Burkina Faso, la chimiorésistance a été observée in vivo pour la chloroquine en 1988 (29). La position de la quinine reste solide, la pression de sélection de résistance étant limitée par une stricte utilisation thérapeutique du fait des effets secondaires rapidement perceptibles et par la rapidité de son élimination chez le sujet traité.

IV.2.1.5.2. Mécanisme de la chimiorésistance

Plusieurs hypothèses expliquent le mécanisme de la chimiorésistance

a) L'hypothèse faisant intervenir la ferriprotoporphyrine (FP) comme récepteur des schizonticides. Fitch explique la chloroquino-résistance de *P.f.* par une séquestration plus efficace de la FP, diminuant ainsi la formation du complexe FP-CQ. Il propose différents mécanismes pour expliquer ce phénomène, sans avancer de preuves expérimentales : l'augmentation de la quantité ou de l'affinité de la " protéine liant l'hème " et l'accélération de la séquestration de FP.

b) L'hypothèse du gradient de pH selon Warhurst : les mécanismes de résistance sont envisageables par :

- la modification du gradient de pH due à de l'activité de la pompe à protons ou au changement de perméabilité des membranes;

- la modification quantitative ou qualitative de la perméase dans les membranes plasmiques et vacuolaires. Il faudrait dans ce cas admettre l'activité de la perméase dans la membrane vacuolaire des seules souches résistantes, pour expliquer l'efflux de la chloroquine vers le cytoplasme parasitaire.

c) L'hypothèse de l'efflux des amino-4-quinoléines et des amino-alcools est basée sur la cinétique de la chloroquine radiomarquée dans les deux directions, influx et efflux, chez *P.f.* sensible et résistant. La vitesse initiale de l'accumulation est presque identique chez les deux souches; à l'état d'équilibre, la chloroquine s'accumule significativement plus chez le *P.f.* sensible que chez le *P.f.* résistant. La cinétique de l'efflux met en évidence la sortie rapide de la chloroquine radiomarquée chez *P.f.* résistant et lente chez le *P.f.* sensible. Ceci explique la différence du taux de chloroquine à l'état d'équilibre chez les deux souches.

d) L'hypothèse de la modification des phospholipides membranaires et de la fuite des protons : selon Ginsburg, la résistance pourrait être acquise par une modification des phospholipides influant sur la perméabilité membranaire aux bases protonées, facilitant la fuite des schizonticides. De façon plus convaincante, cet auteur suggère que le parasite résistant puisse avoir des pompes à protons déficientes et/ou une fuite accrue de protons aboutissant à un pH vacuolaire relativement élevé. La moindre diminution du pH vacuolaire suffit pour expliquer la rétention de 40 fois plus de chloroquine non protonée dans la vacuole d'une souche sensible et, par conséquent, explique l'efflux 40 fois plus rapide de la souche résistante observée par Krogstad.

e) L'hypothèse de la réversion de la résistance est issue du rapprochement des mécanismes de résistance de cellules cancéreuses et de *P.f.* Certaines cellules humaines cancéreuses exposées *in vitro* à un médicament anticancéreux deviennent résistantes au composé sélectionné, mais également à des agents de mode d'action différent. Une pompe ATP dépendante située dans la membrane plasmique des cellules résistantes est à l'origine de l'efflux des agents anti-cancéreux. Il s'agit d'une P-glycoprotéine surexprimée dans les membranes sous l'effet de l'amplification d'un gène appelé MDR. Un gène similaire partageant 60 % de la séquence nucléotidique a été détectée sur des souches chimiorésistantes de *P.f.* par deux équipes, mais la présence et la surproduction d'une P-glycoprotéine plasmodiale reste encore à établir.

IV.2.1.6. *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei est la souche sur laquelle nos tests antiplasmodiques ont été réalisés.

Plasmodium berghei est le premier plasmodium murin à avoir été isolé, en 1948 par Vaincre et Lips. C'est un parasite ayant une prédilection caractéristique pour les réticulocytes.

Les cycles de développement de toutes les plasmodies murines sont semblables. L'infection commence par l'injection de sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires d'un moustique infecté. La schizogonie exoérythrocytaire se déroule dans les hépatocytes. Il y a une seule phase de schizogonie exoérythrocytaire qui se déroule en 48-60 heures : le sporozoïte s'arrondit se transformant en trophozoïte. Le trophozoïte se divise, formant un schizonte. A maturité, le schizonte éclate, libérant des mérozoïtes qui pénètrent dans les globules rouges où ils se transforment en une forme en anneau, le trophozoïte. Le trophozoïte donne le schizonte qui après 24 heures, produit 6 à 18 mérozoïtes. Ces mérozoïtes pénètrent dans d'autres globules rouges et l'infection continue avec une périodicité de 24 heures. Après plusieurs cycles schizogoniques, des gamétocytes sont formés. Ces gamétocytes infectent lors de la piqûre un moustique du genre anophèle chez lequel se déroule le cycle sporogonique. Les sporozoïtes apparaissent dans les glandes salivaires après 10 à 12 jours à 24-26 °C. Ce cycle de développement des plasmodiums murins est semblable à celui des plasmodiums humains.

IV.2.2. Les molécules antipaludiques

IV.2.2.1. Classification

Il existe plusieurs types de classification des molécules antipaludiques : selon la famille chimique, le délai d'action, le spectre d'activité, l'origine. Dans le cadre de notre étude nous insisterons sur la classification selon l'origine (30).

- La famille chimique

- les quinolyl méthanol (quinine, halofantrine, méfloquine)
- les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine)
- les amino-8-quinoléines (primaquine)
- les sulfones (dapsonne), les sulfamides (sulfadoxine, sulfalène)
- les biguanides (proguanil, chlorproguanil), les diaminopyrimidines (pyriméthamine, triméthoprime)
- les sesquiterpènes lactones (artémisinine, artésunate, arthéméter)
- les cyclines (tétracycline, doxycycline, minocycline)
- les macrolides (érythromycine, lincomycine, clindamycine)
- les quinolones

- Le délai d'action

- rapide (quinine, chloroquine, amodiaquine, méfloquine, halofantrine, artémisinine)
- lents (proguanil, pyriméthamine, clindamycine, cyclines)

- Le spectre d'activité

- sur les schizontes tissulaires prévenant le passage des parasites vers les globules rouges (primaquine, proguanil, pyriméthamine, sulfones, sulfamides)
- sur les hypnozoïtes tissulaires guérissant des rechutes de *P.v.* et *P.o.* (primaquine)
- sur les stades érythrocytaires asexués associés généralement à la maladie (tous les antipaludiques sauf la primaquine)
- sur les gamétocytes coupant le cycle de transmission du paludisme (quinine, amino-4-quinoléine sur *P.m.* et *P.v.* et la primaquine sur les quatre espèces)
- sur le cycle sporogonique inhibant le développement du parasite chez le moustique

(primaquine, proguanil)

- L'origine

- les molécules d'origine naturelle
- les molécules de synthèse

IV.2.2.2. Chimie

IV.2.2.2.1. Les molécules d'origine naturelle

1°) Les alcaloïdes

- La quinine

Elle appartient à la classe chimique des arylméthanols. Premier antipaludique d'origine naturelle, elle a été isolée des racines du *Cinchona* (Rubiaceae) en 1820 par PELLETIER et CAVENTOU.

- Les bisbenzylisoquinoléïnes

- La tétrandine : isolée de *Stephania tetrandra*, la plante est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise comme antirhumatismale et analgésique. La tétrandine a *in vitro* une efficacité plus importante sur les souches chloroquinorésistantes de *P.f.* que sur les souches sensibles. Combinée à la chloroquine, elle prévient l'émergence de la chloroquinorésistance .
- La phaeanthine : énantiomère de la tétrandine, elle a été isolée chez *Trichlisia patens* (Menispermaceae). Elle présente à peu près les mêmes effets que cette dernière. La phaeanthine est active *in vitro* sur le *P.f.*
- La 7-O-diméthyltétrandine et la limacine : elles ont été isolées respectivement chez *Strychnopsis thouarsii* et *Spirospermum penduliflorum*. Elles ont montré toutes les deux une activité antiplasmodiale *in vitro*. Ces molécules potentialisent l'effet de la chloroquine sur les souches résistantes.

- La fébrifugine

La fébrifugine a été extraite des racines de *Drychroa febrifuga*. L'activité antipaludique de l'extrait a été mise en évidence dès 1946 par Jang et coll. (10)

- La berberine

Elle a été retrouvée chez les Annonaceae, les Berberidaceae et les Menispermaceae; son activité antiplasmodiale a été démontrée *in vitro*.

- La vinblastine

Isolée chez *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), elle est active sur *P.f.* Cette molécule présente un faible rapport efficacité/coût du fait de sa cherté.

- Les alcaloïdes acridiniques

Ils ont été isolés chez *Citrus grandis* (Rutaceae). L'atalaphillinine a une activité *in vivo* chez la souris infestée par *Plasmodium berghei*.

7°) Les alcaloïdes indoliques : la 4-méthoxy-1-vinyl- α -carboïne et la 6-hydroxy-4-méthoxy-1-vinyl- β -carboline.

Elles ont montré une activité antiplasmodiale *in vitro* sur certaines souches résistantes de *P.f.*

2°) Les terpènes

- L'artémisinine ou qinghaosu

Elle a été isolée en 1971 par des chimistes chinois à partir d'extraits de feuilles d'*Artemisia annua* L. Sa structure a été élucidée en 1973 ainsi que sa synthèse. L'artémisinine et ses dérivés (arthéméter, arthéether, artésunate) constituent une nouvelle classe de molécules antipaludiques efficaces sur les souches résistantes de *P.f.*

- La cynaropicrine

Sesquiterpène lactone, elle a été isolée de *Vernonia glutinosa* (Compositae). Son activité a été démontrée uniquement *in vitro*.

- La parthénine

Isolée de *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae), son activité antiplasmodiale a été démontrée *in vitro*.

- Les quassinoides

Ce sont des triterpénoïdes chimiotaxonomiques des Simaroubaceae. 26 quassinoides ont été testés, *in vitro*, sur *P.f.* Il a été démontré que les quassinoides sont des inhibiteurs potentiels de la synthèse protéique chez *P.f.* et ont un effet faible sur la glycolyse.

La tingenone et la pristimerine de certains Celasteraceae ont montré une activité *in vitro* sur *P.f.*

3°) Les quinones et les composés phénoliques

Les naphthoquinones : elles sont actives *in vitro* sur *P.f.* On peut citer le lapachol rencontré chez les Bignoniaceae. A cause de leur faible toxicité, les naphthoquinones sont désignées pour le développement de nouvelles classes de drogues végétales.

Le gossipol a également été trouvé actif *in vitro* sur *P.f.* Certains flavonoïdes (artémétine, casticine) ont une activité antiplasmodiale mais à des doses élevées.

IV.2.2.2.2. Les molécules de synthèse

1°) Les amino-4-quinoléines

- La chloroquine

La chloroquine est bien tolérée, peu coûteuse, efficace contre les souches sensibles de *P.f.* et contre les trois autres espèces de *Plasmodium* humain, à l'exception de *P.v.* dans certaines régions du monde. Peu toxique, disponible dans toutes les zones d'endémie, elle est utilisable pour les enfants et les femmes enceintes, et est adaptée pour la thérapeutique comme pour la chimioprophylaxie. Malgré ces propriétés idéales, l'intérêt de la chloroquine diminue chaque année dans beaucoup de zones d'endémie. La chloroquine reste néanmoins le médicament de première intention pour le traitement du paludisme à *P.f.* dans la plupart des pays en Afrique et dans quelques régions en Asie et en Amérique du Sud.

- L'amodiaquine

Elle est plus efficace que la chloroquine contre les souches chloroquino-sensibles et peu coûteuse. Son efficacité sur les souches chloroquino-résistantes de *P.f.* est confirmée *in vitro*. Elle présente selon certaines études une résistance croisée *in vitro* avec la chloroquine. Pour des raisons de toxicité elle n'est plus prescrite en chimioprophylaxie depuis 1988. Depuis 1990, l'OMS ne préconise plus l'utilisation de l'amodiaquine même pour le traitement. Cependant, l'amodiaquine peut encore être utile en thérapeutique dans des zones limitées peu ou pas touchées par la chloroquinorésistance; elle reste en pratique un antipaludique de recours pour le traitement d'un accès simple dans certains pays d'Afrique.

- L'amopyroquine

Proche de l'amodiaquine, elle s'est révélée efficace contre *P.f.* chloroquino-résistant chez le singe et chez les souris. Une étude a montré la possibilité d'une résistance croisée entre la chloroquine et l'amopyroquine. Sur le plan clinique, elle ne peut être administrée que par

voie parentérale; l'amodiaquine en parentérale étant indisponible.

- La pyronaridine (Malaridine)

Synthétisée en Chine en 1970, elle s'est révélée hautement active comme schizonticide sanguin sur *Plasmodium berghei* et *P.f.* *in vitro*. Les CI_{50} sur les souches chloroquino-sensibles et résistantes de *P.f.* sont comparables à celles de la méfloquine (4,73 à 15,4 nM). Elle est aujourd'hui employée en Chine pour traiter le paludisme chloroquino-résistant.

- Autres aminoquinoléines de synthèse

Les molécules antiplasmodiques testées de cette famille sont nombreuses, et celles en étude le sont tout autant. Les molécules répertoriées ci-dessous sont celles qui ont présenté un avantage par rapport à la chloroquine.

- La dabéquine: elle est 2,5 à 5 plus efficace que la chloroquine *in vitro* sur *P.f.* Elle présente une résistance croisée avec la chloroquine.
- La dichloquinazine: son activité est supérieure à la chloroquine contre *P.f.* *in vitro* et efficace contre plusieurs souches chloroquino-résistantes de *P.f.*
- La pipéraquine: elle est cliniquement efficace contre *P.f.* chloroquino-résistant.
- L'hydroxypipéraquine: une étude a rapporté un taux de guérison de 100% chez des malades infectés par *P.f.* chloroquino-résistant des niveaux RII et RIII. Son action prophylactique est meilleure que la chloroquine chez la souris.
- L'hydroxychloroquine : dérivé de la chloroquine, elle en est un métabolite. Elle présente une activité antiplasmodique similaire et est deux fois moins toxique que sa molécule parente.

2°) Les aminoalcools

Ce sont des dérivés de la quinine.

- Les quinoléine-méthanols : la méfloquine

La méfloquine s'est révélée cinq fois plus active que la chloroquine contre *P.f.* chloroquino-sensible, efficace contre les souches chloroquino-résistantes et/ou pyriméthamino-résistante, beaucoup moins toxique à dose très élevée que la chloroquine. Cependant des souches de *P.f.* résistantes (RI et RII) ont été observées à la méfloquine.

- Les phénanthrène-méthanols : l'halofantrine

L'halofantrine est très active *in vitro* contre les souches multirésistantes de *P.f.* Son activité est supérieure à celle de la méfloquine.

3°) Les antimétabolites

Les inhibiteurs du métabolisme nucléotidique peuvent être classés en deux catégories : les antifoliques et les antifoliniques.

- Les antifoliques

Les sulfamides : ce sont des dérivés du sulfanilamide. A cette catégorie appartiennent la sulfadiazine, la sulfamonométoxine, la sulfaméthoxy-pyridazine, la sulfadoxine et le sulfalène.

Les sulfones : la série est représentée par la dapsonne qui est toujours associée au chlorproguanil ou au proguanil. Ces associations sont utilisées pour la chimioprophylaxie ou pour la thérapeutique.

- Les antifoliniques

- Les *biguanides* : le proguanil, le chlorproguanil et le cycloguanil appartiennent à cette classe. Il y a actuellement un regain d'intérêt pour le proguanil associé à la chloroquine. Il est bien toléré et a peu d'effets indésirables. Le cycloguanil a une activité élevée contre les stades intraérythrocytaires *in vitro* de la plupart des souches africaines.

- Les *diaminopyrines* : la pyriméthamine et le triméthoprime sont de cette famille.

La pyriméthamine, la sulfadoxine et la dapsonne sont les seuls antipaludiques des groupes des antifoliques et des antifoliniques employés en thérapeutique en tant qu'antipaludique. Les antimétabolites sont toujours utilisés en association, du fait de l'apparition précoce de la résistance s'ils sont employés seuls.

4°) Les sesquiterpènes lactones de synthèse

Il s'agit des dérivés actifs de l'artémisinine, synthétisés en raison de la faible solubilité de l'artémisinine dans l'eau.

- La dihydroartémisinine

Cette molécule est une forme lactol ou hémiacétal des sesquiterpènes possédant une activité antipaludique élevée. Elle est deux à trois fois plus efficace que l'artémisinine sur *P. berghei*. L'activité de la dihydroartémisinine sur *P.f. in vitro* est également supérieure à celle de l'artémisinine et de l'artéméthère. La dihydroartémisinine n'est cependant pas stable, rendant cette molécule peu utilisable en thérapeutique.

- L'artéméthère (dérivé méthyl éther)

Les dérivés éther présentent les avantages à la fois d'une solubilité supérieure en

solution huileuse et d'une activité supérieure à l'artémisinine sur *P. berghei* chloroquino-sensible. L'artéméther est administré par voie orale ou parentérale (injection intramusculaire). Il est un peu plus toxique que l'artémisinine chez les animaux mais la toxicité de ces deux produits est inférieure à celle de la chloroquine. Il est plus actif que l'artémisinine et la dihydroartémisinine sur les souches chloroquino-résistantes et sensibles de *P. berghei*.

L'artéméther administré par voie intramusculaire a une activité supérieure à la chloroquine pour le traitement de l'accès simple dans une zone de chloroquinorésistance en Afrique. Dans les essais thérapeutiques chez des malades atteints d'un accès grave, à l'exception d'un accès pernicieux, tous les sujets ont été guéris sans aucun signe de toxicité.

- L'artéether (dérivés éthyl éther)

Il est administré par voie parentérale. Le substituant éthyle remplaçant le méthyle confère la lipophilie au dérivé et peut être favorable à l'accumulation préférentielle dans le cerveau. Les activités de l'artéether et de l'artéméther sont équivalentes *in vitro* sur *P.f.*

- L'artésunate ou acide artésunique (ester)

L'artésunate est préparé comme un sel de l'hémisuccinate. Il est soluble en solution aqueuse et administré par voie intraveineuse. Cette propriété lui permet de diminuer la parasitémie rapidement chez les malades présentant un accès pernicieux. Il est à peu près cinq fois plus efficace que l'artémisinine sur *P. berghei* et sur *P.f.* chloroquino-sensibles ou chloroquino-résistants.

5°) Antibiotiques et antifongiques

Les antibiotiques actifs *in vitro* sur le *Plasmodium*) sont des inhibiteurs de la synthèse protéique agissant sur les ribosomes 70 S et les inhibiteurs de l'acide nucléique. Ils sont actifs à des concentrations atteintes *in vivo* par les doses thérapeutiques usuelles (pour les infections bactériennes). Le tableau III suivant présente les activités *in vitro* des antibiotiques et antifongiques sur *P.f.*

TABLEAU III : activités *in vitro* (CI₅₀) des antibiotiques et antifongiques sur *P.f.* (d'après McColm et McHardy, 1984).

ANTIBIOTIQUES/ANTIFONGIQUES	CI ₅₀ (µg/ml)
Pénicilline V	140
Cloxacilline	56
Flucloxacilline	166
Céphaloridine	76
Bacitracine	90
Vancomycine	98
Dihydrostreptomycine	54
Tylosine	0,245
Novobiocine	34
Rifampicine	1,20
Chloramphénicol	30
Tétracycline	24
Oxytétracycline	106
Lincomycine	75
Erythromycine	15
Colistine	122
Gramicidine D	0,0013
Valinomycine	0,0019
Amphotéricine B	42
Anisomycine	56
Chloroquine	0,0135

CI₅₀ ≥ 150 µg/ml : ampicilline, benzylpénicilline, chlortétracycline, gentamicine, kanamycine, méthicilline, néomycine, nystatine, polymyxine B, spectinomycine, streptomycine.

IV.2.2.3. Mode d'action

Les mécanismes d'action des différents antipaludiques ne sont pas à l'heure actuelle totalement élucidés. L'état des travaux dans ce domaine est pour la plupart basé sur des hypothèses.

1) Il a été démontré que les amino-4-quinoléines et les amino-alcools inhibent les protéases acides qui permettent la dégradation de l'hémoglobine. Le mode d'action de la chloroquine est directement lié à l'inhibition de la séquestration de la ferriprotoporphyrine (qui est un produit lytique de la décomposition de l'hémoglobine à l'intérieur du parasite) dans l'hémozoïne, permettant au complexe d'exercer son effet lytique sur les membranes du parasite par une perméabilité anormale provoquant une perte massive d'ions K^+ intracellulaire des érythrocytes parasités.

2) La chloroquine se concentre dans la vacuole digestive du parasite soit par la formation directe du complexe avec la ferriprotoporphyrine, soit par le gradient de pH, suivi par la formation du complexe. La formation du complexe empêche la séquestration de la ferriprotoporphyrine dans le pigment malarique.

3) La chloroquine inhibe l'enzyme et bloque l'approvisionnement des acides aminés provenant de l'hémoglobine. Faute d'une quantité suffisante d'acides aminés, les parasites seront inhibés.

L'inhibition de l'enzyme entraîne l'accumulation de son substrat, la ferriprotoporphyrine, qui à elle seule, est toxique sur les parasites.

4) Une autre hypothèse est que l'accumulation des antipaludiques dans la vacuole s'effectue grâce à leur propriété de base faible. Les amino-4-quinoléines et les amino-alcools agissent sur le parasite en augmentant le pH à l'intérieur de la vacuole et inhibant les fonctions normales de cet organite.

5) Les antimétabolites inhibent la synthèse de l'ADN : antifoliques et antifoliniques agissent sur la voie de biosynthèse de l'acide folique. Les antifoliques (sulfamides et les sulfones) sont des analogues de l'acide para-aminobenzoïque et sont en concurrence avec lui vis-à-vis de la dihydrooptérate synthétase. Les antifoliniques (pyriméthamine, proguanil) inhibent la réductase de l'acide dihydrofolique. La spécificité d'action des antimétabolites contre les plasmodies est basée sur la haute affinité de ces antipaludiques pour les enzymes plasmodiales par rapport aux enzymes des cellules hôtes.

6) Les antibiotiques inhibent la synthèse protéique au niveau des ribosomes 70S des

mitochondries chez le plasmodium.

V. MATERIEL ET METHODES

V. MATERIEL ET METHODES

V.1. Cadre de l'étude

L'étude phytochimique a été réalisée à la Faculté des Sciences de la Santé (Université de Ouagadougou) dans le laboratoire de Pharmacognosie. L'étude pharmacologique a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie du Centre Muraz (Bobo-Dioulasso).

V.2. Matériel

V.2.1. Matériel végétal

La drogue végétale, récoltée en Octobre 1998 à Tita dans la province du Bulkiemdé au Burkina Faso, est constituée par des rhizomes de la plante. Elle a été séchée à l'abri de la lumière puis pulvérisée.

V.2.2. Matériel biologique

- Les souris NMRI : elles sont élevées dans les mêmes conditions : elles ont accès à l'eau et à la nourriture à volonté; elles sont soumises à une photopériode de 12 heures (de 6 heures à 18 heures) à une température de 25°C

- Le *Plasmodium berghei* : la souche, apportée de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique), est conservée *in vivo* au laboratoire par réinfestation continue de souris.

V.2.3. Autres matériels

V.2.3.1. Matériel pour l'extraction

- Verrerie (béchers, ballons, fioles)
- Percolateur
- Lyophilisateur
- Evaporateur rotatif (Rotavapor Bûché R14)

- Solvants d'extraction : éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol, eau distillée
- Dessiccateur

V.2.3.2. Matériel pour le screening phytochimique

- Microcapillaires
- Chromatoplaques (Gel de silice G₆₀ F₂₅₄)
- Cuves pour chromatographie
- Réactifs de révélation : Liebermann, chlorure ferrique , diphénylborinate de sodium
- Pulvérisateur pour CCM
- Lampe UV
- Eluants :
 - * Système S₁ : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle (2; 1; 2,5 v/v)
 - * Système S₂ : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle, acide acétique (2; 1; 2,5; 0,1 v/v)
 - * Système S₃ : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle (6 ; 2 ; 2 ; v/v)
 - * Système S₄ : acétate d'éthyle, butanol, acide formique, acide acétique, eau (7 ; 5; 1; 1; 1; v/v)

V.2.3.3. Matériel pour les tests antiplasmodiques

- Seringues
- EDTA
- Eau pour préparation injectable
- Lames porte-objet
- Réactif de Field
- Microscope
- Appareil à ultrasons
- Tween 80

V.3. Méthodes

V.3.1. L'extraction

La méthode utilisée est une percolation. La matière végétale, introduite dans le percolateur est soumise à un épuisement successif avec des solvants de polarité croissante : éther de pétrole, dichlorométhane, dichlorométhane-méthanol (7/3 v/v), dichlorométhane-méthanol (3/7 v/v), méthanol et l'eau.

V.3.1.1 .Extraction par l'éther de pétrole

La matière végétale pulvérisée (300g) est soumise à une macération avec 500 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml d'éther de pétrole. Le percolat est recueilli à raison de 1ml/mn ; évaporé sous pression réduite pour donner un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.1.2. Extraction par le dichlorométhane

Le marc issu de l'extraction précédente est soumis à une macération avec 500 ml de dichlorométhane pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml de dichlorométhane. Le percolat est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.1.3. Extraction par le dichlorométhane-méthanol (7/3 v/v)

Le marc issu de l'extraction précédente est soumis à une macération avec 500 ml d'un mélange dichlorométhane-méthanol (7/3 v/v) pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml du même mélange. Le percolat est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.1.4. Extraction par le dichlorométhane-méthanol (3/7 v/v)

Le marc issu de l'extraction précédente est soumis à une macération avec 500 ml d'un mélange dichlorométhane-méthanol (3/7 v/v) pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml du même mélange. Le percolat est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.1.5. Extraction par le méthanol

Le marc issu de l'extraction précédente est soumis à une macération avec 500 ml de méthanol pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml de méthanol. Le percolat est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.1.6. Extraction par l'eau (macéré)

Le marc issu de l'extraction précédente est soumis à une macération avec 500 ml d'eau distillée pendant 24 heures. Le mélange est percolé à l'aide de 500 ml d'eau distillée. Le percolat a été lyophilisé pour obtenir un résidu qui est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

V.3.2. Fractionnement de l'extrait le plus actif

L'extrait au dichlorométhane a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice. La colonne (1 m de long sur 3 cm de diamètre) est remplie aux 2/3 à l'aide d'une suspension pour colonne de silice dans le dichlorométhane. L'extrait à fractionner est dissout dans le dichlorométhane, et déposé au sommet de la silice. L'éluant est ensuite introduit. L'éluant est constitué de dichlorométhane contenant des proportions croissantes de méthanol (2,5; 5; 10; 12,5; 15 %).

Des fractions de 10 ml sont recueillies et analysées par CCM en utilisant le mélange cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle (3; 1; 2,5 v/v) comme éluant. La révélation est faite par chauffage à 110°C, après pulvérisation, sur les chromatoplaques, d'une solution d'acide

sulfurique à 3% dans de l'éthanol.

Les fractions qui présentent un chromatogramme similaire sont regroupées et évaporées sous pression réduite. Ces différentes fractions ont été testées pour évaluer leur activité antiplasmodique.

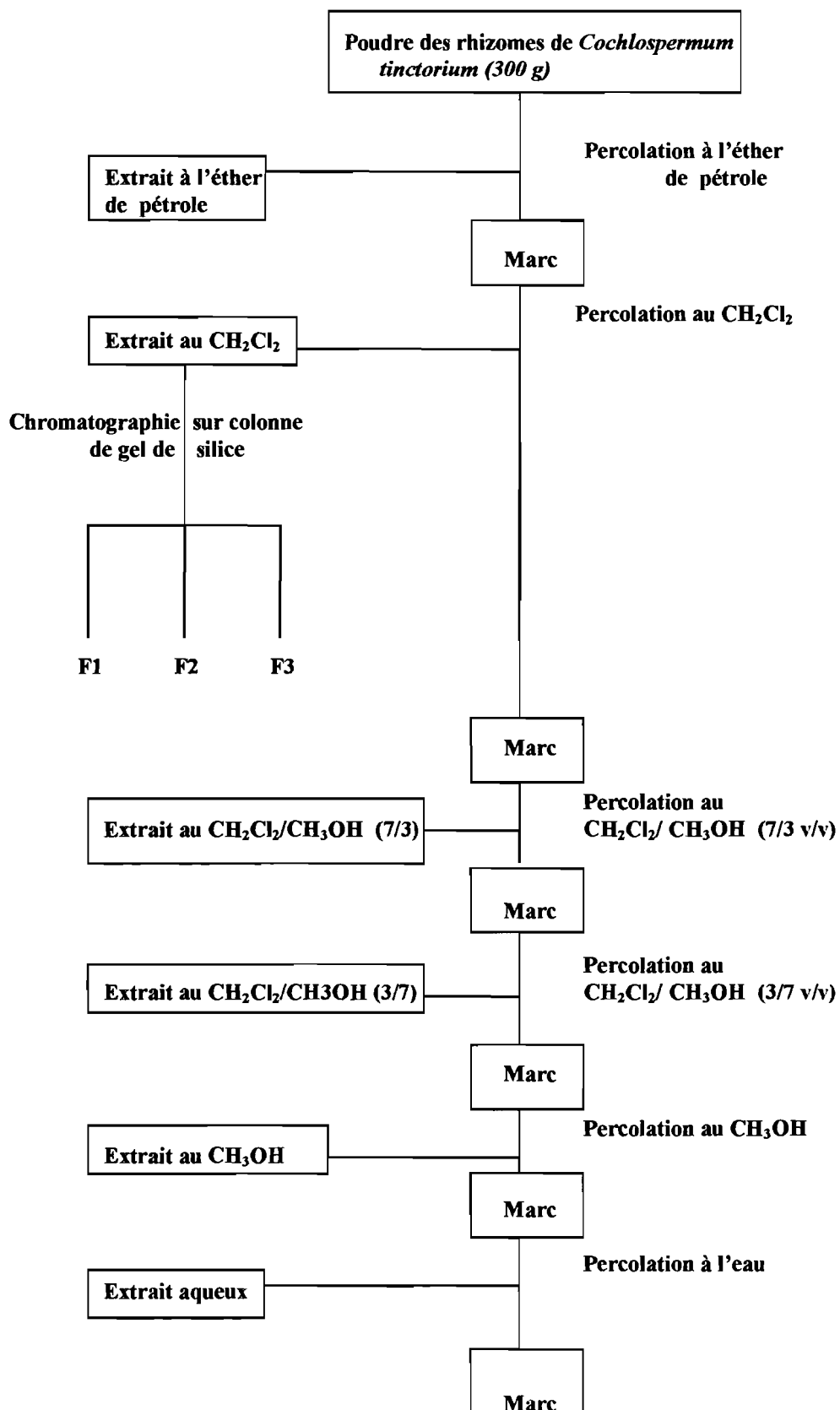


Figure 1 : Schéma d'extraction et de fractionnement des extraits de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae)

V.3.3. Screening chimique

V.3.3.1. Recherche des caroténoïdes

Support : Gel de silice G₆₀ F₂₅₄

Eluant : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle (2; 1; 2,5 v/v) (système S₁)

Solutions de dépôt

Les solutions, à la concentration de 20 mg/ml, ont été déposées à raison de 20 µl et en bande de 0,5 cm sur les chromatoplaques..

Révélation

Les chromatoplaques sont d'abord observées en lumière visible, puis observées en UV (ultraviolet) à 254 nm et 366 nm. Enfin la révélation est réalisée en pulvérisant sur les chromatoplaques une solution d'acide sulfurique à 3% dans l'éthanol. Les chromatoplaques ont été ensuite placées à l'étuve à 110°C pendant 10 mn. Dans ces conditions, les caroténoïdes donnent une coloration bleuâtre (30).

V.3.3.2. Recherche des triterpènes et des phytostérols

Support : Gel de silice G₆₀ F₂₅₄

Eluant : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle, acide acétique (2; 1; 2,5; 0,1 v/v) (système S₂).

Solutions de dépôt

Les solutions, à la concentration de 20 mg/ml, ont été déposées à raison de 20 µl et en bande de 0,5 cm sur les chromatoplaques..

Révélation

Les chromatoplaques sont d'abord observées en lumière visible, puis observées en UV (ultraviolet) à 254 nm et 366 nm. Enfin la révélation est réalisée en pulvérisant sur les chromatoplaques une solution d'acide sulfurique à 3% dans l'éthanol. Les chromatoplaques ont été ensuite placées à l'étuve à 110°C pendant 10 mn.

Dans ces conditions, les triterpènes pentacycliques donnent une coloration violette persistante. Les phytostérols et les triterpènes tétracycliques donnent une coloration violette qui vire rapidement au bleu (31).

V.3.3.3. Recherche des flavonoïdes

Support : Gel de silice G₆₀ F₂₅₄

Éluant : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle (6 ; 2 ; 2 ; v/v) (système S₃)

Solutions de dépôt

Les solutions, à la concentration de 20 mg/ml, ont été déposées à raison de 20 µl et en bande de 0,5 cm sur les chromatoplaques

Révélation

Les chromatoplaques sont d'abord observées en lumière visible, puis observées en UV (ultraviolet) à 254 nm et 366 nm. Enfin la révélation est réalisée au moyen de deux méthodes.

La première utilise les vapeurs d'ammoniaque auxquelles sont exposées les chromatoplaques. La deuxième consiste à pulvériser sur la chromatoplaque une solution à 2% de diphénylborinate sodium dans de l'éthanol.

Les flavonoïdes se caractérisent dans ces conditions par une intensification de leurs colorations (jaune, jaune orangé) en présence des deux réactifs précédemment cités

V.3.3.4. Recherche des tanins

Support : Gel de silice G₆₀ F₂₅₄

Éluant : acétate d'éthyle, butanol, acide formique, acide acétique, eau (7; 5; 1; 1; 1; v/v) : (système S₄)

Solutions de dépôt

Les solutions, à la concentration de 20 mg/ml, ont été déposées à raison de 20 µl et en bande de 0,5 cm sur les chromatoplaques.

Révélation

Les chromatoplaques sont d'abord observées en lumière visible, puis observées en UV (ultraviolet) à 254 nm et 366 nm. Enfin la révélation est réalisée en pulvérisant sur les chromatoplaques une solution de chlorure ferrique à 2% dans le mélange eau-méthanol (2/3). Dans ces conditions, l'apparition de spot bleu permet de suspecter la présence de tanins.

V.3.4. Les tests pharmacologiques

L'objectif de ces tests était d'étudier l'activité antiplasmodique des extraits et des

fractions.

Premièrement, tous les extraits ont été testés à une même dose afin de déterminer celui qui présentait la meilleure activité. Ensuite, la relation dose-effet de l'extrait antiplasmodique le plus actif a été établie.

Deuxièmement, les différentes fractions de l'extrait antiplasmodique le plus actif ont été testées à une même dose pour déterminer la plus active.

A cet effet, les souris sont réparties par lot de cinq. Les lots sont homogènes du point de vue du poids, de l'âge et du sexe. Au cours de notre étude, les poids ont varié entre 25g et 30g; l'âge entre 8 et 12 semaines.

Pour une dose donnée de la drogue à tester, un lot de cinq souris est utilisé, et le test est répété trois fois. Un lot témoin est aussi constitué. On détermine le pourcentage moyen de réduction de la parasitémie pour chaque dose testée par rapport au lot témoin.

Le test schizonticide de 4 jours a été réalisé. Les souris sont mises à jeûn 24 heures avant le test. L'alimentation reprend à J0 après l'inoculation et la première administration de la drogue.

J0 : on inocule 10^7 érythrocytes parasités par *Plasmodium berghei* en intra-péritonéale par souris. Puis on administre une demi-dose de la substance à tester le matin et l'autre le soir. Les volumes d'administration étaient de 0,2 ml de solution par administration. Les lots témoins reçoivent de l'eau pour préparation injectable.

J1 : administration d'une demi-dose le matin et d'une autre le soir.

J2 : idem

J3 : idem

J4 : - réalisation d'une goutte épaisse et d'un frottis mince du sang prélevé au niveau de la queue.

- coloration au Field.

- détermination de la parasitémie par lecture au microscope.

- détermination du pourcentage de réduction selon la formule suivante :

$$PR = (DPt - DP_s) \times 100 / DPt$$

PR : pourcentage de réduction

DPt : densité parasitaire du témoin

DPs : densité parasitaire de la souris

$$DP = (A \times 8 \cdot 10^6) / (B \times 527)$$

DP : densité parasitaire

A : nombre de globules rouges parasites comptés.

B : nombre de champs microscopiques lus.

8 . 10⁶ = nombre moyen de globules rouges par mm³ de sang chez la souris.

527 = nombre de globules rouges par champ microscopique.

V.3.5. Traitement des données

La droite de régression a été utilisée pour le traitement statistique des données expérimentales relatives à la DE₅₀. Cette droite a été établie au moyen du logiciel Excel.

VI. RESULTATS

VI. RESULTATS

VI.1. Résultats de l'étude phytochimique

VI.1.1. Résultats de l'extraction

Le tableau IV résume les résultats de l'extraction. Les rendements sont exprimés en pourcentage par rapport à la prise d'essai de départ (300 g de poudre).

Tableau IV : Résultats de l'extraction de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

	E. P.	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (7/3 v/v)	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (3/7 v/v)	CH ₃ OH	H ₂ O
Résidu (g)	15,75	1,45	2,36	6,33	5,33	9,18
Rendement (%)	5,25	0,48	0,79	2,11	1,78	3,06

E. P. : éther de pétrole

Le résidu à l'éther de pétrole présente le meilleur rendement avec 5,25% soit 15,75 g de résidu sec.

VI.1.2. Résultats du fractionnement

L'extrait au dichlorométhane, le plus actif, a donné par fractionnement sur colonne de silice trois fractions. Les quantités et rendements des fractions obtenues avec l'extrait au dichlorométhane sont présentés dans le Tableau V à partir d'une prise d'essai de 2,1 g.

Tableau V : Quantité et rendement des fractions obtenues avec l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

Fractions	Quantité (g)	Rendement (%)
I	0,73	33,72
II	1,30	60,05
III	0,04	0,02

La fraction 2 présente le meilleur rendement avec 60,05% soit 1,30g de résidu sec.

VI.1.3. Résultats de la CCM

L'extrait au dichlorométhane a manifesté l'activité antiplasmodique la plus marquée. La CCM effectuée sur cet extrait a permis de mettre en évidence des caroténoïdes à une valeur Rf de 0,89 et deux triterpènes, respectivement à des valeurs Rf de 0,61 et de 0,11 avec le système S₁.

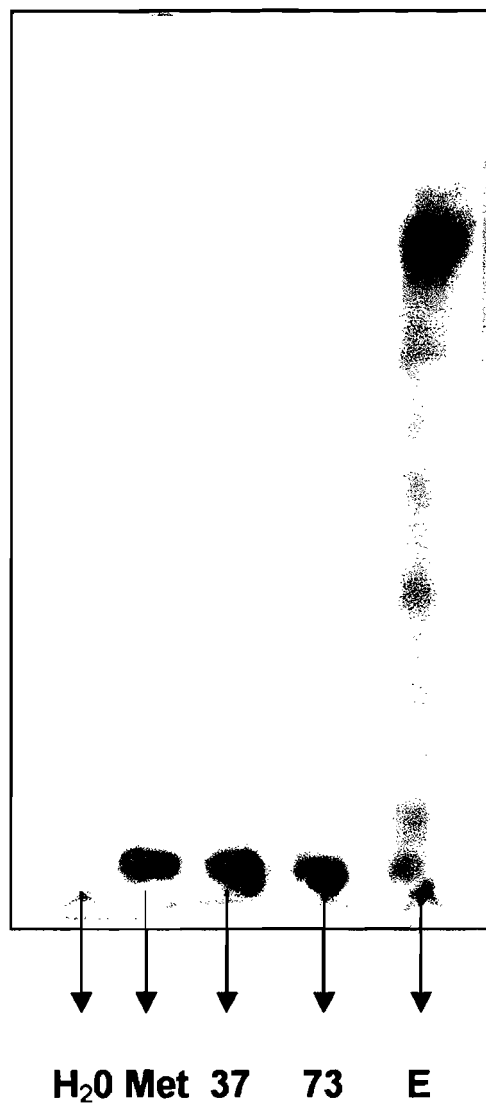
Trois fractions ont été obtenues à partir de cet extrait : F1, F2, F3. L'analyse par la CCM a mis en évidence dans la fraction F1 des caroténoïdes à une valeur Rf de 0,89. L'analyse par la CCM de la fraction F2 a mis en évidence des traces de caroténoïdes à une valeur Rf de 0,89 et deux triterpènes à des valeurs Rf de 0,61 et 0,11. Et l'analyse de la fraction F3 par la CCM a mis en évidence un triterpène à la valeur Rf de 0,11.

Le tableau VI ainsi que les figures 2 et 3 présentent les résultats de la CCM

Tableau VI : Résultats de la CCM de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

	Spots (Rf)	Colorations				
		Lumière visible	UV 254 nm	UV 366 nm	Liebermann	Groupe chimique
Extrait au CH₂Cl₂	0,89	Jaune orange	Brun	Bleu	Bleu	Caroténoïde
	0,61	-	-	-	Violet	Triterpène
	0,11	-	-	-	Violet	Triterpène
F1	0,89	Jaune orange	Brun	Bleu	Bleu	Caroténoïde
F2	0,89	Jaune orange	Brun	Bleu	Bleu	Caroténoïde
	0,61	-	-	-	Violet	Triterpène
	0,11	-	-	-	Violet	Triterpène
F3	0,11	-	-	-	Violet	Triterpène

S₂ : cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle, acide acétique (2; 1; 2,5; 0,1 v/v)



- H₂O** : Extrait aqueux
Met : Extrait méthanolique
37 : Extrait du mélange dichlorométhane méthanol (3/7 v/v)
73 : Extrait du mélange dichlorométhane méthanol (7/3 v/v)
E : Extrait du dichlorométhane

Figure 2 : Chromatogramme des extraits de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

Eluant : Cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle, acide acétique (2 ; 1 ; 2,5 ; 0,1 ; v/v)



E : Extrait au dichlorométhane

Figure 3 : Chromatogramme des fractions et de l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

Eluant : Cyclohexane, toluène, acétate d'éthyle, acide acétique (2; 1; 2,5; 0,1; v/v)

VI.2. Résultats de l'évaluation de l'activité antiplasmodique

VI.2.1. Recherche de l'extrait antiplasmodique le plus actif

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Pourcentage de réduction de la parasitémie des extraits de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae) en fonction de l'extrait (tous les extraits ont été testés à la dose de 12,5 mg/kg)

	E. P.	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (7/3 v/v)	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH (3/7 v/v)	CH ₃ OH	H ₂ O
Test 1	18	63	36	45	42	56
Test 2	20	58	30	50	49	40
Test 3	23	60	38	40	41	40
Moyenne	20	60	35	45	44	46
Ecartype	3	2	3	5	4	7

E.P. : Ether de pétrole

L'extrait au dichlorométhane manifeste la meilleure activité antiplasmodique avec 60% comme pourcentage de réduction de la parasitémie à la dose d'administration de 12,5 mg/kg.

VI.2.2. Résultats de la détermination de la DE₅₀ de l'extrait au dichlorométhane

Le tableau VIII présente les résultats de la détermination de la DE₅₀ de l'extrait au dichlorométhane.

Tableau VIII : Pourcentage de réduction de la parasitémie en fonction de la dose de l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

	2,5 mg/kg	7,5 mg/kg	12,5 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg
Test 1	18	27	61	65	87
Test 2	17	33	64	65	75
Test 3	21	31	54	54	78
Moyenne	19	30	60	61	80
Ecartype	2	3	5	6	6

On note une activité dose dépendante. Le pourcentage de réduction de la parasitémie augmente avec la dose.

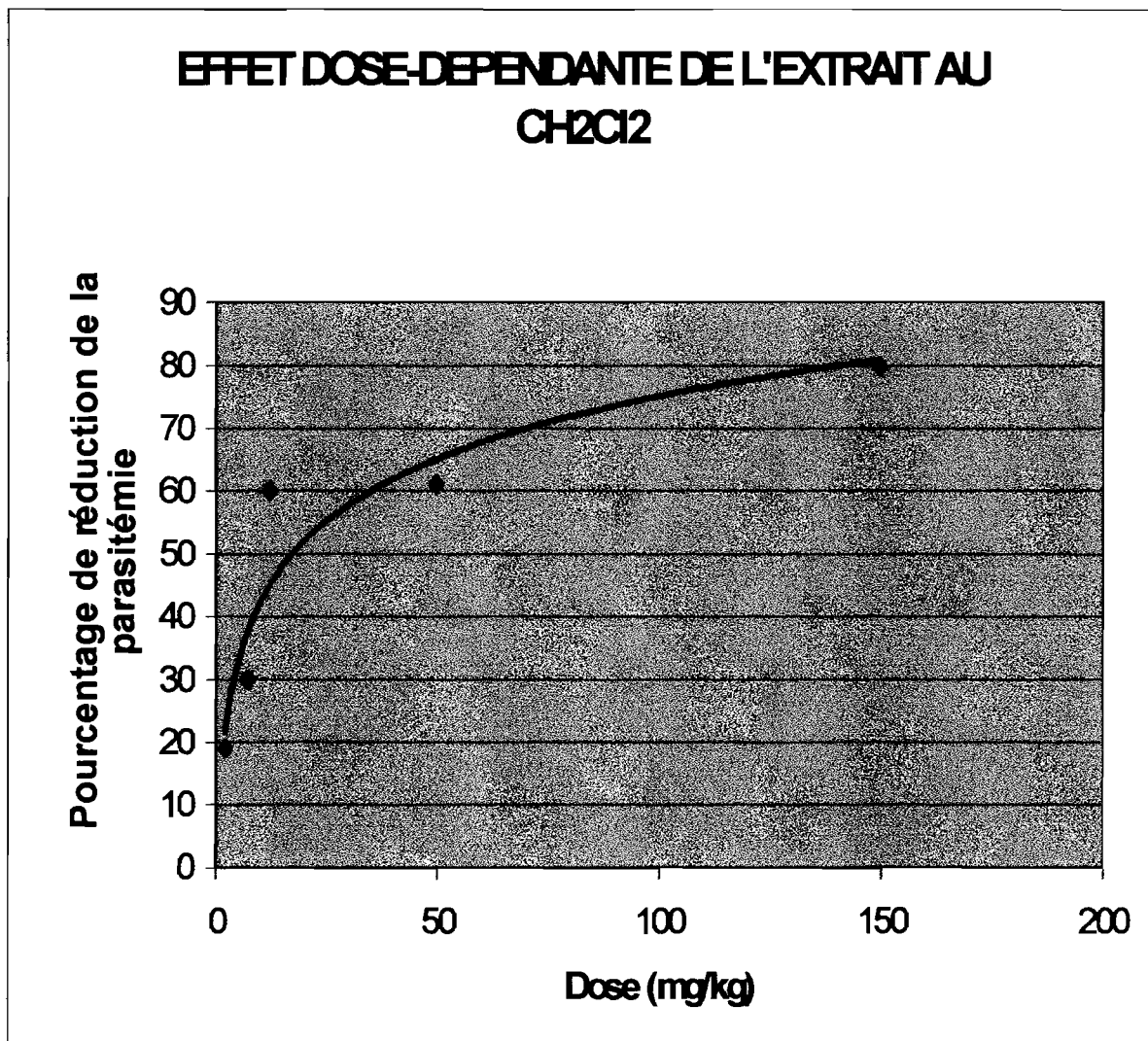


Figure 4 : représentation graphique du pourcentage de réduction de la parasitémie en fonction de la dose de l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

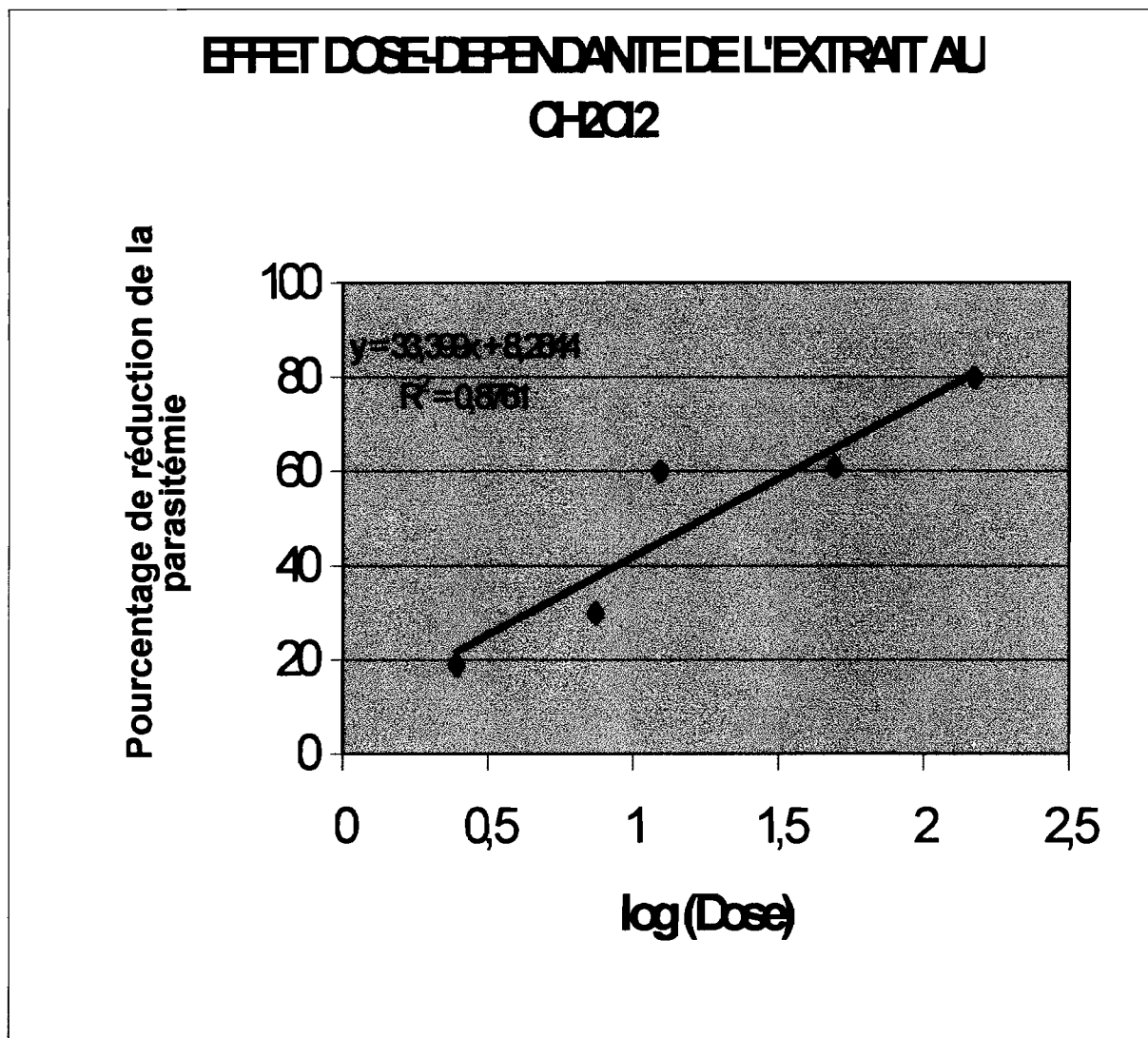


Figure 5: représentation graphique du pourcentage de réduction de la parasitémie, en fonction du logarithme décimal de la dose, de l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)

$DE_{50} = 17,59$ mg/kg

$DE_5 = 0,80$ mg/kg

$DE_{95} = 394,67$ mg/kg

La dose effet 50% déterminée est de **17,59 mg/kg.**

VI.2.3. Recherche de la fraction antiplasmodique la plus active

Le tableau IX dresse les résultats obtenus. Seuls 2 tests ont pu être effectués en raison du manque en quantité suffisante des fractions.

Tableau IX : Pourcentage de réduction de la parasitémie des fractions de l'extrait au dichlorométhane de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae)
(toutes les fractions ont été testées à la dose de 12,5 mg/kg)

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Test 1	6	9	16
Test 2	16	16	5
Moyenne	11	13	11

VII. DISCUSSION

VII. DISCUSSION

La poudre des rhizomes de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae) a été épuisée successivement par l'éther de pétrole, le dichlorométhane, le mélange dichlorométhane-méthanol (7/3 v/v), le mélange dichlorométhane-méthanol (3/7 v/v), le méthanol et l'eau. Les extraits ont été testés pour évaluer leur activité antiplasmodique à la dose de 12,5 mg/kg. Il ressort de cette évaluation que l'extrait au dichlorométhane manifeste l'activité antiplasmodique la plus marquée. En effet, à la dose de 12,5 mg/kg, cet extrait réduit la parasitémie à hauteur de 60 %. Par contre les extraits à l'éther de pétrole, au mélange dichlorométhane-méthanol (7/3 v/v), au mélange dichlorométhane-méthanol (3/7 v/v), au méthanol et à l'eau réduisent respectivement la parasitémie à hauteur de 20 %, 35 %, 45 %, 44 % et 46 %.

Des précédentes études, une activité antiplasmodique a été obtenue avec des extraits issus de solvants apolaires comme l'extrait au dichlorométhane. Nous pouvons citer l'exemple d'une étude de Traoré-Keita et coll.(32) qui ont trouvé des principes antiplasmodiques dans l'extrait chloroformique. El-Tahir et coll. (33, 34), dans une étude *in vitro*, ont trouvé la meilleure activité antiplasmodique dans l'extrait au dichlorométhane. Ajaiyeoba et coll. (35) ont obtenu un extrait hexanique comme extrait le plus actif dans une étude de l'activité antiplasmodique *in vivo* sur des souris. C'est également le cas de Alves et coll. (36) qui ont aussi obtenu une activité antiplasmodique dans l'extrait hexanique dans une étude *in vitro*. O'Neill et coll. (37) dans une étude *in vivo* sur des souris à partir d'extraits ont identifié les quassinoides (qui sont des métabolites des triterpènes) comme actifs sur *Plasmodium berghei*.

L'extrait au dichlorométhane présente une activité dose dépendante. Nous avons ainsi déterminé la DE₅₀ qui est de 17,59 mg/kg. A titre de comparaison, Balkouma (12) a obtenu une DE₅₀ de 36,44 mg/kg à partir de l'extrait hydroalcoolique total de la même plante. Nous pouvons constater que la méthode d'extraction par épuisement successif permet de concentrer davantage les constituants antiplasmodiques de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. (Cochlospermaceae). En effet, la DE₅₀ que nous avons obtenue à partir de l'extrait au dichlorométhane est 2 fois plus petite que celle de Balkouma.

En poursuivant notre comparaison, la DE₅₀ se rapproche de celle de la quinine qui est de 14,59 mg/kg selon une étude menée par Balkouma. La DE₅₀ de l'extrait au dichlorométhane reste supérieure à celle des dérivés de l'artémether qui est de 5 à 8 mg/kg selon des études menées par O'Neill et coll. (38); et inférieure à celle de la méfloquine qui, d'après les études de

RESUME

De précédentes études ont montré l'activité antiplasmodique *in vitro* et *in vivo* de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae). La présente étude s'est proposée de contribuer à l'identification des principes antiplasmodiques de cette plante.

Pour cela, nous avons effectué un épuisement successif sur la poudre des rhizomes de la plante avec des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, dichlorométhane-méthanol 7/3 v/v, dichlorométhane-méthanol 3/7 v/v, méthanol, eau). Les extraits obtenus ont été testés à la même dose de 12,5 mg/kg, selon le test schizonticide de 4 jours de Peters. Ces tests ont été réalisés en intrapéritonéale sur des souris NMRI infestées par *Plasmodium berghei*. L'extrait le plus actif a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les différentes fractions ont été testées à la même dose de 12,5 mg/kg selon le même test schizonticide de 4 jours. Un screening phytochimique au moyen de la CCM, de l'extrait le plus actif et des fractions issues de cet extrait, a été réalisé. Ce screening avait pour but d'établir une relation constituant chimique - activité antiplasmodique

L'extrait au dichlorométhane a présenté une meilleure activité avec une DE₅₀ de 17,59 mg/kg. Les fractions F1, F2 et F3 de l'extrait au dichlorométhane n'ont pas montré une activité significative. Du point de vue du screening phytochimique, l'analyse des chromatogrammes de l'extrait au dichlorométhane et de ses fractions a mis en évidence des triterpènes et des caroténoïdes.

Ces résultats nous ont amenés à émettre l'hypothèse selon laquelle les caroténoïdes pourraient être les composés antiplasmodiques majeurs de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae).

Mots clés : triterpène, caroténoïde, activité antiplasmodique, *Plasmodium berghei*, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich

SUMMARY

SUMMARY

Previous studies have showed the antiplasmodic activity of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae). The aim of the present phytochemical and pharmacological study is to contribute to the identification of the active constituents from this plant.

For this purpose, the rhizomes of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae) were powdered and successively extracted with petroleum ether, dichloromethan, dichloromethan-methanol (7/3 v/v), dichloromethan-methanol (3/7 v/v), methanol and water. All the extracts have been tested at the same dose of 12,5 mg/kg according to the schizonticid test of 4 days of Peters. The tests have been carried out on NMRI mice infected with *Plasmodium berghei* by intraperitoneal injections. The most active extract has been fractionated by column chromatography. The different fractions have also been tested at the dose of 12,5 mg/kg according to the same schizonticid test. The TLC (Thin Layer Chromatography) has been used in order to establish a relationship between the chemical constituents and antiplasmodic activity.

The dichloromethan extract has presented the best activity, with an ED₅₀ of 17,59 mg/kg. The fractions F1, F2, and F3 of the dichloromethan extract did not show a significant activity. The phytochemistry study has showed that triterpenes and carotenoids were present in the dichloromethan extract and its fractions.

These results suggest us the hypothesis that the carotenoids could be the major antiplasmodic constituents from *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae).

Key words : triterpen, carotenoid, antiplasmodic activity, *Plasmodium berghei*, *Cochlospermum tinctorium* A. Rich

IX. REFERENCES

IX. REFERENCES

1. Golvan Y. J.

Eléments de parasitologie médicale. Flammarion 4^{ème} Ed, Paris 1983, 571p

2. Gentilini M., Danis M., Richard-Lenoble D.

Maladies parasitaires. Ed J.B., Baillères, 1981, 253p.

3. O.M.S.

Aide mémoire n° 94 révisé Octobre 1998.

4. Zabré S. E.

Etude couplée *in vivo/in vitro* de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à l'amodiaquine versus chloroquine en milieu périurbain de Bobo-Dioulasso. Thèse de doctorat en médecine N°44, FSS, UO, 1997-98

5. Vial H., Ancelin M. L., Calas M., Bikii J., Ringwald P., Herrera S.

Paludisme : vers le développement d'un nouveau modèle pharmacologique. *Bulletin de l'OCEAC*, vol 31, 1^{er} trimestre, 1998, pp 46-55

6. Guiguemdé T. R., Coulibaly N., Coulibaly S. O., Ouédraogo J. B., Gbary A. R.

Esquisse d'une méthode d'estimation du coût économique chiffré des accès palustres : application à une zone rurale au Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*, vol 2, July 1997, 646-653

7. Mbugua J.K.

Conférence panafricaine sur le paludisme. *Afrique Médecine et Santé* N°8, 11-12/1998

8. Sanon V. M.

Etude du coût financier de la prise en charge globale du paludisme en milieu pédiatrique de Ouagadougou. Thèse de doctorat en médecine n°6, FSS, UO, 1998-1999

9. Mamba M. L.

Schémas thérapeutiques du paludisme et chimiorésistance. *Malaria/Paludisme et maladies infectieuses en Afrique*, vol 1, 1994, 38-44.

10. Bryskier A., Labro M.T.

Paludisme et médicaments. Ed Arnette, 1988, 276 p

11. Sombié I.

Etude des connaissances et pratiques des tradipraticiens en matière de palu à Bobo-Dioulasso et à Ouagadougou. Thèse de doctorat en médecine n°16, FSS, UO, 1994

12. Balkouma P.

Etude de l'activité antiplasmodique de l'extrait hydroéthanolique de *Cochospermum tinctorium* chez la souris NMRI infestée par *Plasmodium berghei*. Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté de médecine et de pharmacie, Université du Mali, 1999.

13. Coulibaly M.

Contribution à l'étude *in vitro* de l'activité antiplasmodique de huit plantes médicinales du Burkina Faso. Thèse de doctorat en sciences, FAST, UO, 1996.

14. Benoît F., Valentin A., Pelissier Y., Marion C., Dakuyo Z., Maillie M and Bastide J. M.

Antimalarial activity *in vitro* of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(1995) 217-218

15. Adjanohoun E.J., Ake Assi L., Floret J.J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi A.M.R., Raynal J.

Médecine traditionnelle et pharmacopée : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du Mali. A.C.C.T., 1980

16. Adjanohoun E.J., Ahyi A.M.R., Ake Assi L., Akpagana K., Chibou P., El-hadji A., Eyme J., Garba M., Gassita J-N., Gbeassor M., Goudote E., Guinko S., Houdoto K.K., Houngnon P., Keita A., Keoula V., Kwaga-Ocloo W.P., LO I., Siamevi K.M., Taffame K.K.,

Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo, A.C.C.T., 1980

17. Guinko S.

Végétation de la Haute-Volta. Thèse de doctorat ès sciences naturelles, Université de Bordeaux III, 1984, Tome I, 318p.

18. Bouquet A., Debray M.

Plantes médicinales de la Côte-d'Ivoire. Travaux et documents de l'ORSTOM n°32, Ed de l'ORSTOM, Paris, 1974, 231p

19. C.V.R.S.

Notes et documents voltaïques, Janvier-Mars 1973.

20. Diallo B., Vanhaelen M.

Large scale purification of apocarotenoids from *Cochlospermum tinctorium* by counter-current chromatography. *Journal of liquid chromatography*, 1988, 11(1),227-231

21. Diallo B., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R.

Studies on inhibitors of skin-tumor promotion. Inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod*, 1989, 11(4), 879-81

22. Diallo B., Vanhaelen M., Kiso Y., Hikino H.

Antihepatotoxic actions of *Cochlospermum tinctorium* rhizomes. *J Ethnopharmacol* , 1987, Aug;20(3):239-43

23. Diallo B., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M., Fiegel C., Joyeux M., Roland A.

and Fleurentin J.

Further studies on the hepatoprotective effects of *Cochlospermum tinctorium* rhizomes. *J Ethnopharmacol*, 36 (1992) 137-142

24. Ouédraogo J.B., Guiguemdé T. R., Traoré M., Dakuyo Z., Sanou A.

Etude de l'efficacité parasitologique du *N'Dribala* dans le traitement du paludisme. *Science et Technique*, 1992, vol 20, pp 45-53

25. Benoit-Vical F., Valentin A., Mallie M., Bastide J.M., Bessière J.M.

In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *Cochlospermum planchonii* extracts and essential oils. *Planta Med* 1999 May;65(4):378-81

26. Ministère de la santé, Programme national de lutte contre le paludisme

Directives nationales pour une prise en charge rationnelle des cas du paludisme au Burkina Faso (Traitement curatif et chimioprophylaxie), 2^{ème} version, Janvier 2000

27. World Health Organisation

Terminology of malaria eradication., WHO Technical Report Series, , Geneva, 1963, 243.

28. Bruce-Chwatt L.J., Black R.H., Canfield C.J., Clyde D.F., Peters W., Wernsdorfer W.H.

Chemotherapy of malaria. WHO, 2nd Ed, Geneva, 1986, 260p

29. Guiguemdé T.R., Gbary A.R, Ouédraogo J.B., Gayibor A., Lamizana L., Maïga A.S., Boureima H.S., Comlarvi C.E., Faye O., Niang S.D.,

Current aspects of malarial chemoresistance of subjects autochtones in the OCCGE countries. *Ann Soc Belg Med Trop* 1991 Sep;71(3):199-207

30. Basco L. K, Ruggeri C., Le Bras J.

Molécules antipaludiques. Ed Masson, Paris Milan Barcelone, 1994, 364p

31. Bruneton J.

Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2e édition, Paris: Technique et

documentation, 1987

32. Traore-Keita F., Gasquet M., Di Giorgio C., Ollivier E., Delmas F., Keita A., Balansard G., Timon-David P.,

Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. *Phytother Res* 2000 Feb;14(1):45-47

33. El-Tahir A., Satti G.M., Khalid S.A.

Antiplasmodial activity of selected sudanese medicinal plants with emphasis on *Acacia nilotica*. *Phytother Res* 1999 Sep;13(6):474-8

34. El-Tahir A., Satti G.M., Khalid S.A.

Antiplasmodial activity of selected sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytemus senegalensis* (Lam.) Exeel. *J Ethnopharmacol* 1999 Mar;64(3):227-33

35. Ajaiyeoba E.O., Abalogu U.I., Krebs H.C., Oduola A.M.

In vivo antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *J Ethnopharmacol* 1999 Nov 30;67(3):321-5 *Chung Ping Tsa Chih* 1992;10(2):120-3

36. Alves T.M., Nagem T.J., De Carvalho L.H., Krettli A.V., Zani C.L.

Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. *Planta Med* 1997 Dec;63(6):554-5 1989

37. O'Neill M.J., Bray D.H., Boardman P., Chan K.L., Phillipson J.D., Warhurst D.C., Peters W.

Plants as sources of antimalarial drugs, Part 4 : Activity of *Brucea javanica* fruits against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *J Nat Prod* 1987 Jan-Feb;50(1):41-8

38. O'Neill P.M., Searle N.L., Kan K.W., Starr R.C., Maggs J.L., Ward S.A., Raynes K., Park B.K.

Novel, potent, semisynthetic antimalarial carba analogues of the first generation 1,2,4-trioxane artemether. *J Med Chem* 1999 Dec 30;42(26):5487-93

39. Xy Y., Shao B.R., Chu Y.H.

The blood schizontocidal effects of pyronaridine, amodiaquine, mefloquine and qinghaosu on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng* 1992;10(2):120-3

40. Shankar A.H., Genton B., Semba R.D., Baisor M., Paino J., Tamja S., Adiguma T., Wu L., Rare L., Tielsch J.M., Alpers M.P., West K.P. Jr

Effect of vitamin A supplementation on morbidity due to *Plasmodium falciparum* in young children in Papua New Guinea: a randomised trial. *Lancet* 1999 Jul 17;354(9174):203-9

41. Davis T.M., Skinner-Adams T.S., Beilby J.

In vitro growth inhibition of *Plasmodium falciparum* by retinol at concentrations present in normal human serum. *Acta Trop* 1998 May;69(2):111-9

42. Obih P.O., Makinde M., Laoye O.J.

Investigations of various extracts of *Morinda lucida* for antimalarial actions on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Afr J Med Med Sci* 1985 Mar-Jun; 14(1-2):45-9

43. Nikiéma J-B.

Contribution à l'étude phytochimique et pharmacologique de *Leptadenia hastata*. Thèse de doctorat ès sciences pharmaceutiques, Université Libre de Bruxelles, 1997.

44. Steele J.C., Warhurst D.C., Kirby G.C., Simmonds M.S.

In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res* 1999 Mar;13(2):115-9

45. Brinmann G., Saeb W., Assi L.A., Francois G., Sankara Narayanan A.S., Peters K.

Betulinic acid : isolation from *Triphyllum peltatum* and *Ancistrocladus heymanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med* Jun;63(3):255-57

46. Kitagawa I., Mahmud T., Simanjuntak P., Hori K., Uji T., Shibuya H.

Indonesian medicinal plants. VIII. Chemical structures of three new triterpenoids,

bruceajavanin A, dihydrobruceajavanin A, and bruceajavanin B, and a new alkaloidal glycoside, bruceacanthinoside, from the stems of *Brucea javanica* (Simaroubaceae). *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1994 Jul;42(7):1416-21

47. Rochnakij S., Thebtaranonth Y., Yenjai C., Yuthavong Y.

Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica*, inhibits *Plasmodium falciparum* in culture.

Southeast Asian J Trop Med Public Health 1985, Mar;16(1):66-72

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.