

**BURKINA FASO
UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU**

**UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES DE LA SANTE UFR/SDS**

SECTION PHARMACIE

Année Universitaire 2003-2004

Thèse N° 30

**ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTIVITE
ANTIPLASMODIQUE DES EXTRAITS AQUEUX DE
LA TISANE COMPOSEE SAYE (*Cassia alata* Linn ;
Cochlospermum planchonii Hook ; *Phyllanthus
amarus* Schum et Thonn) CHEZ LA SOURIS NMRI
INFESTEE PAR *Plasmodium berghei***

THESE DE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLÔME D'ETAT)

Présentée et soutenue publiquement le 13 mai 2004 par :

**Aïda DIALLO épouse TIENDREBEOGO
Née le 16 mai 1974 à Ouagadougou**

JURY

Président : Pr I. Pierre GUISSOU
Membres : Pr T. Robert GUIGUEMDE
Pr Odile NACOULMA
Directeur de thèse : Pr T. Robert GUIGUEMDE
Co-Directrice : Dr Maminata TRAORE

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

**Unité de formation et de Recherche
des Sciences de la Santé
(UFR/SDS)**

LISTE DES RESPONSABLES ADMINISTRATIFS

Directeur	Pr. Ag. Mamadou SAWADOGO
Directeur Adjoint	Pr. Ag. Arouna OUEDRAOGO
Coordonateur de la Section Médecine	Pr. Ag. Arouna OUEDRAOGO
Coordonateur de la Section Pharmacie	Pr. Ag. Mamadou SAWADOGO
Directeur des stages de la section Médecine	Pr Ag. Alain BOUGOUMA
Directeur des stages de la section Pharmacie	Dr Jean Baptiste NIKIEMA
Secrétaire Principal	Mr. Fakouo TRAORE
Service Administratif, Financier et Comptable	Mr. Lazare DOUAMBA
Scolarité	Mme Kadi ZERBO
Bibliothèque	Mme Mariam TRAORE
Secrétaire du Directeur	Mme Juliette DIARI
Secrétaire du Directeur Adjoint	Mme Hakiéta KABRE

LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR/SDS
AU TITRE DE L'ANNEE 2003 / 2004

ENSEIGNANTS PERMANENTS

Professeurs titulaires

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
Blaise SONDO	Santé Publique
Joseph Y. DRABO	Médecine Interne/Endocrinologie

Maîtres de Conférences

Kongoré Raphaël OUEDRAOGO	Chirurgie –Traumatologie
François René TALL	Pédiatrie
Piga Daniel ILBOUDO	Gastro-entérologie
Ludovic KAM	Pédiatrie
Jean LANKOANDE	Gynécologie-Obstétrique
Kampadilemba OUOBA	Oto Rhino Laryngologie
Issa SANOU *(en détachement)	Pédiatrie
Albert WANDAOGO	Chirurgie Pédiatrique

Adama LENGANI	Néphrologie
Adama TRAORE	Dermatologie – Vénérologie
Arouna OUEDRAOGO	Psychiatrie
Joachim SANOU	Anesthésie-Réanimation
Théophile L.TAPSOBA	Biophysique - Médecine Nucléaire
Mamadou SAWADOGO	Biochimie
Michel AKOTIONGA	Gynécologie-Obstétrique
Alain BOUGOUMA	Gastro-Entérologie
Rabiou CISSE	Radiologie
Blami DAO	Gynécologie- Obstétrique
Georges KI-ZERBO	Maladies Infectieuses
Jean Gabriel OUANGO	Psychiatrie
Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE	Bactériologie-Virologie
Daman SANO	Chirurgie Viscérale
Patrice ZABSONRE	Cardiologie

Maîtres-Assistants

Abdoulaye TRAORE	Santé Publique
Lady Kadidiatou TRAORE	Parasitologie
Si Simon TRAORE	Chirurgie Viscérale
Ali NIAKARA	Cardiologie
Boubakar TOURE	Gynéco-Obstétrique
Boubacar NACRO	Pédiatrie

Kapouné KARFO	Psychiatrie
Abel KABRE	Neuro-Chirurgie
Athanase MILLOGO	Neurologie
Jean Baptiste NIKIEMA	Pharmacognosie
YE Diarra / OUATTARA	Pédiatrie
Pingwendé BONKOUNGOU	Pédiatrie
Nazinigouba OUEDRAOGO	Réanimation / Physiologie
Antoinette TRAORE / BELEM	Pédiatrie
Maïmouna DAO / OUATTARA	ORL
Timothée KAMBOU	Chirurgie Urologique
Abel Y. BAMOUNI	Radiologie
Alain ZOUBGA	Pneumologie
KYELEM Nicole Marie / ZABRE	Maladies Infectieuses
Laurent OUEDRAOGO	Santé Publique
André K. SAMANDOULOGOU	Cardiologie
Claudine Léonie LOUGUE / SORGHO	Radiologie
Emile BANDRE	Chirurgie générale et digestive
Lassana SANGARE	Bactériologie-Virologie
Martial OUEDRAOGO	Pneumo-Phtisiologie
Pascal Antoine NIAMPA	Dermatologie Vénérologie
Nonfounikoun Dieudonné MEDA	Ophtalmologie
Apollinaire SAWADOGO	Gastro-Entérologie
Issa Touriddomon SOME	Chimie Analytique

Lucie Valérie Adélaïde NEBIE	Cardiologie
Rasmané SEMDE	Pharmacie Galénique
Arsène M. D. DABOUE	Ophtalmologie
Moussa BAMBARA	Gynécologie-Obstétrique
Fatou BARRO	Dermatologie Vénérologie
Françoise Danielle MILLOGO / TRAORE	Gynécologie-Obstétrique
Olga GOUMBRI / LOMPO	Anatomie Pathologique
Théodore OUEDRAOGO	Anatomie Humaine
Abdel Karim SERME	Gastro-Entérologie
Blandine THIEBA	Gynécologie-Obstétrique
Robert O. ZOUNGRANA	Physiologie Humaine

Assistants

Christophe S. DA	Chirurgie Traumatologique
Elie KABRE	Biochimie
Eléonore KAFANDO	Eléonore
Moussa KERE	Santé Publique
NACOULMA Eric	Hématologie
Innocent NACOULMA	Orthopédie-Traumatologie
Dieudonné OUEDRAOGO	Chirurgie maxilo - faciale
Théodore Z. OUEDRAOGO	Santé Publique
Jean SAKANDE	Biochimie
Aurélien Jean SANON	Chirurgie Digestive
Idrissa SANOU	Bactériologie - Virologie
Syranyan SEKOULE	Psychiatrie

Enseignants à temps plein

Hamadé OUEDRAOGO

Anesthésie - Réanimation
Physiologie

Moussa OUEDRAOGO

Pharmacologie

Rigobert THIOMBIANO

Maladies Infectieuses

DEDICACES

A MON PERE

Pour tant de sacrifices consentis, puisse cette thèse répondre à tes attentes. Ton courage et ton amour pour le travail nous serviront toujours d'exemple. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Que Dieu te donne longue vie et te garde en très bonne santé.

A MA MERE

Toute petite tu m'as toujours protégée et guidée. Tu as été pour tes enfants un modèle de courage. Grâce à cette qualité, tu nous as encouragés et soutenus dans nos études. Ce travail est aussi le couronnement de tes efforts et sacrifices de mère à notre écoute. Que le bon Dieu te donne longue vie et te garde en très bonne santé.

A MON FRERE ALY

Ton affection ne m'a jamais fait défaut même en des périodes difficiles. Que le sentiment fraternel qui nous lie se resserre davantage. Merci pour tout.

A MES BEAUX PARENTS

Les mots sont pauvres pour vous exprimer ce que je ressens. Vous m'avez toujours prise comme l'une de vos filles. Ce travail m'offre enfin l'occasion de vous exprimer une toute petite partie de ma gratitude et de vous formuler des souhaits dont le plus cher est de voir vos petits enfants vous combler de joie.

A MON EPOUX ADORE

Ta patience, ta compréhension tout le long de ce travail sont d'une valeur inestimable. Je ne te remercierai jamais assez pour tout le soutien que tu m'as apporté. Que ce travail nous apporte la joie, la concorde et que l'amour qui nous unit grandisse chaque jour. J'espère que tu en es fier.

A MA FILLE MELISSA

Tu as apporté beaucoup de joie dans ma vie. Tu es une petite fille adorable et je prie pour que le bon Dieu t'accorde une longue vie et te donne une santé de fer. Que ce travail t'inspire une voie d'ambition.

A MES BELLES SŒURS : OUMOU, KADY, AICHA, MINA, ISABELLE, SONIA

Vous êtes pour moi des sœurs car vous avez toujours été là quand j'en avais besoin. Ce travail me donne l'occasion de vous dire merci pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

A MES NEVEUX ET NIECES

Que ce travail vous serve d'exemple. Je vous souhaite un brillant avenir.

A TOUTE LA GRANDE FAMILLE DIALLO

REMERCIEMENTS

AU Dr DAKUYO

Merci pour tout le soutien dont j'ai bénéficié tout au long de ce travail.

AU Dr MAMINATA TRAORE

Sincères remerciements.

Au Dr Jean Baptiste Nikiema

Cette œuvre est le résultat de votre présence à nos côtés, de vos conseils et de vos encouragements. Toute ma reconnaissance pour les enseignements de qualité que j'ai reçus de vous. Votre rigueur scientifique doublée de votre modestie font de vous un exemple à suivre. Merci.

AU Dr JEANNE MILLOGO

Merci pour vos conseils.

A NOS MAITRES DE STAGE

Pour l'encadrement reçu. Merci à tous.

A TOUS LES ENSEIGNANTS DE L'UFR/SDS

Pour la formation reçue. Merci.

TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DU CENTRE MURAZ

Dr Diabaté, Dr Zéba, Dr Ali Drabo, Roch, Hermann, Jérémi, Major Bakary, El Hadji Tamboula, Patrice, Odile, Léa, Adama Djiguemdé etc.

Pour les services rendus, la bonne ambiance et les encouragements.

Entière reconnaissance.

AU PERSONNEL DE L'IRSS

Dr Somé Noya, Dr Sourabié Seydou, Dr Kini B.Félix, Dr Sylvain Ouédraogo, Dr Marius Lompo, Mr Yaro Boubacar, Mr Kadéba Do Casimir, Mr Kinda Dieudonné, Fati.

Pour votre contribution à la réalisation de ce travail. Merci à tous.

A FREDERIC MARIMATHU

Merci pour tout le soutien que tu nous as apporté. Je te souhaite à toi et ta famille beaucoup de bonheur.

A MES BEAUX FRERES (Yves et Hyacinthe)

Merci de m'avoir soutenue jusqu'au bout.

A TANTI AWA BARRY

Pour ta gentillesse et pour les précieux conseils que tu m'as donnés.

A Mr ET Mme ROAMBA

Merci pour votre soutien tout au long de ce travail.

A Mme SOGOTI MARIE LAURE

Merci de m'avoir soutenue.

A Mr BOGNONOU DU CNRST

Merci pour tout.

A Mr OUATTARA ISSOUF DU CNRST

Qui a contribué à l'identification des plantes. Merci pour votre aide.

A MEYER, KADY, RUTH, LASSINA, DONASIEN

Pour tous les moments inoubliables passés et pour les souvenirs des amitiés estudiantines. Merci.

A TOUS CEUX QUE JE N'AI PAS PU CITER DANS CE TRAVAIL

Recevez mes sincères remerciements .

A NOS MAITRES & JUGES

A notre Maître et Président de Jury

Professeur Innocent Pierre GUISSOU

Professeur Titulaire de Pharmacologie-Toxicologie à L'UFR/SDS

Chef du département ME.PHA.TRA./PH à L'I.R.S.S

**Chef du laboratoire de biochimie au Centre Hospitalier Universitaire
de Ouagadougou**

Nous avons eu l'honneur de bénéficier de vos enseignements théoriques et pratiques, et nous avons été marquée par votre rigueur scientifique. Malgré vos nombreuses sollicitations, vous avez accepté de présider le jury de notre thèse. Nous admirons votre simplicité et votre disponibilité.

Veillez trouver ici, l'expression de notre profond respect.

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE

Professeur Titulaire de parasitologie à L'UFR/SDS

Chef du laboratoire de Parasitologie - Entomologie

Coordonnateur du Réseau d'Afrique de L'Ouest pour le

Traitement Antipaludique (RAOTAP II)

Expert de l'OMS

Général de Brigade

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de nous confier ce travail. Votre présence à nos côtés, en dépit de vos multiples occupations, votre rigueur et votre amour du travail bien fait, ont permis d'aboutir à cette œuvre. Nous avons été séduite par vos immenses qualités humaines et scientifiques.

Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Professeur Odile Germaine Nacoulma / OUEDRAOGO

Maître de Conférences à l'UFR/SVT

Chef du département de Biochimie et Microbiologie à l'UFR/SVT

**Directrice du Laboratoire de Biochimie et Chimie Appliquée
(La.Bio.C.A)**

**Responsable de la chaire UNESCO " Femmes, Science et
Développement en Afrique"**

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en siégeant dans le jury de notre thèse. Nous avons déjà bénéficié de vos enseignements en Biochimie.

Vous nous donnez encore l'occasion de profiter de vos connaissances.

Veillez accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance.

“ Par délibération, l’Unité de Formation et de Recherche 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 ”.

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION.....	5
II	ENONCE DU PROBLEME.....	7
III	OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	9
III.1	OBJECTIF GENERAL	9
III.2	OBJECTIFS SPECIFIQUES	9
IV	GENERALITES SUR LE PALUDISME	11
IV.1	EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME	11
IV.1.1	<i>Le parasite.....</i>	<i>11</i>
IV.1.2	<i>Le cycle évolutif des plasmodies.....</i>	<i>11</i>
IV.1.3	<i>Les vecteurs.....</i>	<i>15</i>
IV.1.4	<i>Le Plasmodium berghei.....</i>	<i>15</i>
IV.2	SYMPTOMATOLOGIE DU PALUDISME	16
IV.2.1	<i>Les accès palustres simples.....</i>	<i>16</i>
IV.2.2	<i>Le paludisme viscéral évolutif.....</i>	<i>17</i>
IV.3	PHYSIOPATHOLOGIE DU PALUDISME	18
IV.3.1	<i>Les accès simples.....</i>	<i>18</i>
IV.3.2	<i>Les accès pernicioeux.....</i>	<i>18</i>
IV.4	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME	19
IV.4.1	<i>Le diagnostic parasitologique.....</i>	<i>19</i>
IV.4.2	<i>Le diagnostic immunologique.....</i>	<i>20</i>
IV.5	TRAITEMENT DU PALUDISME	21
IV.5.1	<i>La classification des antipaludiques.....</i>	<i>21</i>
IV.5.2	<i>Les molécules antipaludiques.....</i>	<i>23</i>
IV.5.3	<i>Le mode d'action des antipaludiques.....</i>	<i>26</i>
IV.5.4	<i>Le traitement étiologique du paludisme.....</i>	<i>31</i>
IV.6	MOLECULES ANTIPLASMODIALES D'ORIGINE VEGETALE	32
IV.6.1	<i>Les alcaloïdes.....</i>	<i>32</i>
IV.6.2	<i>Les terpènes.....</i>	<i>36</i>
IV.6.3	<i>Les quinones et les composés phénoliques.....</i>	<i>37</i>

IV.7	CHIMIORESISTANCE	37
IV.7.1	<i>La définition</i>	37
IV.7.2	<i>Le mécanisme de la chimiorésistance</i>	37
IV.7.3	<i>Les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance</i>	39
IV.7.4	<i>La chimiorésistance au Burkina Faso</i>	43
V	LE SAYE	45
V.1	MODE DE PREPARATION DU SAYE	45
V.2	MODE D'UTILISATION DU SAYE	46
V.2.1	<i>La tisane</i>	46
V.2.2	<i>Les gélules</i>	46
VI	PLANTES COMPOSANTES DE LA TISANE SAYE	47
VI.1	CASSIA ALATA LINN (CAESALPINIACEAE)	47
VI.1.1	<i>Les données botaniques</i>	47
VI.1.2	<i>Les données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques</i>	48
VI.1.3	<i>La chimie</i>	49
VI.1.4	<i>La pharmacologie</i>	50
VI.2	COCHLOSPERMUM PLANCHONII HOOK(COCHLOSPERMACEAE)	54
VI.2.1	<i>Les données botaniques</i>	54
VI.2.2	<i>Les données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques</i>	54
VI.2.3	<i>La chimie</i>	55
VI.2.4	<i>La pharmacologie</i>	56
VI.3	PHYLLANTUS AMARUS SCHUM ET THONN (EUPHORBIACEAE)	59
VI.3.1	<i>Les données botaniques</i>	59
VI.3.2	<i>Données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques</i>	60
VI.3.3	<i>La chimie</i>	61
VI.3.4	<i>La pharmacologie</i>	62
VII	MATERIEL ET METHODES	68
VII.1	CADRE DE L'ETUDE	68
VII.2	MATERIEL	68
VII.2.1	<i>Le matériel végétal</i>	68
VII.2.2	<i>Le matériel biologique</i>	68
VII.2.3	<i>Le matériel d'étude phytochimique</i>	69

VII.3	METHODES.....	72
VII.3.1	<i>L'étude phytochimique</i>	72
VII.3.2	<i>L'étude toxicologique : recherche de la DL₅₀</i>	78
VII.3.3	<i>L'étude de l'activité antiplasmodique</i>	79
VII.3.4	<i>L'analyse des résultats</i>	81
VIII	RESULTATS.....	83
VIII.1	RESULTATS DE L'ANALYSE PHYTOCHIMIQUE	83
VIII.1.1	<i>Le rendement de l'extraction</i>	83
VIII.1.2	<i>Les groupes chimiques caractérisés</i>	83
VIII.1.3	<i>Les dosages des composés phénoliques</i>	92
VIII.2	L'EXTRAIT AQUEUX LE PLUS ACTIF	93
VIII.3	LA DL ₅₀ DU DECOCTE AQUEUX	94
VIII.4	LA DE ₅₀ ET LA DE ₉₀ DU DECOCTE AQUEUX	96
VIII.5	ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE DE LA CHLOROQUINE SULFATE	99
VIII.6	ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE COMPAREE DU DECOCTE AQUEUX DE SAYE ET DE LA CHLOROQUINE SULFATE A LA DOSE DE 5 MG/KG	99
IX	DISCUSSION	102
IX.1	CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS AQUEUX DE SAYE.....	102
IX.1.1	<i>Les composés polyphénoliques</i>	103
IX.1.2	<i>Les terpènes</i>	104
IX.2	DOSAGE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES DANS LES EXTRAITS AQUEUX (DECOCTE, INFUSE, MACERE)	105
IX.3	ETUDE PHARMACOLOGIQUE	105
IX.3.1	<i>La recherche de l'extrait le plus actif</i>	105
IX.3.2	<i>La toxicité du décocté aqueux de Saye</i>	106
IX.3.3	<i>L'activité antiplasmodique du décocté aqueux</i>	107
X	CONCLUSION	110
XI	SUGGESTIONS.....	111
XII	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113

Liste des sigles et abréviations

OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
WHO	:	World Health Organisation
<i>P.f</i>	:	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.v</i>	:	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P.o</i>	:	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P.m</i>	:	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. berghei</i>	:	<i>Plasmodium berghei</i>
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
CQ	:	Chloroquine
FP	:	Ferriprotoporphyrine
ATP	:	Adénosine triphosphate
PAB	:	Acide para-amino benzoïque
LDH	:	Lactate Déshydrogénase
pH	:	Potentiel hydrogène
IRSS	:	Institut de Recherche en Science de la Santé
CIRDES	:	Centre International de Recherche-Développement de l'Élevage en zone Subhumide
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
DO	:	Densité Optique
qsp	:	Quantité suffisante pour
NMRI	:	Naval Medecin Research Institute
DL₅₀	:	Dose Létale 50 %
DE₅₀	:	Dose Efficace 50 %
DE₉₀	:	Dose Efficace 90 %
Comp.	:	Comprimé
Eppi	:	Eau pour préparation injectable
IP	:	Intrapéritonéale
UV	:	Ultra-violet
HCl	:	Acide chlorhydrique
FeCl₃	:	Chlorure ferrique

Liste des Figures

<u>Figure 1</u>	:	Cycle des plasmodiums humains.....	14
<u>Figure 2</u>	:	<i>Cassia alata</i> Linn.....	53
<u>Figure 3</u>	:	<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.....	58
<u>Figure 4</u>	:	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum et Thonn.....	66
<u>Figure 5</u>	:	Chromatogramme des triterpènes des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye	87
<u>Figure 6</u>	:	Chromatogramme des flavonosides aglycones des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye.....	88
<u>Figure 7</u>	:	Chromatogramme des anthracénosides aglycones des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye.....	89
<u>Figure 8</u>	:	Chromatogramme des tanins galliques des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye.....	90
<u>Figure 9</u>	:	Chromatogramme des saponosides des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye	91
<u>Figure 10</u>	:	Courbe de toxicité générale du décocté aqueux de Saye Chez la souris en IP.....	95
<u>Figure 11</u>	:	Courbe dose-effet de l'activité antiplasmodique du décocté aqueux de Saye chez la souris en IP.....	98

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u>	:	Classification des antipaludiques.....	22
<u>Tableau II</u>	:	Résultats du rendement des extractions du <i>Saye</i>	83
<u>Tableau III</u>	:	Groupes chimiques mis en évidence mis en évidence par Caractérisation chimiques dans les extraits aqueux et les hydrolysats des extraits aqueux.....	84
<u>Tableau IV</u>	:	Caractéristiques des groupes chimiques mis en évidence par CCM dans les extraits aqueux.....	86
<u>Tableau V</u>	:	Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits aqueux.....	92
<u>Tableau VI</u>	:	Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits aqueux	92
<u>Tableau VII</u>	:	Pourcentages d'inhibitions parasitaires du décocté, de l'infusé et du macéré à la dose de 5mg/kg.....	93
<u>Tableau VIII</u>	:	Mortalité des souris en fonction de la dose administrée par voie IP.....	94
<u>Tableau IX</u>	:	Echelle de toxicité d'après Hodge et Sterner.....	96
<u>Tableau X</u>	:	Pourcentages moyens de réduction de la parasitémie en fonction des doses administrées par voie IP.....	97
<u>Tableau XI</u>	:	Pourcentages moyens de réduction de la parasitémie en fonction des doses de chloroquine sulfate administrées.....	99
<u>Tableau XII</u>	:	Pourcentages de réduction de la parasitémie du décocté aqueux et de chloroquine sulfate à la dose de 5mg/kg.....	100

INTRODUCTION

I Introduction

Décrit depuis le deuxième siècle avant Jésus-Christ, le paludisme humain (malaria) est une parasitose transmise à l'homme par la femelle d'un moustique du genre Anophèle. L'expression clinique de la maladie est extrêmement variable, allant d'un portage asymptomatique jusqu'au neuropaludisme avec un risque de décès important.

Le paludisme demeure une menace majeure pour la santé et un obstacle au développement socio-économique des individus, des communautés, et des nations surtout en Afrique subsaharienne où l'on recense la majorité des cas de morbidité et de létalité.

En Afrique subsaharienne, et notamment au Burkina Faso, les malades ont recours à la médication traditionnelle dans plus de 80% des cas avant de se rendre dans les formations sanitaires. Cela est dû au coût prohibitif des antipaludiques modernes et aux croyances. La pharmacopée traditionnelle peut receler des plantes à activité antipaludique comme cela a été avec le Qinghaosu, plante utilisée en Chine et dont a été extrait l'artémisinine. Les dérivés synthétiques de cette molécule représentent aujourd'hui l'une des alternatives thérapeutiques du paludisme chimiorésistant (Malvy et al., 2000).

Le *Saye*, recette du Dr Dakuyo P. Zéphérin, pharmacien d'officine exerçant à Banfora (Burkina Faso), est une association de trois plantes (*Cassia alata* Linn (Caesalpiniaceae), *Cochlospermum planchonii* Hook (Cochlospermaceae), *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn (Euphorbiaceae)), utilisée au Burkina Faso dans le traitement du paludisme simple. C'est dans le but d'évaluer l'activité pharmacologique de cette tisane que nous avons mené cette étude.

Ce travail a consisté à effectuer une étude *in vivo* de l'activité antiplasmodique des extraits aqueux de la tisane composée *Saye* chez la souris NMRI infestée par le *Plasmodium berghei* et à identifier les groupes chimiques présents dans ces extraits aqueux.

ENONCE DU PROBLEME

II *Enoncé du problème*

Le paludisme prédomine dans les régions tropicales et intertropicales du globe où il sévit à l'état endémique avec des expressions variables suivant les biotopes.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 1997), le paludisme touche 300 à 500 millions de personnes par an dont 1,5 à 2,7 millions meurent. Cette maladie tue un enfant toutes les 30 secondes dans le monde (OMS, 1998). L'Afrique subsaharienne supporte le plus lourd fardeau avec plus de 90% des cas et des décès.

Le Burkina Faso connaît un paludisme endémique avec des taux de morbidité et de mortalité élevés. Cette situation a amené le pays, à travers son ministère de la santé, à adhéré à la stratégie mondiale de lutte antipaludique adoptée à la conférence d'Amsterdam en 1992, par l'élaboration d'un programme national de lutte antipaludique (PNLP). Une des composantes essentielles de cette stratégie est le diagnostic précoce et le traitement adéquat des accès palustres. Cependant malgré toutes les stratégies de lutte contre le paludisme, basées essentiellement sur la lutte antivectorielle avec l'utilisation de moustiquaires imprégnées et la chimiothérapie, le paludisme continue de sévir.

Du fait de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*, et de l'absence de vaccin à l'horizon immédiat, renouveler le traitement du paludisme est devenu une urgence (OMS, 2001). De nouveaux médicaments tels que la méfloquine, l'halofantrine, l'artémisinine et dérivés, l'atovaquone / proguanil ont été découverts aux cours de ces 20 dernières années (OMS, 1998). Cependant, il faut continuer la recherche en vue de développer des thérapeutiques qui contribueront à améliorer la santé de nos populations. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude sur le Saye.

Objectifs de l'étude

III Objectifs de l'étude

III.1 Objectif général

Etudier *in vivo* l'activité antiplasmodique des extraits aqueux de la tisane composée Saye (*Cassia alata* Linn (Caesalpinaceae); *Cochlospermum plachonii* Hook (Cochlospermaceae); *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn (Euphorbiaceae)) chez la souris NMRI infestée par *Plasmodium berghei* .

III.2 Objectifs spécifiques

- Caractériser par chromatographie sur couche mince et par une analyse qualitative les groupes chimiques des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de la tisane composée Saye .
- Déterminer la DL₅₀ de l'extrait aqueux le plus actif chez la souris NMRI.
- Déterminer la DE₅₀ de l'extrait aqueux le plus actif chez la souris NMRI, comparativement à la chloroquine sulfate.

Généralités sur le paludisme

IV Généralités sur le paludisme

IV.1 Epidémiologie du paludisme

IV.1.1 Le parasite

Le parasite responsable du paludisme est un protozoaire de l'ordre des *Haemosporididae*, sous ordre des *Eucoccidia*, de la famille des *Plasmodidae* et appartenant au genre *Plasmodium*. Les quatre espèces plasmodiales pathogènes pour l'homme sont :

- *Plasmodium falciparum* (*P.f*) appartenant au sous genre *Laverania* est répandu sur l'ensemble de la zone intertropicale.
- *Plasmodium vivax* (*P.v*) bien que possédant une large répartition est peu important en Afrique tropicale.
- *Plasmodium malariae* (*P.m*) est plus fréquent en Afrique tropicale.
- *Plasmodium ovalae* (*P.o*) est essentiellement retrouvé en Afrique centrale, surtout occidentale.

La plus pathogène de ces espèces est le *P.f* car elle est responsable des formes encéphaliques potentiellement mortelles.

IV.1.2 Le cycle évolutif des plasmodies

Le cycle de tous les plasmodiums humains est essentiellement le même. Il comprend une phase exogène sexuée (sporogonie) avec multiplication chez des anophèles femelles, vecteurs du paludisme, et une phase endogène asexuée (schizogonie) avec multiplication chez l'homme.

Cette dernière phase où le parasite est constamment haploïde comprend une phase de développement dans les hépatocytes (schizogonie pré ou exoérythrocytaire) et un cycle de développement dans les érythrocytes (schizogonie érythrocytaire).

a) Le parasite chez l'anophèle

Les gamétocytes, stade sanguin sexué des plasmodies, sont ingérés par l'anophèle femelle au cours d'un repas sanguin. Par un processus d'exflagellation, un gamétocyte mâle donne en quelques minutes huit gamètes mâles haploïdes, chacun pouvant fusionner avec un gamète femelle haploïde. Cette fécondation aboutit à la formation d'un ookinète diploïde qui traverse activement la paroi stomacale du moustique et forme à la surface externe de cette paroi, un oocyste, moins de 24 heures après le repas sanguin. A l'intérieur de cet oocyste, les cellules parasitaires se multiplient pour libérer près d'un millier de sporozoïtes haploïdes au bout de quelques jours. La durée de cette période diminue quand la température augmente. A 28°C, elle est de 9 à 10 jours pour le *P.f*, 8 à 10 jours pour le *P.v*, 12 à 14 jours pour le *P.o* et 14 à 16 jours pour le *P.m*. A 20°C, par contre, elle est de l'ordre de 3 semaines pour le *P.f*.

Lorsque la température est inférieure à 18°C, le *P.f* n'est généralement plus transmis. Il en est de même pour *P.v* et *P.m* à des températures inférieures à 15°C. Moins de 25% des sporozoïtes libérés des oocystes réussissent à gagner les glandes salivaires. Ils s'y accumulent (souvent plus d'un millier) et finissent leur maturation.

b) Le parasite chez l'homme

Les sporozoïtes inoculés restent quelques minutes à une demi-heure dans la peau, passent dans la lymphe puis dans le sang. Beaucoup sont détruits par les macrophages. Certains (un à quelques dizaines) envahissent des hépatocytes. Les sporozoïtes forment alors des schizontes pré-érythrocytaires qui se développent en quelques jours (5 à 7 jours pour le *P.f* ; 6 à 8 jours pour le *P.v* ; 9 jours pour le *P.o* ; 14 à 16 jours pour le *P.m*) et libèrent des milliers de mérozoïtes dans le sang (*P.f* : 30000 ; *P.m* et *P.o* : 15000 ; *P.v* : 8000 à 20000).

La plupart des mérozoïtes envahissent les érythrocytes en moins d'une minute. Certains sont phagocytés. Le délai entre l'infection par les sporozoïtes et la détection des stades sanguins s'appelle la période pré-patente. Elle dure généralement 9 à 11 jours pour le *P.f*, 11 à 13 jours pour le *P.v*, 10 à 14 jours pour *P.o* et 15 à 16 jours pour le *P.m*. Seuls *P.v* et *P.o* peuvent entrer dans une phase dormante (hypnozoïte), au lieu d'évoluer directement en schizonte dans l'hépatocyte. Cette phase peut durer plusieurs mois avant l'entrée en schizogonie pré-érythrocytaire et être responsable de rechutes tardives.

Les mérozoïtes envahissent les érythrocytes par invagination de la membrane cellulaire. Dans l'érythrocyte, le parasite prend une forme en anneau, le trophozoïte, absorbe l'hémoglobine et libère un pigment appelé hémozoïne. Après une période de croissance, le trophozoïte âgé entre dans un processus de division : la schizogonie érythrocytaire.

Lorsque les schizontes sont matures, les érythrocytes éclatent et libèrent des mérozoïtes (*P.f* : 8 à 24, en moyenne 16 ; *P.m* : 8 ; *P.o* : 8 à 10 ; *P.v* : 12 à 18) ainsi que de nombreux débris cellulaires et parasitaires responsables des accès de fièvre. La schizogonie érythrocytaire dure approximativement 48 heures pour le *P.f*, *P.v* et *P.o* et 72 heures pour *P.m*.

Les hématies parasitées par des trophozoïtes âgés de *P.f* disparaissent habituellement de la circulation périphérique vers la 24^{ème} heure du cycle et sont séquestrées dans les capillaires des organes profonds comme le cerveau, le cœur, la rate, les intestins, la moelle osseuse, le placenta où se déroule la deuxième moitié du cycle (schizogonie). Dans certaines circonstances, cette séquestration est responsable de formes graves du paludisme (Pouvelle et al. , 2000).

Les mérozoïtes, ayant envahi les hématies, peuvent produire des formes sanguines sexuées (gamétocytes). Ce n'est qu'après plusieurs cycles de schizogonie érythrocytaire que les gamétocytes sont produits en grand nombre et deviennent détectables. Avant de pouvoir être infectants pour un anophèle femelle, ils subissent une maturation en macrogamétocyte (femelle) et en microgamétocyte (mâle).

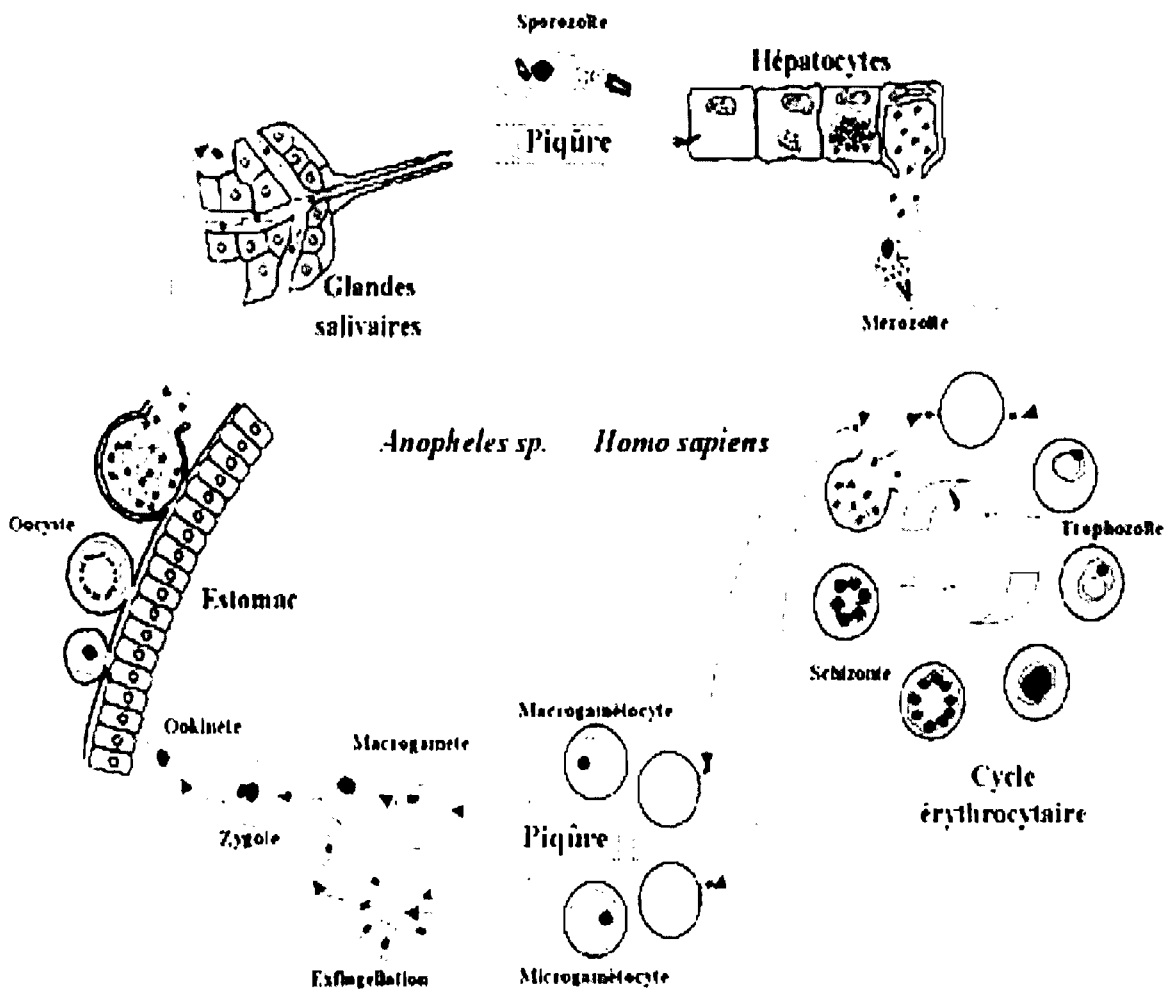


Figure1: Cycles des plasmodiums humains

Source : Saissy J.M. Paludisme grave. Arnette. Paris, 2001

IV.1.3 Les vecteurs

Les vecteurs sont des moustiques qui appartiennent tous au genre *Anopheles* de la famille des *Culicidae*, de l'ordre des Diptères.

L'anophèle est un moustique fortement anthropophile. Les mâles et les femelles se nourrissent de jus sucrés, de nectars et autres sécrétions végétales, mais seules les femelles ont en plus un régime hématophage.

Ce sont les femelles qui jouent un rôle actif dans la dissémination de la maladie. Les repas de sang apportent à la femelle les éléments protéiniques nécessaires à la maturation ovarienne.

IV.1.4 Le Plasmodium berghei

Le *Plasmodium berghei* (*P.berghei*) est un parasite des rats, des souris et des hamsters. Il infecte aussi certaines espèces de moustiques telle que *Anopheles stephensis*. Il est très virulent et fatal pour les jeunes souris et les rats.

L'infection à *P.berghei* commence par l'injection de sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires d'un moustique infesté. La schizogonie exoérythrocytaire se déroule dans les hépatocytes. Cette phase dure 48 à 60 heures et donne des mérozoïtes.

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

Ces gamétocytes deviennent des gamètes et donneront après fécondation un ookinète qui se transformera en oocyste. L'oocyste mature libère des sporozoïtes qui se localisent dans les glandes salivaires pendant 10 à 12 jours.

Ce cycle de développement est semblable à celui des plasmodiums humains.

IV.2 Symptomatologie du paludisme

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses dans leur expression et dans leur gravité. Elles dépendent à la fois du parasite (espèce plasmodiale et densité parasitaire) et de son hôte (réceptivité génétique et état immunitaire). Elles vont de l'accès fébrile aigu, avec ou sans défaillance viscérale grave, au parasitisme sanguin prolongé quasi asymptomatique, en passant par un paludisme sub-aigu avec anémie et cachexie.

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 les accès de primo-invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique. De même le paludisme évolutif viscéral peut en principe, être déterminé par toutes les espèces plasmodiales. 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 hémoglobinurique pour *P.f*, la néphrite quarte pour *P.m*.

Enfin, l'âge de l'hôte (enfant) ou de son état (femme enceinte) impriment des particularités cliniques.

IV.2.1 Les accès palustres simples

Les accès palustres simples comprennent les accès de primo-invasion et les accès palustres à fièvre périodique.

a) Les accès de primo-invasion

Les accès de primo-invasion se révèlent être tout à fait atypiques sous formes d'un tableau "d'embarras gastrique fébrile". La fièvre atteignant 39°C à 40°C s'accompagne de malaise général avec myalgies, céphalées et douleurs abdominales, des nausées ou vomissements et parfois une diarrhée.

Une hépatomégalie peut parfois être retrouvée associée ou non à une oligurie.

b) Les accès palustres à fièvre périodique

Les accès palustres à fièvre périodique succèdent rapidement à la précédente. Il s'agit d'un accès fébrile, précédé de prodromes évoquant un épisode grippal, qui se caractérise par la succession de trois stades :

- Stade de frissons avec fièvre à 39°C et splénomégalie.
- Stade de chaleur où la température atteint 40°C à 41°C.
- Stade de sueurs avec chute de la température.

La symptomatologie est le plus souvent atypique. Classiquement :

- Le *P.f* provoque la fièvre tierce maligne (fièvre survenant toutes les 48 heures).
- Le *P.o* et *P.v* provoquent la fièvre tierce bénigne.
- Le *P.m* provoque la fièvre quarte (fièvre survenant toutes les 72 heures).

IV.2.2 Le paludisme viscéral évolutif

Les signes cliniques sont généralement frustrés et la gravité tient au retard diagnostique.

Les symptômes sont l'anémie, l'asthénie, l'anorexie, parfois une dyspnée, des oedèmes des membres inférieurs, un souffle systolique anorganique et une splénomégalie.

Pour les cas où le diagnostic est rapide, le traitement permet une sédation des symptômes et une normalisation des paramètres biologiques sans séquelles.

IV.3 *Physiopathologie du paludisme*

IV.3.1 Les accès simples

La fièvre est due à l'éclatement des rosaces qui libère dans le torrent circulatoire un pigment malarique. Celui-ci se comporte comme une substance pyrogène. Si l'éclatement des rosaces est asynchrone, la fièvre est intermittente, tierce ou quarte, selon la périodicité de la schizogonie (48 ou 72 heures) (Gentillini, 1993).

L'anémie résulte de la lyse des hématies parasitées. La splénomégalie et l'hépatomégalie, habituellement au bout d'un certain temps d'évolution, témoignent de l'hyperactivité et de la congestion de la rate et du foie.

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

IV.3.2 Les accès pernicioeux

Par ses manifestations viscérales, neurologiques et rénales, l'accès pernicioeux palustre, dont la physiopathologie n'est pas parfaitement élucidée, reste une érythrocytopathie parasitaire. Il doit ses particularités symptomatiques à la multiplication rapide 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 une anémie hémolytique, des troubles de la circulation et des phénomènes cytotoxiques (Gentillini, 1993).

IV.4 Diagnostic biologique du paludisme

IV.4.1 Le diagnostic parasitologique

a) Le frottis mince et la goutte épaisse

Les prélèvements sanguins sont effectués au bout du doigt de préférence avant toute prise d'antipaludiques.

La recherche de parasites s'effectue sur la goutte épaisse et le frottis, colorés par la méthode de Field ou de Giemsa qui teinte le cytoplasme en bleu et le noyau en rouge.

L'examen de la goutte épaisse doit constituer la première étape. Si les parasites sont présents, l'espèce plasmodiale devra être identifiée par l'examen du frottis. L'aspect morphologique des hématies est différent selon les espèces. L'association frottis-goutte épaisse doit être systématique; elle se pratique volontiers sur la même lame. La lecture se fait au microscope optique à l'objectif x 100.

Pour le frottis sanguin, la lecture s'effectue sur la base de 400 hématies par champ à raison de 4000000 d'hématies par micro-litre (μl) de sang. Les résultats sont exprimés en densité parasitaire qui est le nombre d'hématies parasitées par μl de sang.

Pour la goutte épaisse, la lecture s'effectue sur 1000 leucocytes sur la base de 6000 leucocytes par μl de sang.

b) Le QCB (Quantitative Buffy Coat)

Son principe est basé sur l'utilisation de tubes (tube QCB) contenant de l'acridine orange qui colore tout organisme contenant de l'ADN / ARN. La coloration du noyau de l'hématozoaire par l'acridine orange facilite ainsi son observation avec un microscope muni de lumière UV.

Les composants de cette méthode font d'elle un test de diagnostic direct du paludisme simple et sensible car ils permettent de détecter jusqu'à 1 ou 2 parasites par micro litre de sang. Le QCB est un test facile, rapide mais cher.

IV.4.2 Le diagnostic immunologique

Les méthodes immunologiques sont surtout utilisées pour les études séro-épidémiologiques en zone d'endémie. Elles permettent :

- La mise en évidence des anticorps :

C'est une méthode peu courante utilisée principalement en épidémiologie. L'immunofluorescence et l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sont les plus utilisées. Elle n'a aucun intérêt pour la mise en évidence des parasites chez les malades.

- La mise en évidence des antigènes :

C'est une technique qui permet de détecter la présence du parasite, quand bien même les examens parasitologiques pour une raison ou une autre se sont révélés négatifs. Cette technique est inutile en zone d'endémie, les habitants de ces zones étant très parasités.

➤ Le Parasight :

C'est un test de diagnostic facile, rapide, précis et fiable mais cher, dont le principe est basé sur la détection qualitative de l'antigène de la malaria à *P.f.*, Histidine Rich Protein II (HRP) sur du sang total. Cette méthode utilise des "bandelettes d'essai" qui permettent la détection du complexe antigène soluble-anticorps sous forme d'une bande colorée visible à l'œil nu.

D'autres techniques permettent d'effectuer le diagnostic du paludisme :

- L'OptiMal :

C'est un test de diagnostic qui consiste à rechercher la LDH (Lactate Déshydrogénase) spécifique du parasite en utilisant des anticorps monoclonaux adsorbés sur une bandelette.

C'est un test simple, sensible, spécifique et cher.

- La PCR (Polymérase Chain Reaction) :

C'est un processus d'amplification de l'ADN parasitaire utilisant des stades de dénaturation et d'amplification du matériel génétique. Il permet de détecter 1 plasmodium dans 10 ml de sang. La PCR est un test de diagnostic compliqué, sensible et cher.

IV.5 *Traitement du paludisme*

IV.5.1 La classification des antipaludiques

Les antipaludiques sont classés en fonction de divers critères comme présentés dans le tableau I :

- Le point d'impact du principe actif.
- Le délai d'action du principe actif.
- L'origine du principe actif.
- La famille chimique du principe actif.

Tableau I : Classification des antipaludiques

Point d'impact du principe actif	Délai d'action du principe actif	Origine du Principe actif	Famille chimique du Principe actif	DCI (Dénomination Commune Internationale)	Spécialités
Schizontocides	Action Rapide	Naturelle	Alcaloïdes du quinquina	Quinine Quinidine Cinchonidine	Quinoforme® Quinimax®
			Sesquiterpènes	Qinghaosu	Arsumax® Paluther® Arinate®
		Synthèse	Amino-4-quinoléines	Chloroquine Amodiaquine	Nivaquine® Résochine® Flavoquine® Camoquin®
			Amino-arylalcools	Méfloquine Halofantrine	Lariam® Méphaquin® Halfan®
	Sulfones		Diaminodiphénylsulfone	Disulone®	
	Sulfamides		Sulfadoxine	Fanasil®	
	Diguanides		Chlorhydrate de proguanil	Paludrine®	
	Diamino-pyrimidines		Pyrimétamine	Daraprim®	
	Gamétocytocides	Action lente	Associations et combinaisons	Sulfadoxine/ Pyriméthamine	Fansidar®
				Sulfadoxine/ Pyriméthamine/ Méfloquine	Fansimef®
Artéméter / Luméfantrine				Coartem®	
Artésunate / Amodiaquine				Co - Arinate® Arsucam®	
Artésunate / Méfloquine				Artequin®	
Chloroquine / Proguanil				Savarine®	
Atovaquone / Proguanil				Malarone®	
Chlorproguanil / Dapsone				Lapdap®	
Amino-8-quinoléines				Primaquine	Primaquine®

IV.5.2 Les molécules antipaludiques

a) Les schizontocides

Les schizontocides agissent sur les formes endoérythrocytaires du cycle schizogonique.

- Les alcaloïdes du Quinquina

Parmi les quatre principaux alcaloïdes extraits du quinquina : quinine, quinidine, cinchonine et cinchonidine, seule la quinine demeure l'antipaludique majeur (médicament de l'accès grave et de l'urgence). La quinidine, isomère de la quinine, est parfois utilisée. La quinine est utilisée dans le traitement d'urgence du paludisme grave à *P.f.* On la rencontre sous les noms : Quinimax®, Quinoforme®, Arsiquinoforme®.

- Les amino-4-quinoléines

Les amino-4-quinoléines font partie des premiers antipaludiques de synthèse. Actuellement la chloroquine (Nivaquine®, Résochine®) et l'amodiaquine (Flavoquine®, Camoquin®) sont les plus utilisés du fait de leur tolérance, de leur efficacité, et de leur faible coût.

Les amino-4-quinoléines doivent rester la règle en traitement curatif, en l'absence de résistance.

- Les aryl-amino-alcools

Cette famille d'antipaludiques schizontocides sanguins comprend les médicaments déjà disponibles comme l'halofantrine (Halfan®) et la méfloquine (Lariam®).

Ce sont des médicaments très efficaces sur la phase aiguë de la maladie et leur utilisation est préconisée surtout en zone de chloroquinorésistance.

- Le Qinghaosu (artémisinine)

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la très grande efficacité du qinghaosu aussi bien sur l'accès simple que sur l'accès grave.

Le dérivé artésunate est présenté sous forme de comprimé à 50mg (Arsumax®) et le dérivé artéméther sous forme d'ampoule injectable à 80 mg (Paluther®).

- Les antifoliques et les antifoliniques

Ce groupe d'antipaludiques agit en bloquant la synthèse des acides nucléiques. Il comprend :

➤ Les antifoliques

Les antifoliques regroupent les sulfamides (sulfadoxine : Fansil®) et les sulfones (diaminodiphénylsulfone : Disulone®). Ils sont actifs sur les souches de *P.f* chloroquinorésistantes.

Quatre règles prévalent dans leur emploi (Gentillini, 1993) :

- Viser à une prise unique.
- Ne pas recourir aux sulfamides en prophylaxie mais plutôt aux sulfones.
- Réserver leur emploi aux zones de résistance aux amino-4-quinoléines.
- Toujours associer un sulfamide ou une sulfone à un autre antipaludique.

➤ Les antifoliques

Ils comprennent les diguanides (chlorhydrate de proguanil : Paludrine®) et les diaminopyrimidines (pyriméthamine : Daraprim®).

- Les antibiotiques

Plusieurs antibiotiques ont une activité antiplasmodique sur les modèles expérimentaux animaux ou sur cultures *in vitro* de *P.f.* Les antibiotiques les plus utilisés sont :

- Les cyclines (tétracycline ; doxycycline : Vibramycine®)
- Les macrolides : ces antibiotiques sont le plus souvent utilisés en association avec d'autres antipaludiques (érythromycine, spiramycine) ou isolément (clindamycine) en cas de chimio-résistance de *P.f.*

- Les associations schizontocides

Les associations les plus utilisées sont :

- Sulfadoxine + Pyrimétamine : Fansidar® comp à 500mg de sulfadoxine et à 25 mg de pyrimétamine ou en ampoules injectables par voie IM dosées à 400mg de sulfadoxine et 20mg de pyrimétamine.
- Dapsone + Pyrimétamine : Maloprim® comp à 100mg de dapsonne et 12,5 mg de pyrimétamine .
- Sulfadoxine + Pyrimétamine + Méfloquine : Fansimef® comp à 500mg de sulfadoxine, 25mg de pyrimétamine et 250mg de méfloquine.

- Chloroquine + Proguanil : Savarine® comp à 100mg de chloroquine et 200mg de proguanil.
- Artéméther + Luméfantrine : Coartem® comp à 20mg d'artéméther et 120 mg de luméfantrine.
- Artésunate + Méfloquine : Artequin® comp à 200mg d'artésunate et 250mg de méfloquine.
- Atovaquone + Proguanil : Malarone® comp à 250mg d'atovaquone et 100 mg de proguanil.

b) Les gamétocytocides

Ils sont actifs sur les formes sexuées du parasite. Certains auraient une action sur les formes exoérythrocytaires hépatiques. Cette classe d'antipaludiques est essentiellement constituée par les amino-8-quinoléines dont le plus connu est la primaquine (Primaquine®).

Ils sont d'utilisation limitée à cause de leur toxicité (Gentilini et Duflo, 1986).

IV.5.3 Le mode d'action des antipaludiques

Les antimalariques sont classés selon leurs modes d'action en trois groupes:

a) Les lysosomotropes

Ils regroupent les schizonticides sanguins : la quinine, les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine) et les amino-alcools (méfloquine, halofantrine), l'artémisinine.

La quinine, les amino-4-quinoléines et les amino-alcools, sont des molécules qui interfèrent avec l'utilisation de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne.

L'artémisinine et ses dérivés, interfèrent aussi avec l'utilisation de l'hémoglobine par la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite.

- La quinine

Deux théories ont été proposées sur son mode d'action.

Pour Fitch (1984), la molécule agirait en retardant la séquestration de ferriprotoporphyrine IX dans le pigment malarique, permettant à celle-ci d'exercer sa cytotoxicité .

Warhurst (1981) propose la théorie de la perméase, selon laquelle la molécule est transportée à l'intérieur de la cellule parasitaire, par l'intermédiaire d'un transporteur agissant sous l'influence d'un gradient de pH ; la molécule interférerait avec le catabolisme lysosomal de l'hémoglobine, "affamant " le parasite en acides aminés essentiels pour sa propre biosynthèse protéinique.

- Les amino-4-quinoléines et les amino-alcools

Lorsque les érythrocytes parasités par les plasmodiums sont exposés aux amino-4-quinoléines et aux amino-alcools, ces produits se concentrent à l'intérieur des érythrocytes. La capacité du plasmodium à accumuler ces schizonticides est le phénomène de base qui explique leur sélectivité d'action. Pour expliquer ce phénomène, on a évoqué l'existence d'un récepteur dans le parasite (ADN, ferriprotoporphyrine IX (F.P) ou phospholipide membranaire) et/ou l'effet d'un gradient de pH (Le Bras et Basko, 1991).

□ Les récepteurs

➤ L'ADN :

On a longtemps cru que les amino-4-quinoléines interagissaient avec les nucléoprotéines du parasite. Cette hypothèse, évoquée dans les années 50 et 60 puis abandonnée jusqu'en fin des années 80, est en train d'être reconsidérée par Meshnick (Kwakye-Berko et Meshnick, 1989 ; Meshnick,1990).

- La ferriprotophyrine IX membranaire (F.P) : le mécanisme de la toxicité membranaire.

Selon Fitch (1984) les interactions entre la chloroquine et la F.P joueraient un rôle capital dans la concentration des amino-4-quinoléines et des amino-alcools dans les hématies parasitées et dans la destruction du parasite.

Chou et Ficht (1980) ont identifié la F.P comme étant le récepteur à forte affinité et spécificité pour la chloroquine (CQ), la quinine et la méfloquine *in vitro*. La F.P (constituant à 90% de l'hémozoïne) est un produit lytique mais éphémère de la digestion de l'hémoglobine pour le plasmodium, qui se lie normalement à une protéine formée par le parasite ("protéine liant l'hème"), pour former le pigment malarique non toxique. En présence de la chloroquine, il y aura une compétition entre l'antipaludique et la protéine parasitaire, pour produire un complexe lytique qui provoque une perméabilité anormale et la fuite du potassium du parasite et de l'hématie. Cette modification de la perméabilité entraîne la destruction des membranes et la mort du parasite.

- Le phospholipide membranaire :

La chloroquine pourrait se lier aux membranes parasitaires et érythrocytaires compte tenu de son effet stabilisant sur les membranes. Mais c'est la méfloquine qui est la mieux connue pour son affinité avec les phospholipides membranaires (aussi élevé que pour la FP) (Chevli et al., 1982). Dans le cadre d'une association de cette hypothèse avec celle de Fitch, un double mode d'action : liaison à la FP et aux phospholipides membranaires, pourrait expliquer l'efficacité supérieure de la méfloquine contre les plasmodiums chloroquinorésistants.

- Le gradient de pH

Krogstad (1987) propose une double hypothèse, fondée sur les effets des bases faibles, dont font partie les amino-4-quinoléines et les amino-alcools, et sur les effets "non base faible". Selon cette hypothèse les bases faibles pénètrent par diffusion simple dans les trois compartiments de l'hématie parasitée : le cytoplasme érythrocytaire, le cytoplasme parasitaire et la vacuole parasitaire. Une fois à

l'intérieur de la vacuole parasitaire, dont le pH acide est maintenu par une pompe à protons dépendant de l'ATP ; les bases faibles subissent une protonation au niveau de leurs atomes d'azote, qui les rendent 100 à 1000 fois moins diffusibles, expliquant l'accumulation des amino-4-quinoléines et des amino-alcools dans la vacuole. En même temps, le pH vacuolaire augmente, à la suite de la consommation de protons et du dépassement de la capacité de la pompe à protons et du tampon. En conséquence, les fonctions de la vacuole plasmodiale sont arrêtées, en particulier la dégradation de l'hémoglobine. En fait, l'augmentation du pH vacuolaire est moins important que prévue par le modèle, ce qui explique la mise en jeu d'un autre mécanisme. Pour Krogstad, un effet non base faible compléterait les effets des bases faibles ; ceci pourrait impliquer, soit un transporteur situé dans la membrane érythrocytaire, soit un récepteur qui pourrait être la FP. Les deux mécanismes, complémentaires, assureraient un taux élevé d' amino-4-quinoléines et d' amino-alcools dans la vacuole, l'augmentation du pH vacuolaire restant le phénomène clé qui agirait sur le parasite.

- L'artémisinine

L'artémisinine et ses dérivés sont actifs grâce à la présence d'un pont endoperoxyde ; il est probable que le métabolisme rapide de ces composés s'accompagne de libération de radicaux libres de l'oxygène qui pourrait en exercer un effet destructif sur le parasite (Zhao et al., 1986).

L'action de l'artémisinine s'accompagne d'agrégations nucléaires, de gonflement et de déformation des membranes parasitaires (Gu et al., 1985). Au plan biochimique, l'inhibition de la synthèse des protéines est très précoce.

b) Les antimétabolites : antifoliques et antifoliniques

Les antifoliques (sulfones ; sulfamides) et les antifoliniques (diaminopyrimidines et biguanides) agissent sur la voie de biosynthèse de l'acide folique de façon similaire chez le plasmodium comme dans le cas des bactéries.

Les antifoliques sont des analogues de l'acide para-amino-benzoïque (PAB) et sont donc en concurrence avec le PAB pour la même enzyme; ils inhibent la synthétase de l'acide dihydrofolique, l'enzyme de la première étape de la synthèse de l'acide folique.

Les antifoliniques inhibent la réductase de l'acide dihydrofolique, l'enzyme de la deuxième étape de la synthèse.

Les deux sous familles des antimétabolites combinés agissent séquentiellement sur la même voie métabolique du parasite. La spécificité d'action des antimétaboliques contre les plasmodies est basée sur la haute affinité de ces antipaludiques pour les enzymes plasmodiales par rapport aux enzymes des cellules hôtes (Le Bras et Basco, 1991).

c) Les antibiotiques

Les antibiotiques inhibent la synthèse protéique au niveau des ribosomes 70s des mitochondries plasmodiales (Divo et al.,1985). Les protéines supposées d'origine mitochondriale ne représentent qu'une faible proportion de la totalité des protéines synthétisées par le parasite. Grâce à un stock suffisant de protéines fabriquées dans le cytoplasme parasitaire, l'arrêt de la synthèse sous l'action des antibiotiques n'affecte pas immédiatement le parasite.

La première génération du plasmodium exposée aux antibiotiques *in vitro* achève son cycle intraérythrocytaire et apparaît morphologiquement normale au bout de 48 heures. Par contre, la deuxième génération du parasite ne se développe pas. Cet effet tardif est attribué à l'action lente des antibiotiques sur la mitochondrie plasmodiale.

IV.5.4 Le traitement étiologique du paludisme

a) Les accès palustres simples

Il repose essentiellement sur les amino-4-quinoléines, surtout la chloroquine qui malgré l'apparition des souches plasmodiales résistantes, demeure encore le médicament de premier choix pour le traitement de l'accès simple dans certains pays d'Afrique de l'Ouest.

En première intention, la posologie recommandée pour la chloroquine administrée par voie orale est la suivante :

- Le 1^{er} jour de traitement : 10mg/kg de poids corporel en prise unique.
- Le 2^{ème} jour de traitement : 10mg/kg de poids corporel en prise unique.
- Le 3^{ème} jour de traitement : 5mg/kg de poids corporel en prise unique.

La forme injectable est utilisée en cas de vomissements et d'intolérance digestive.

L'amodiaquine à la dose de 25mg/kg par voie orale sur trois jours peut remplacer la chloroquine dans les cas d'intolérance de celle-ci.

En deuxième intention, en cas d'échec au traitement de la chloroquine, l'association sulfadoxine - pyrimétamine est administrée à la posologie de 1 comprimé (comp) pour 20 kg de poids corporel avec un maximum de 3 comp en prise unique/jour.

La quinine est administrée dans le cas d'un échec au traitement de deuxième intention. La posologie est de 8mg/kg toutes les 8 heures pendant 5 à 7 jours.

En cas de résistance à la quinine, on prescrira soit la méfloquine ou l'halofantrine, soit les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther).

b) Les accès palustres compliqués : neuropaludisme ou accès pernicieux

Le traitement du neuropaludisme est basé sur l'administration intraveineuse lente d'un sel de quinine. La posologie est de 25 mg/kg/jour répartis en trois injections de 8 mg/kg dans 250 ml de soluté glucosé 5% à passer en 4 heures toutes les 8 heures. En général, le traitement commence par une dose de charge qui est administrée au patient à raison de 20mg/kg de poids corporel en perfusion dans 250 ml du soluté glucosé 5%. En fonction de l'état du malade, un traitement symptomatique est associé (vasodilatateur cérébral, antipyrétique, anticonvulsivant, antianémique, etc.).

IV.6 Molécules antiplasmodiales d'origine végétale

IV.6.1 Les alcaloïdes

a) La quinine :

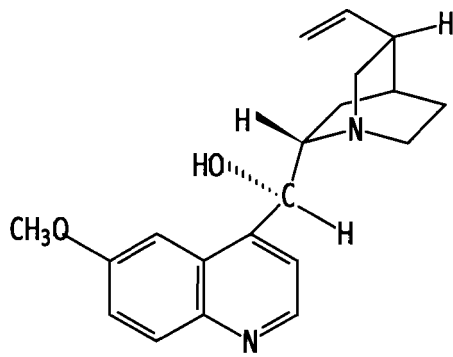
C'est le premier antipaludique d'origine végétale isolée des racines de *Cinchona sp.* (Rubiaceae) vers 1820 par Pelletier et Caventou. C'est un alcaloïde quinoléique appartenant à la famille chimique des arylméthanols.

b) Les bisbenzylisoquinoléines :

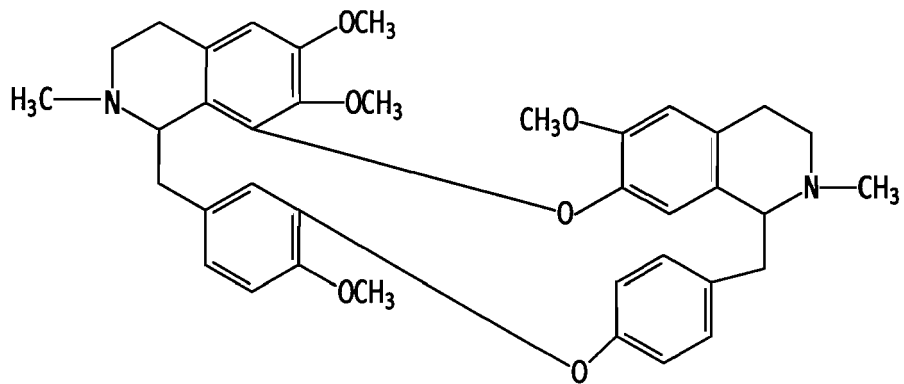
- La tétrandrine a été isolée de *Stephania tetrandra* S. Moore (Menispermaceae). La plante était utilisée pendant longtemps dans la médecine chinoise comme antirhumatismale ou comme analgésique. *In vitro*, la tétrandrine a une efficacité plus importante sur les souches chloroquinorésistantes de *P.f* que sur les souches sensibles.

Combinée à la chloroquine, elle préviendrait l'émergence de la chloroquinorésistance (Ye et al., 1989).

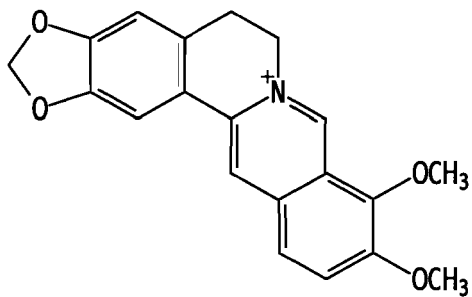
- La phaeanthine, énantiomère de la tétrandrine, a été isolée chez *Triclisia patens* Oliv. (Menispermaceae). La phaeanthine présente à peu près les mêmes effets que cette dernière. Elle est active *in vitro* sur le *P.f*.



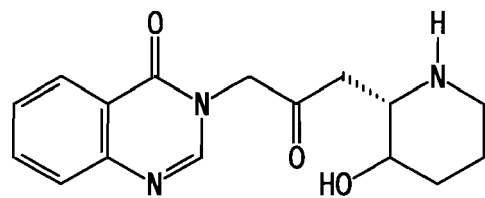
La quinine



La tétrandrine



La berberine



La fébrifugine

- La 7-O-diméthyltétrandine et la limacine ont été isolées respectivement chez *Strychnopsis thouarsii* Baill. (Menispermaceae) et *Spirospermum penduliflorum* Thou. (Menispermaceae). Elles ont montré toutes les deux une activité antiplasmodique *in vitro*. Ces molécules potentialisent l'effet de la chloroquine sur les souches résistantes.

c) La fébrifugine-l'isofébrifuge

La fébrifugine a été extraite des racines de *Dichroa febrifuga* Lour. (Saxifragaceae). L'activité antipaludique de l'extrait a été mise en évidence en 1947 par Spencer et ses collaborateurs. La molécule active (la fébrifugine) a été isolée immédiatement en 1948. Cependant sa toxicité a limité son emploi et son développement .

d) La berberine

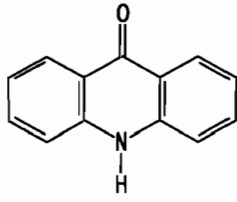
La berberine a été retrouvée chez les Annonaceae, les Berberidaceae et les Menispermaceae. Son activité antiplasmodique a été démontrée *in vitro* mais pas *in vivo* (Phillipson et al., 1991).

e) Les alcaloïdes anticancérigènes : la vinblastine

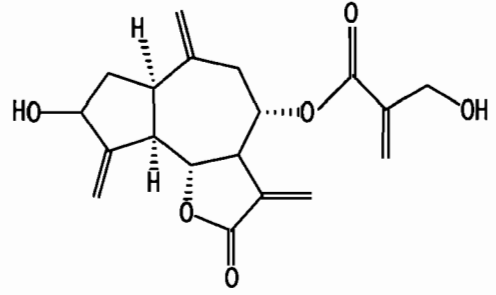
La vinblastine isolée chez *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), est active *in vitro* sur le *P.f* (Nkunya, 1992).

f) Les alcaloïdes acridiniques

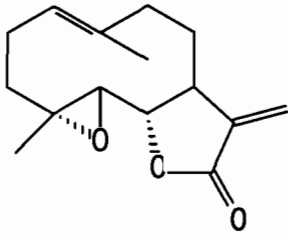
Les alcaloïdes acridiniques ont été isolés chez *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Rutaceae). L'atalaphillinine a une activité *in vivo* chez la souris infestée par le *P. berghei*.



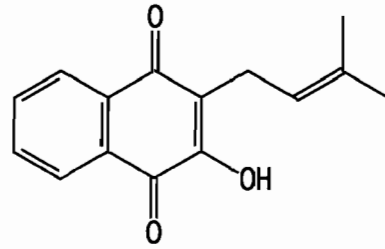
L'acridone



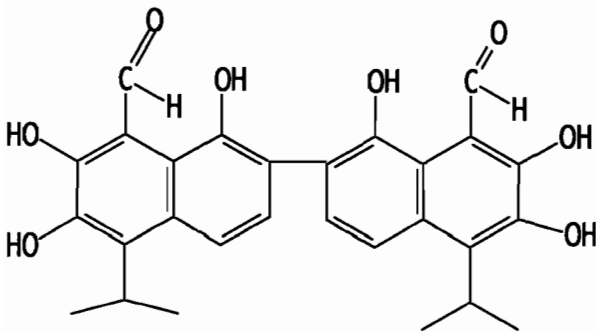
La cynaropicrine



La parthénolide



Le lapachol



Le rosvinol

g) Les alcaloïdes indoliques

Les alcaloïdes indoliques (la 4-méthoxy-1-vinyl- β -Carbaline et la 6-hydroxy-4-méthoxy-1-vinyl- β -carbaline) ont montré une activité antiplasmodique *in vitro* sur certaines souches résistantes de *P.f.*

IV.6.2 Les terpènes

a) L'artémisinine ou qinghaosu

L'artémisinine ou qinghaosu a été isolée à partir des feuilles d'une armoise (*Artemisia annua* L.) en Chine. La plante était connue dans la pharmacopée traditionnelle dans le traitement de la fièvre. L'artémisinine et ses dérivés (artéméther, artéether, artésunate) constituent une nouvelle classe de molécules antipaludiques efficaces sur les souches résistantes de *P.f.*

b) La cynaropicrine

La cynaropicrine a été isolée de *Vernonia glutinosa* (Compositae). Son activité antiplasmodique a été démontrée *in vitro*.

c) La parthénine

La parthénine a été isolée de *Parthenium hysterophorus* (L.) Schultz - Bip. (Asteraceae). Son activité antiplasmodique a été démontrée uniquement *in vitro*.

d) Les quassinoïdes

Les quassinoïdes sont des triterpénoïdes. Ils sont présents chez la plupart des Simaroubaceae. Vingt six quassinoïdes de structures différentes ont été testées *in vitro* sur le *P.f.* (Bryskier et Labro, 1988). Il a été démontré que les quassinoïdes sont des inhibiteurs potentiels de la synthèse protéique chez *P.f.* et ont un faible effet sur la glycolyse.

IV.6.3 Les quinones et les composés phénoliques

- Les naphthoquinones sont actives *in vitro* sur le *P.f.* On peut citer, le lapachol rencontré chez les Bignoniaceae. Du fait de leur faible toxicité, les naphthoquinones sont désignées pour le développement de nouvelles classes de drogues végétales.
- Le gossypol (polyphénol) extrait du *Gossypium sp.* (Malvaceae) est actif *in vitro* sur le *P.f.*
- Certains flavonoïdes (artémétine, casticine) ont une activité antiplasmodique à doses élevées (Phillipson et Wright, 1991).

IV.7 Chimiorésistance

IV.7.1 La définition

La chimiorésistance ou pharmacorésistance est la capacité qu'a un parasite à se multiplier ou à survivre en présence de concentration d'une substance qui, normalement le détruit ou empêche sa multiplication.

IV.7.2 Le mécanisme de la chimiorésistance

Plusieurs hypothèses ont été développées pour expliquer le mécanisme de la chimiorésistance.

- L'hypothèse faisant intervenir la ferriprotoporphyrine (FP) comme récepteur des schizontocides :

Fitch (1984) explique la chloroquinorésistance de *P.f.* par une séquestration plus efficace de la FP, diminuant ainsi la formation du complexe FP-CQ.

Il propose différents mécanismes possibles 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.

- L'hypothèse du gradient de pH selon Warhurst.

Les mécanismes de résistance envisageables sont :

- la modification du gradient de pH par l'arrêt de l'activité de la pompe à protons ou par 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 (Warhurst, 1986).

- L'hypothèse de l'efflux des amino-4-quinoléines et des amino-alcools :

Elle est basée sur la cinétique de la chloroquine radiomarquée dans les deux directions, influx et efflux, chez le *P.f* sensible et résistant (Krogstad et al., 1987).

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'influx met en évidence la sortie rapide de la chloroquine radiomarquée chez le *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.

- 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 schizontocides. 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 conséquence, explique l'efflux 40 fois plus rapide de la souche résistante observée par Krogstad (Ginsburg, 1988).

- L'hypothèse de la réversion de la résistance :

Elle est issue du rapprochement des mécanismes de résistances 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 deux 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 anticancéreux.

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 détecté sur des souches chimiorésistantes de *P.f.*, mais la présence et la surproduction d'une P-glycoprotéine plasmodiale reste encore à établir.

IV.7.3 Les méthodes d'évaluation de la chimiorésistance

L'évaluation de la chimiorésistance a été standardisée par l'O.M.S pour l'espèce *P.f.* On distingue deux grandes méthodes : l'étude *in vitro* et l'étude *in vivo*.

a) La détermination de l'efficacité thérapeutique : les tests *in vivo*.

Les tests *in vivo* permettent d'évaluer directement la valeur des différents schémas thérapeutiques dans le traitement de l'accès palustre. Ils ne sont pas conçus pour évaluer des schémas prophylactiques (Le Bras J., Basco L. K., 1991). Ils consistent à administrer à un sujet porteur de *P.f*, la dose ordinairement recommandée de l'antipaludique à tester, et à contrôler la disparition des signes cliniques et des parasites du sang au bout d'un temps donné (Guiguemdé T.R. et al., 1996). Un seul antipaludique peut être à la fois testé *in vivo* chez le même sujet.

Ces tests comportent : l'épreuve prolongée de 28 jours avec contrôle de la parasitémie chaque jour durant 7 jours, puis à J₁₄, J₂₁ et à J₂₈ ; l'épreuve pratique standard de 7 jours avec contrôle de la parasitémie tous les jours.

L'interprétation des résultats de ces épreuves a été codifiée.

Des variantes d'épreuves simplifiées ont été mises au point avec réduction du nombre des contrôles de la parasitémie qui se font soit à J₃ et J₇, soit uniquement à J₇. Seul le protocole d'étude *in vivo* de la chloroquine a été standardisée pour le moment (Le Brasd J., Basco L. K., 1991).

Pour une épreuve *in vivo*, les sujets à inclure dans l'étude doivent :

- avoir une infection monospécifique à *P.f*.
- avoir une densité parasitaire supérieure ou égale à 1000 formes asexuées par µl de sang.
- présenter une forme clinique de paludisme simple avec, notamment une possibilité d'administration du médicament par voie orale.

b) La mesure de la chimiorésistance du parasite : les tests *in vitro*.

La mise en œuvre de ces tests impose l'isolement et la culture des parasites. Elle consiste à mesurer l'inhibition de la maturation en schizontes des parasites isolés chez un sujet, en présence de doses croissantes d'un antipaludique donné. Dans les tests *in vitro*, à partir du sang prélevé chez un sujet, plusieurs antipaludiques peuvent être testés à la fois (Le Brasd J., Basco L. K., 1991).

Les tests actuellement utilisés sont des microtests et les semi-microtests. On distingue : les tests optiques, les tests isotopiques et les nouveaux tests.

- Les tests optiques

Les microtests et les semi-microtests ont été mis au point dans les années 70. Ils s'appuient sur la capacité des doses croissantes d'antipaludiques testés, à empêcher la maturation des trophozoïtes de *P.f* en schizontes, lorsque le prélèvement sanguin est mis en culture dans le milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) et incubé à 37°C en présence de gaz carbonique et d'oxygène, pendant 24 à 48 heures.

Les résultats s'expriment en concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le microtest et en concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) ou 90% (CI₉₀) pour le semi-microtest.

- Les tests isotopiques

Ils diffèrent des précédents tests par l'adjonction d'un radio-isotope (hypoxanthine tritiée). La maturation des parasites est révélée par l'incorporation du radio-isotope dans le noyau des parasites, et la mesure de la radioactivité se fait après 48 heures d'incubation, à l'aide d'un compteur bêta à scintillation. Les résultats sont donnés en coups par minute (CPM) et l'activité du médicament est exprimée en CI₅₀ ou en CI₉₀.

c) Les nouveaux tests.

Les tests récemment mis au point sont ceux de Makler (Makler M. T. et al., 1993) et de Krogstad (Krogstad D. J. et al., 1987).

- Le test enzymatique de Makler

Ce test est fondé sur la capacité de l'enzyme LDH (Lactate Déshydrogénase) de *P.f* à utiliser rapidement la 3-acétylpyridine adénine dinucléotide dans la réaction aboutissant à la formation de pyruvate à partir du L-Lactate. Le test vise à détecter et à quantifier par une technique enzymatique, la LDH produite par *P.f* en présence de

l'antipaludique étudié. Il existe une corrélation entre densité parasitaire et l'activité de la LDH plasmodiale.

- Le test de Krogstad

Il est fondé sur la capacité d'un inhibiteur calcique, le vérapamil, à bloquer l'excrétion et l'exocytose de la chloroquine de la vacuole parasitophore des souches chloroquinorésistantes de *P.f*. Pour cela, les souches plasmodiales du malade sont incubées dans une solution de chloroquine marquée à l'hydrogène tritiée, avec et sans vérapamil.

La radioactivité des deux échantillons est comptée par un compteur bêta à scintillation liquide. La différence de désintégration par minute (DPM) entre les deux échantillons permet d'affirmer la sensibilité ou non d'une souche de *P.f* en deux heures et de déterminer le niveau " RI ou RIII " selon la classification de l'auteur d'après qui les résultats préliminaires permettent de situer les niveaux de résistance suivants :

- 0 à 10 % : présence de souches résistantes avec un bas niveau RI.
- 10 % à 30 % : présence de souches résistantes mais le niveau est encore mal défini.
- 30 % : présence de souches résistantes avec un niveau élevé RIII.

Les antipaludiques pour lesquels il existe un test d'étude *in vitro* standardisé sont : la chloroquine, la quinine, la méfloquine et l'halofantrine.

Pour une épreuve *in vitro*, les sujets à inclure dans l'étude doivent :

- avoir une infection monospécifique à *P.f*.
- avoir une densité parasitaire 4000 formes asexuées par μl de sang soit 0,1% de la parasitémie.

IV.7.4 La chimiorésistance au Burkina Faso.

Au Burkina Faso, le paludisme constitue l'un des premiers motifs de consultation médicale. C'est un pays où la prévalence du paludisme peut atteindre 80% pendant la période de transmission maximale.

La chloroquinorésistance y est apparue dans les années 80. Le Centre de Référence de la Chimiorésistance du Paludisme (C.R.C.P), dont l'un des objectifs majeurs est d'élaborer des schémas thérapeutiques appropriés pour contenir le phénomène, a mené de nombreuses études *in vivo* au niveau national; et les résistances observées chez les autochtones sont essentiellement des résistances parasitologiques avec la chloroquine à la dose de 25 mg/kg. Les résistances cliniques sont rares (Guiguemdé T.R. et al., 1991).

En 1991, Guiguemdé et ses collaborateurs ont publié le bilan de 10 ans de surveillance de la chloroquinorésistance au Burkina Faso de 1982 à 1991. Ce bilan fait état d'une régression des taux de chloroquinorésistance *in vitro* et *in vivo* qui de 41% et 15,8 % en 1982 sont passés à 25 % et 5,5 % en 1991. Ils ont constaté une stabilisation des taux de chloroquinorésistance *in vivo* de 14,4 % de 1988 à 1991.

Le Saye

V Le Saye

Le Saye, recette médicinale proposée par le Dr Dakuyo P. Zéphérin, est préconisée dans le traitement du paludisme simple, de l'hépatite et de la constipation. Le Saye a été reconnu par le code de santé publique de notre pays en 1986. Il est constitué par l'association de trois plantes qui sont :

- *Cassia alata* Linn (Caesalpinaceae)
- *Cochlospermum planchonii* Hook (Cochlospermaceae)
- *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn (Euphorbiaceae)

Il est vendu en pharmacie sous la forme de tisane à 200g de Saye par sachet et sous la forme de gélules à 200mg de poudre de Saye (boîte de 30 gélules).

V.1 Mode de préparation du Saye

Les plantes qui composent le Saye sont récoltées à différentes périodes de l'année dans la région de Banfora (Burkina Faso). Les feuilles de *Cassia alata* Linn sont récoltées entre le 15 septembre et le 31 octobre. Les racines de *Cochlospermum planchonii* Hook sont récoltées toute l'année, et les feuilles de *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn entre le 15 février et le 15 septembre.

Après la récolte, les différentes plantes sont séchées au soleil. Elles sont ensuite stockées différemment au magasin et subissent un tri pour éliminer les impuretés (mauvaises herbes etc.).

Pour la tisane, une fois le tri effectué, les différentes parties des plantes sont coupées et mélangées à des proportions bien précises. Le mélange est ensuite conditionné en sachets de 200g chacun.

Pour les gélules, une fois que le tri a été fait, les différentes parties des plantes sont broyées pour donner une poudre. Les poudres obtenues sont mélangées à des proportions bien précises. Le mélange des différentes poudres servira à remplir les gélules à raison de 200mg de poudre de Saye.

V.2 Mode d'utilisation du Saye

V.2.1 La tisane

La tisane composée Saye est utilisée sous la forme d'une décoction. La posologie proposée chez l'adulte, dans le traitement du paludisme, de l'hépatite et de la constipation, est d'un verre de décocté à boire matin, midi et soir après les repas. Chez l'enfant d'âge supérieur ou égal à 7 ans, un demi verre de décocté à boire matin, midi et soir après les repas.

La durée du traitement est de 5 jours pour le paludisme simple et de 2 à 3 semaines pour l'hépatite. La durée de conservation de la tisane est de 3 ans.

V.2.2 Les gélules

Dans le traitement du paludisme, de l'hépatite et de la constipation, la posologie est de 2 à 3 gélules trois fois par jour chez l'adulte et de 2 gélules trois fois par jour chez l'enfant d'âge supérieur ou égal à 7 ans.

Le traitement est de 5 jours pour le paludisme simple et 2 à 3 semaines pour l'hépatite. La durée de conservation des gélules est de 2 ans.

VI *Plantes composantes de la tisane Saye*

VI.1 *Cassia alata Linn (Caesalpinaceae)*

Nom usuel : Dartrier

Noms vernaculaires :

Bambara : Kô-tabà

Mooré : Jonis-tiiga , Puweg roaanga

VI.1.1 Les données botaniques

Le *Cassia alata* Linn est une Caesalpinaceae de l'ordre des Fabales. C'est une plante arbustive de 3 m de haut, à tige noirâtre. Les feuilles grandes, paripennées, comportant 8 à 15 folioles obovales ou oblongues - obovales arrondies aux extrémités et mesurant 5 à 15cm de longueur et 3 à 8cm de largeur, sont odorantes. Elles subissent parfois l'ovoposition de certains genres de papillons et sont donc parasitées par les chenilles de ces papillons qui pondent leurs œufs sur leur face inférieure.

Le pétiole et le rachis peuvent mesurer 60cm de longueur et sont quelquefois orangé verdâtre au-dessus.

Les inflorescences dressées, assez robustes, oranges, atteignant 25cm de longueur, sont des racèmes.

Les fleurs jaunes mesurent environ 3cm de diamètre.

Les fruits, des gousses à 4 ailes, un peu arquées, mesurant jusqu'à 25cm de longueur, sont noirs à maturité.

Les graines nombreuses, noirâtres ou brunâtres, sont anguleuses.

VI.1.2 Les données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques

a) Répartition géographique

Le *Cassia alata* Linn est une plante originaire d'Amérique tropicale. Introduite dans toutes les régions tropicales, cette plante se rencontre dans toute l'Afrique intertropicale où on apprécie ses propriétés médicinales et aussi la beauté de son feuillage. On la trouve surtout dans les endroits humides. C'est une plante anthropophile.

b) Usage médical

- Accès fébrile : le décocté des feuilles se prescrit en boisson pendant une semaine (Aké Assi et Guinko Sita , 1991).
- Céphalées : un bandeau contenant un mélange de feuilles fraîches et d'écorces de racines pilées disposé autour de la tête traite les céphalées.
- Laxatif : le décocté des racines, mélangé avec du sel ou du sucre, est pris en boisson le matin.
- Abortif : la pâte faite de feuilles fraîches délayée dans de l'eau tiède se prescrit en lavement. Le traitement s'effectue pendant une semaine.
- Hypertension : infusion ou décoction légère des feuilles. Boire un verre (30cl) 2 fois par jour (Adjanooun et al., 2002).

- Dermatoses, teignes : Faire sécher les feuilles à l'ombre après les avoir lavées. Piler et tamiser pour obtenir une poudre fine. Cette poudre se frictionne directement sur la peau humidifiée ou incorporée en pommade dans du beurre de karité.
- Plaies infectées : La macération des fleurs dans l'alcool de palme désinfecte la plaie.
- Douleurs articulaires : le décocté des feuilles est donné en bains et boissons.

Le *Cassia alata* est également indiqué dans le traitement du diabète.

VI.1.3 La chimie

Toutes les parties végétatives de *Cassia alata* contiennent des quantités importantes d'acide chrysophanique. Les feuilles et les graines contiennent des dérivés anthracéniques libres et oxydés (sennosides B) donnant par oxydation de la rhéine, du glucose et du rhamnose.

Tiwari et Yadova (1971) ont isolé des racines, outre le β -sitostérol, deux nouveaux pigments anthraquinones : la 1,3,8-trihydroxy-2-méthylanthraquinone et le 1,5-dihydroxy-8-méthoxy-2-méthylanthraquinone-3-O- β -D-(+)-glucopyranoside.

Hemlata et Kalidhar (1992) ont montré que les tiges feuillées du *Cassia alata* contiennent le 1, 5,7-trihydroxy-3-méthylanthraquinone (alatinone) .

Ross Kelly et ses collaborateurs (1993), ont modifié la structure de l'anthraquinone alatinone 1,5,7-trihydroxy-3-méthylanthraquinone en 1,6,8-trihydroxy-3-méthylanthraquinone.

Gupta et Singh (1991) ont isolé des graines du *Cassia alata*, deux nouveaux flavonoïdes glycosides qui sont : le chrysoeriol-7-O-(2"-O-β-D-mannopyranosyl)-β-D-allopyranosyl et le rhamnetin 3-O-(2"-O-β-D-mannopyranosyl)-β-D-allopyranoside.

Des études spectroscopiques ont montré la présence dans les feuilles de *Cassia alata* un flavonoïde glycoside qui est le kaempférol 3-gentiobioside (Moriyama et al., 2001).

VI.1.4 La pharmacologie

La richesse de la plante en anthraquinones totales justifie son emploi comme purgatif (Thamlikitikul et al., 1990 ; Ogunti et al., 1993).

En 1982, une étude menée par Fuzellier et ses collaborateurs, a montré que les génines libres (rhéine, aloe-émodol et émodol) extraites en partie par l'eau à l'ébullition seraient à l'origine du pouvoir fongistatique. Le décocté aqueux des feuilles de *Cassia alata* inhibe totalement les cultures des dermatophytes au bout de 14 jours.

Ibrahim et Osman en 1995, ont montré que la présence du chrysophanol dans l'extrait éthanolique des feuilles du *Cassia alata* a des propriétés antifongiques.

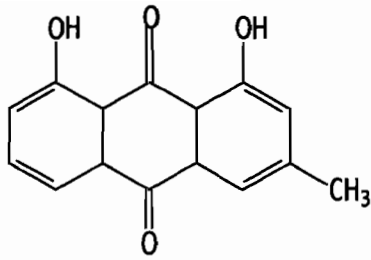
La rhéine isolée de la plante a des propriétés antibiotiques vis à vis du *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus subtilis* et du *Staphylococcus aureus* (Kerharo et Adams, 1974).

L'extrait méthanolique des feuilles, des fleurs, des tiges, des écorces et des racines, présente une activité antimicrobienne à large spectre. Cette activité augmente avec les fractions à l'éther de pétrole, au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle. La fraction au dichlorométhane des extraits des fleurs est plus efficace (Khan et al., 2001).

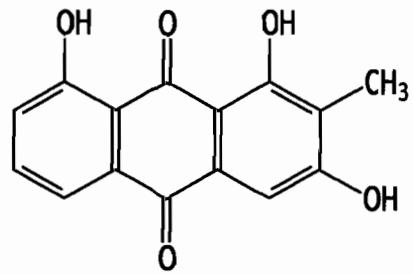
Villasenor et ses collaborateurs (2002) ont montré que les extraits à l'hexane, au chloroforme et à l'acétate d'éthyle des feuilles du *Cassia alata* ont des propriétés analgésiques, antiinflammatoires, antifongiques, antimutagéniques et hypoglycémiantes.

Des études ont montré que le décocté aqueux des extraits foliaires du *Cassia alata* revêt une activité cholérétique optimale à la dose de 15 mg/kg, ce qui justifie son utilisation dans le traitement des troubles digestifs. A des doses plus élevées, la plante présenterait un effet inhibiteur de la sécrétion biliaire (Assane et al., 1993).

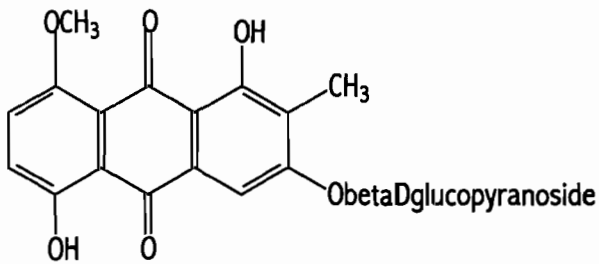
La toxicité du *Cassia alata* n'a pas été prouvée, mais à forte dose, l'effet purgatif peut provoquer la fatigue (Adjanooun et al., 2002).



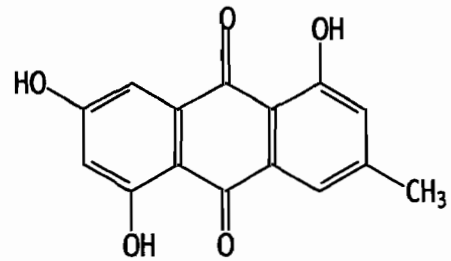
L'acide chrysophanique ou du chrysophanol



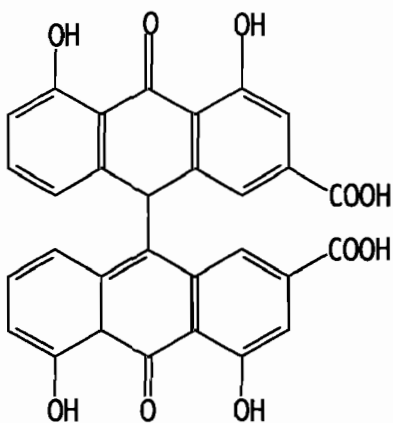
Le 1,3,8 trihydroxy-2-méthyl anthraquinone



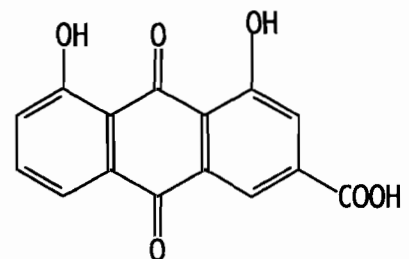
1, 5 dihydroxy-8-methoxy-2-methyl anthraquinone-3-O-β-D-glucopyranoside



L'alatinone



Sennidines A et B



La rhéine



Figure 2 : *Cassia alata* Linn (Caesalpinaceae) (photo prise à Bangr weogo aux environs de Ouagadougou)

Auteur : Ouattara Issouf

VI.2 *Cochlospermum planchonii* Hook(Cochlospermaceae)

Nom usuel : Faux cotonnier

Noms vernaculaires :

Bambara : N' dribala

Mooré : Sôasga , Sons-raaga

VI.2.1 *Les données botaniques*

Le *C.planchonii* Hook est une Cochlospermaceae de l'ordre des Violales. C'est un arbrisseau atteignant 50 à 150 cm de hauteur, à port buissonnant et multicaule.

Les feuilles sont profondément palmatilobées avec des lobes oblongs. Elles sont rarement dentées et sont arrondies au sommet. La face inférieure des feuilles est généralement plus ou moins laineuse.

Les fleurs, grandes, jaune d'or, comportant de nombreuses étamines, sont groupées au sommet des tiges.

Les fruits, des capsules ovoïdes ou ellipsoïdes, ressemblant à celle du cotonnier, contiennent des graines noires recouvertes de poils blanchâtres.

VI.2.2 *Les données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques*

a) Répartition géographique

Le *Cochlospermum planchonii* Hook est une espèce de savane qui se rencontre depuis la Guinée jusqu'au Cameroun.

b) Usage médical

- Accès fébriles : le décocté des feuilles est prescrit comme boisson ou employé pour ablution pendant une semaine (Aké Assi et Guinko Sita, 1991).
- Jaunisse-Paludisme : le décocté des racines et des écorces, associées à celles de *Terminalia macroptera* Guill. et Perr. (Combretaceae), se prescrit en boisson et pour des ablutions. La partie lignifiée centrale de la racine découpée en petits morceaux est également consommée. La décoction des racines est proposée par Dakuyo (1992) dans le traitement de l'ictère, du paludisme et de la constipation. Un peu partout en Afrique, *C.planchonii* Hook et *C.tinctorium* A. Rich, sont traditionnellement et indistinctement utilisées en décoction pour le traitement des ictères et du paludisme.
- Palpitations cardiaques : les feuilles séchées réduites en poudre sont consommées matin, midi et soir.
- Fortifiant : la poudre des racines délayée dans de l'eau avec du jus du citron se prend en boisson.

Les feuilles sont également employées comme antidiarrhéiques, antiémétiques, hépatotropes et antalgiques (Pousset, 1992).

La pulpe sert à confectionner des pansements humides destinés à faire mûrir les abcès et les furoncles.

VI.2.3 La chimie

En 1985, Ivan Addae Mensah et ses collaborateurs ont mis en évidence dans les extraits de racines de *C.planchonii* Hook avec des solvants apolaires, 4 triacylbenzènes dénommés plus tard par Achenbach cochlospermines A, B, C, D, et qui seraient biologiquement inactives.

Les extraits aqueux du *Cochlospermum planchonii* renfermeraient essentiellement des polyphénols.

Coulibaly (1996) 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 éthanolique hydrolysé des glycosides stéroïdiques et triterpéniques et des leucoanthocyanes. Les tanins, les composés réducteurs, les glucides ont été identifiés dans l'extrait aqueux.

VI.2.4 La pharmacologie

Presber en 1992 a fait mention de l'inhibition de la croissance *in vitro* de *P.f* par des substances rouges cristallines isolées des racines de *Cochlospermum angolense* (Welw.) espèce utilisée en Angola pour le traitement de l'ictère et du paludisme.

A 10mg/kg on observe une inhibition de 50% de la multiplication parasitaire et à 50mg/kg une inhibition totale.

Benoît et ses collaborateurs (1996) ont montré l'activité antiplasmodique *in vitro* du décocté aqueux des rhizomes de *Cochlospermum planchonii* sur *P.f*. La CI_{50} obtenue est inférieure à 0,5 µg/ml. Le décocté aqueux de *Cochlospermum planchonii* exerce une action sur les souches chloroquinorésistantes.

L'étude *in vivo* à partir d'un extrait de *Cochlospermum angolense* a donné une DE_{50} égale à 100 mg/kg sur le *P. berghei* (Presber et al., 1991).

Les extraits aqueux et alcooliques de *Cochlospermum planchonii* présenteraient un effet protecteur sur les hépatocytes intoxiqués par le paracétamol.

La toxicité de *Cochlospermum planchonii* n'a pas été démontrée. Une étude de toxicité sur l'espèce voisine à savoir le *Cochlospermum tinctorium* a été réalisée par Balkouma en 1999.

Selon cet auteur, le décocté aqueux de la plante donne par voie intrapéritonéale une DL_{50} de l'ordre de 334,95 mg/kg ; ce qui a permis de classer l'extrait comme étant moyennement toxique.



Figure 3 : *Cochlospermum planchonii* Hook (Cochlospermaceae) (photo prise à Bašlko aux environs de Ouagadougou)

Auteur : Ouattara Issouf

VI.3 *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn (Euphorbiaceae)

Nom usuel : Phyllanthus amer

Noms vernaculaires :

Bambara : Tchékéléni , Débanboukora

Mooré : Tinguin garga

VI.3.1 Les données botaniques

Le *Phyllanthus amarus* est une Euphorbiaceae de l'ordre des Euphorbiales. C'est une petite plante herbacée annuelle haute de 10 à 40 cm, souvent peu ramifiée, à feuilles alternes, distiques. Le limbe oblong est long de 6 à 12 mm et large de 3 à 6 mm. La base et le sommet sont arrondis. Les nervures très fines et peu sensibles sont au nombre de 4 à 5. Les feuilles sont glabres.

Les fleurs sont petites et verdâtres. Les fleurs femelles sont isolées à l'aisselle des feuilles, vers la base des rameaux. Les fleurs mâles sont isolées, par 2 ou 3, aux feuilles du sommet.

Le fruit est une capsule glabre trilobulaire large de 2 mm.

Les graines longues de 0,9 mm sont triangulaires avec 6 ou 7 côtes longitudinales. Elles sont parcourues par de nombreuses et de minuscules stries parallèles à l'arrière.

VI.3.2 Données ethnobotaniques et ethnopharmacologiques

a) Répartition géographique

Le *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn est une plante pantropicale rudérale qui pousse le long des routes, aux abords des habitations et sur les terrains vagues. Elle est d'origine américaine.

b) Usage médical

- Hépatite : préparer une décoction de tiges feuillées. Boire un verre (30cl) le matin à jeun.
- Toux : préparer une décoction avec une poignée de feuilles associées à un fruit d' *Aframomum melegueta* (Roscoe) K. Schum. (Zingiberaceae). Boire un verre (30cl) 4 à 5 fois par jour.
- Candidose : envelopper dans une feuille de *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann ex Bureau (Bignoniaceae) une poignée de feuilles avec une pincée de sel. Placer le paquet sous la cendre chaude pendant 30 minutes. Presser le jus dans la bouche.
- Zona : Piler 20 g de feuilles avec 2 kolas. Faire une pâte avec de l'eau. Appliquer sur les lésions, matin et soir.
- Amibiase : faire une décoction avec des tiges feuillées associées aux tiges feuillées d'*Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae).

Les feuilles sont aussi utilisées sous forme de décocté par voie orale dans plusieurs affections, notamment diverses dermatoses, les vomissements, la blennorragie et les palpitations (Adjanohoun et al., 1986, 1989, 2002).

Le décocté de 100g de tiges feuillées dans 5 litres d'eau est indiqué dans le traitement du paludisme.

Le décocté des feuilles récoltées tôt le matin, est utilisé par voie orale comme antidysentérique. Il est également utilisé de la même façon dans les dysménorrhées (Berhaut, 1975).

Le jus des feuilles, en instillations auriculaires, sert à traiter les otites, et en applications locales, il ferait mûrir les furoncles et les abcès.

Les feuilles du *Phyllanthus amarus* ont en plus des propriétés fébrifuges, diurétiques, hypoglycémiantes, stomachiques et vermifuges (Morton, 1981).

VI.3.3 La chimie

Les parties aériennes de la plante contiennent des alcaloïdes (méthoxy-4-sécurinine et méthoxy-4norsécurinine), des flavonoïdes et plusieurs lignanes , dont la phyllantine, principe amer et l'hypophyllantine , principe non amer (Weniger et al., 1984).

Les travaux effectués par Houghton et ses collaborateurs (1996) ont mis en évidence deux nouveaux alcaloïdes qui sont l'isobubblialine et l'épibubblialine.

Foo Yeap (1993) a effectué des travaux sur les parties aériennes du *Phyllanthus amarus* qui lui ont permis de révéler la présence de tanins qui sont la géraniine et l'amariine ; l'acide gallique ; la gallactocatéchine, la quercetine 3-O-gluco-pyranoside et la rutine.

En juillet 2003, Bahar Ahmed et Tanveer Alan ont mis en évidence dans la plante des sécostérols : amarostérol-A (13, 14-seco-stigma 5(6), 14(15)-diene-3- α -ol) et amarostérol-B (13, 14-seco-stigma 9(11), 14(15)-diene-3- α -ol).

Les feuilles contiennent une huile essentielle riche en cymène, limonène et salicylate de méthyle.

Un triterpène, le lupéol, est présent dans la racine de la plante.

VI.3.4 La pharmacologie

Plusieurs auteurs ont étudié les activités du *Phyllanthus amarus*. Parmi ces activités nous pouvons citer :

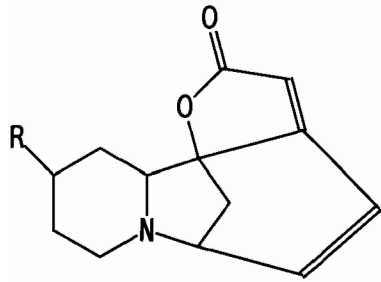
- Une activité antipyrétique de l'extrait aqueux de la plante (Kitisin, 1952).
- Une activité antivirale de l'extrait aqueux de la plante (Venkateswaran et al., 1987).
- Une activité hépatoprotectrice de l'extrait alcoolique des racines et des feuilles (Syamasunder et al., 1985).
- Une activité antispasmodique de la plante (Dhar et al., 1968).
- Une activité antidiarrhéique de l'extrait aqueux des feuilles de la plante (Odetola et Akojenu, 2000).
- Une activité antibactérienne contre le *Staphylococcus aureus* et *Pasteurella pestis* (Unander et al., 1995).
- Une activité hypoglycémiant de l'extrait méthanolique de la plante (Raphaël et al., 2001).
- Une activité antitumorale et anticarcinogénique de l'extrait aqueux des parties aériennes de la plante (Rajeshkuma , 2002).

- Une activité contraceptive de l'extrait méthanolique de la plante (Mandava et al., 2001).

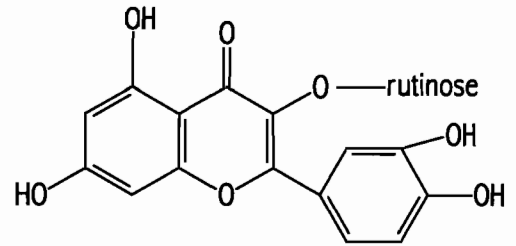
- Une activité diurétique et hypotensive de la plante (Srividya et al., 1995).

L'activité antiplasmodique de la plante n'a pas été démontrée *in vivo* (Spencer et al., 1947).

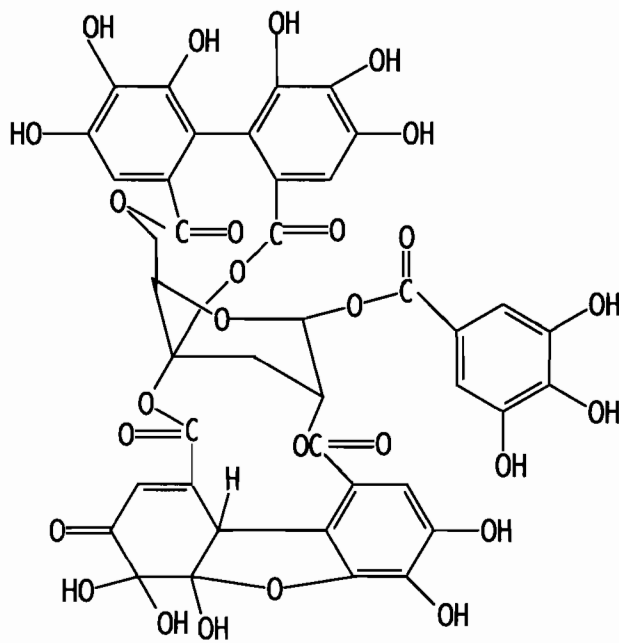
Des études ont permis de noter une absence de toxicité générale de la plante chez le rat et la souris (Kitisin, 1952). Selon Unander et ses collaborateurs (1995), des essais effectués sur l'être humain révèlent que la plante n'est pas toxique. Chez la souris, l'extrait aqueux administrée par voie IP donne une $DL_{50} > 1g/kg$.



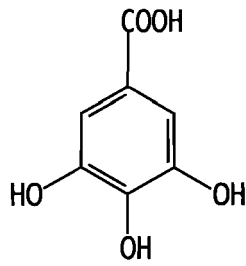
R : H securinine
 R : - OCH₃ phyllantine



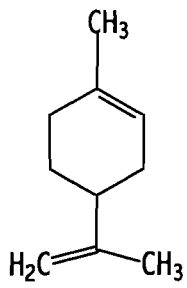
La rutine



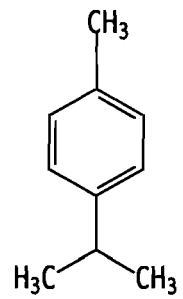
La géraniine



L'acide gallique



La limonène



P- cymène



Figure 4: *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn (Euphorbiaceae) (photo prise à Tanghin aux environs de Ouagadougou)

Auteurs : Ouattara Issouf

Matériel et méthodes

VII Matériel et méthodes

VII.1 Cadre de l'étude

L'étude phytochimique a été réalisée à l'Institut de Recherche en Sciences de la santé (IRSS) de Ouagadougou. L'étude pharmacologique a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Entomologie du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso.

VII.2 Matériel

VII.2.1 Le matériel végétal

Le matériel végétal reçu du promoteur, était constitué des feuilles de *Cassia alata* Linn, des rhizomes de *Cochlospermum planchonii* Hook, des feuilles de *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn. Les différentes parties des plantes ont été séchées, réduites en poudre et mélangées à des proportions bien précises.

VII.2.2 Le matériel biologique

- Les souris NMRI :

Nous avons utilisé dans nos expérimentations, des souris de souches NMRI. Ce sont des souris de type albinos généralement utilisées comme animal d'expérimentation dans diverses disciplines biomédicales, en particulier en pharmacologie et en toxicologie (Rahman et al., 1999 ; Sauvain et al., 2000).

Dans le cadre de notre étude, ces souris ont été utilisées pour l'étude de la **DL₅₀** et de l'activité antiplasmodique. Elles ont été stabulées dans les mêmes conditions de température (25°C), d'humidité de l'animalerie et en éclairage dans la journée. Elles proviennent de l'animalerie du Centre International de Recherche-Développement de l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES).

- Le *Plasmodium berghei* :

La souche, fournie par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (Belgique) au Laboratoire de Parasitologie-Entomologie du Centre Muraz, est conservée *in vivo* par réinfestation continue de souris ou dans de l'azote liquide.

VII.2.3 Le matériel d'étude phytochimique

a) Matériel d'extraction

- Plaque chauffante type labo-moderne HC502
- Verrerie (bêchers, ballons, fioles, entonnoirs ...)
- Agitateur magnétique IKAMAG* RTC 300°C
- Centrifugeuse ALC N°4225
- Lyophilisateur BIOBLOCK CHRIST ALPHA 1-2
- Balance type SARTORIUS modèle 17 02 001
- Rotavapor BUCHI R-114
- Dessicateur

b) Matériel pour le criblage phytochimique

- Chromatoplaque de silicagel G₆₀ F₂₅₄
- Verrerie (fioles jaugées ; tubes à essai ...)
- Lampes U.V à deux longueurs d'onde (254 et 366 nm)

c) Réactifs chimiques et solvants

- Eluants :
 - Système S₁ : chloroforme, acétone (8, 2 v/v)
 - Système S₂ : n-hexane, acétate d'éthyle, acide acétique (9, 4, 1 v/v)
 - Système S₃ : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1.25 v/v)
 - Système S₄ : acétate d'éthyle, n-propanol, eau distillée (4, 4, 3 v/v)

- HCl concentré

- H₂SO₄ concentré

- Ammoniaque (NH₄OH) 25 %

- Solution de HCl 10% dans l'eau distillée (v/v)

- Solution de FeCl₃ 1% dans l'eau distillée (v/v)

- Solution de H₂SO₄ à 3% dans l'éthanol 95% (v/v)

- Solution éthanolique de KOH 5% (v/v)

- Solution de FeCl₃ 1% dans l'éthanol 95% (v/v)

- Eau-Méthanol (50 ; 50 v/v)

- Solution d'oxychlorure de zirconium 3% dans l'eau distillée (p/v)

- Solution de carbonate de sodium 10% dans l'eau distillée (p/v)

- Solution tampon d'acétate de sodium
- Solution témoin de rutoside (1mg/ml) dans l'éthanol 95%
- Solution témoin d'acide tannique (1mg/ml) dans l'éthanol 95%
- Réactif de Folin-Denis (cf annexe)
- Réactif de Mayer (cf annexe)

d) Matériel pour les tests antiplasmodiques et pour l'étude de la DL₅₀

- Seringues à insuline (1 ml)
- Eau pour préparation injectable
- Ether Gifrer
- Lames porte-objet
- Réactif de Field (cf annexe)
- Microscope optique
- Compteur manuel
- Appareil à Ultrasons

VII.3 Méthodes

VII.3.1 L'étude phytochimique

a) Extraction

- Préparation du décocté aqueux

La drogue végétale (300 g) est introduite dans de l'eau distillée (2,5 l). Le mélange est porté à ébullition pendant 20 minutes.

La décoction obtenue est filtrée. Après refroidissement, le filtrat est centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré. Une partie du surnageant est ensuite lyophilisée pour donner un résidu sec qui est conservé dans un flacon brun à l'abri de la lumière. Ce résidu servira par la suite à réaliser les tests toxicopharmacologiques. L'autre partie du surnageant est utilisée pour l'étude phytochimique.

- Préparation de l'infusé aqueux

La drogue végétale (300 g) est introduite dans de l'eau distillée chaude (2,5 l). Le mélange est laissé en infusion pendant 45 minutes et est ensuite filtré.

Après refroidissement, le filtrat est centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré. Une partie du surnageant est lyophilisée pour donner un résidu sec qui est conservé dans un flacon brun à l'abri de la lumière. Ce résidu servira par la suite à réaliser les tests toxicopharmacologiques. L'autre partie du surnageant est utilisée pour l'étude phytochimique.

- Préparation du macéré aqueux

La drogue végétale (300 g) est introduite dans de l'eau distillée (2,5 l). Le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique pendant 24 heures à la température de 37°C environ. Le mélange est ensuite filtré. Le filtrat obtenu est centrifugé à 2000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré. Une

partie du surnageant est lyophilisée pour donner un résidu sec qui est conservé dans un flacon brun à l'abri de la lumière. Ce résidu servira par la suite à réaliser les tests toxico-pharmacologiques. L'autre partie du surnageant est utilisée pour l'étude phytochimique.

b) Hydrolyse acide des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré)

L'acide chlorhydrique 10 % (90 ml) est additionné à 150 ml de chaque extrait aqueux (décocté, infusé, macéré). Chaque mélange est chauffé à reflux pendant une heure. Après refroidissement, chacun des mélanges est extrait avec 5 fois 50 ml de dichlorométhane. Les phases organiques obtenues sont lavées avec de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Elles sont ensuite séchées sur du sulfate de sodium anhydre et filtrées sur du papier wattman. Les filtrats recueillis sont concentrés sous pression réduite au rotavapor et conservés dans des flacons bruns à l'abri de la lumière.

Les hydrolysats qui renferment les génines totaux des hétérosides sont solubles dans les solvants organiques. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) des hydrolysats permet une bonne séparation des différents constituants.

c) Le criblage phytochimique

Le but du criblage phytochimique est de déterminer les différents groupes chimiques présents dans les extraits aqueux (décocté, infusé, macéré). Ce criblage phytochimique peut être réalisé par des réactions de caractérisation en milieu liquide (Ciulei, 1982) ou par une Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de faire le criblage chimique en utilisant les deux méthodes. Les groupes chimiques recherchés sont : les stéroïdes et/ou triterpènes, les flavonoïdes, les anthracénosides, les alcaloïdes sels, les tanins ou polyphénols et les saponosides. Le choix de ces groupes s'explique par le fait que dans la littérature la plupart des molécules suspectées d'avoir une activité antiplasmodique appartiennent à ces groupes chimiques.

- Recherche des stérols et/ou triterpènes (réaction de Lieberman-Burchard).

10 ml de chaque extrait aqueux hydrolysé sont évaporés dans des capsules en porcelaine. Après évaporation, les résidus sont dissous dans 0,5 ml d'anhydride acétique puis dans 0,5 ml de chloroforme. Les mélanges sont transférés dans des tubes à essai secs, puis à l'aide d'une pipette on fait couler doucement au fond du tube 1 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ concentré.

Le développement d'un anneau de couleur rouge-brun ou violet situé à la zone de contact des deux liquides, ou d'un surnageant vert ou violet (après 5 à 10 minutes) témoigne de la présence des stérols et/ou des triterpènes dans les extraits aqueux.

L'identification des stérols et/ou des triterpènes a été également réalisée par CCM. L' α -amyrine a servi de témoin. Le système de solvant utilisé est le suivant : chloroforme, acétone (8, 2 v/v).

La révélation se fait en pulvérisant une solution d'acide sulfurique H₂SO₄ 3 % dans l'éthanol sur les chromatoplaques de gel de silice (G₆₀F₂₅₄) qui sont ensuite placées à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes. Les triterpènes tétracycliques et les stérols donnent une coloration violette qui vire rapidement au bleu. Les triterpènes pentacycliques donnent une coloration violette persistante.

- Recherche des flavonoïdes (réaction de Shibata)

5 ml de chaque extrait aqueux hydrolysé sont évaporés à sec dans des capsules en porcelaine. Les résidus obtenus sont dissous dans 1 à 2 ml d'une solution de méthanol 50 %. Les mélanges sont tiédés et transférés dans des tubes à essai. Après refroidissement, on y ajoute 2 tournures de magnésium et 4-5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré.

La positivité de la réaction se traduit par un développement des couleurs caractéristiques suivantes : rouge (flavonols) et orange (flavanones).

L'identification des flavonoïdes a été également réalisée par CCM. La quercétine a servi de témoin de référence. Le système de solvant utilisé est le suivant : n-hexane, acétate d'éthyle, acide acétique (9, 4, 1 v/v).

La révélation se fait en pulvérisant une solution éthanolique de KOH 5 % sur les chromatoplaques. L'apparition de spots colorés en jaune ou jaune orangé permet de suspecter la présence des flavonoïdes.

- Recherche des anthracénosides (réaction de Borntrager)

Dans trois tubes à essai, mettre 3 ml de chaque extrait aqueux hydrolysé et 1 ml d'ammoniaque 25 %. Bien agiter. L'apparition d'une coloration rouge cerise témoigne de la présence des anthracénosides.

L'identification des anthracénosides a été également réalisée par CCM. Un extrait éthanolique de *Cassia tora* (riche en anthracénosides) a servi de témoin de référence. Le système de solvant utilisé est le suivant : acétate d'éthyle, n-propanol, eau distillée (9, 4, 1 v/v).

La révélation se fait en pulvérisant une solution éthanolique de KOH 5 % sur les chromatoplaques. L'apparition de spots colorés en rouge cerise permet de suspecter la présence des anthracénosides.

- Recherche des alcaloïdes sels

Evaporer dans des capsules en porcelaine 20 ml de chaque extrait aqueux. Les résidus obtenus sont dissous dans 10 ml d'acide chlorhydrique HCl 10 % au bain marie à chaud.

Les solutions acides transférées dans une ampoule à décanter, sont rendues basiques par de l'ammoniaque 10 % jusqu'à pH 8-9 et épuisées par des fractions de chloroforme (3 X 8 ml). Les solutions chloroformiques réunies sont lavées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de base et séchées sur du sulfate de sodium anhydre. Les extraits chloroformiques obtenus sont évaporés à sec dans des capsules. Les résidus sont repris avec 1,5 ml d'acide chlorhydrique HCl 2 %. Les solutions acides contenant les alcaloïdes sels sont réparties chacune dans trois tubes : les premiers serviront de témoins et dans les autres on ajoute 2 à 3 gouttes du réactif de Mayer. L'apparition d'un précipité opalescent ou blanc jaunâtre témoigne de la présence des alcaloïdes sels.

- Recherche des tanins ou polyphénols

1 ml de chaque extrait aqueux est dilué dans trois tubes à essai avec 2 ml d'eau distillée et on ajoute 2 à 3 gouttes de solution de chlorure ferrique FeCl_3 1%.

L'apparition d'une coloration bleu-noire témoigne de la présence des tanins galliques ou d'une coloration verte foncée celle des tanins catéchiques.

L'identification des tanins a été également réalisée par CCM. L'acide tannique a servi de témoin de référence. Le système de solvant utilisé est le suivant : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1,25 v/v).

La révélation se fait en pulvérisant sur les chromaplaques une solution de chlorure ferrique FeCl_3 1% dans l'éthanol. L'apparition de spots colorés en bleu-noirs permet de suspecter la présence de tanins galliques et l'apparition d'une coloration verdâtre permet de suspecter la présence de tanins catéchiques.

- Recherche des saponosides (réaction de Liebermann-Burchard)

Dans trois tubes à essai de 1,6 cm de diamètre, diluer 2 ml de chaque extrait aqueux avec 2 ml d'eau distillée (dans les proportions 1:1) et bien secouer pendant 15 minutes. L'apparition d'une mousse de 1 cm de haut persistant au moins 15 minutes indique la présence de saponosides.

L'identification des saponosides a été également réalisée par CCM. Un extrait éthanolique de Panax de Ginseng (riche en saponosides) a servi de témoin de référence. Le système de solvant utilisé a été le suivant : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1,25 v/v).

La révélation des saponosides se fait en pulvérisant sur les chromatoplaques (après migration) une solution d'acide sulfurique 3 % dans l'éthanol. Les chromatoplaques sont ensuite placées à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes. L'apparition de spots de couleur violacée témoigne de la présence de saponosides (hétérosides stéroliques et/ou triterpéniques).

d) Dosage des composés polyphénoliques

La méthode utilisée pour le dosage des composés polyphénoliques est la complexiométrie.

- Dosage des polyphénols totaux

➤ Le principe

La méthode utilisée est la complexiométrie par le réactif de Folin-Denis. Le réactif de Folin-Denis est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration bleu verdâtre produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques totaux.

➤ Le protocole

Dans un tube à essai, 1 ml de réactif de Folin-Denis et 8 ml de carbonate de sodium 10 % sont ajoutés à 0,1 ml de chaque extrait aqueux (décocté, infusé, macéré). Après agitation, les différentes solutions sont laissées au repos pendant 15 minutes et la densité optique (DO) est lue à 660 nm contre un blanc obtenu en mélangeant 5 ml de réactif de Folin-Denis à 10 ml de carbonate de sodium 10% et de l'eau distillée qsp 100 ml.

La teneur en polyphénols totaux est obtenue par référence à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations différentes d'acide tannique dont la densité optique est lue au spectrophotomètre.

- Dosage des Flavonoïdes

➤ Le principe

La méthode utilisée est la complexiométrie par l'oxychlorure de Zirconium. L'oxychlorure de Zirconium forme avec les flavonoïdes, un complexe flavonoïde-zirconium. L'intensité de la coloration jaune obtenue en milieu tamponné permet d'évaluer par spectrophotométrie U.V, la teneur en flavonoïdes de l'échantillon.

➤ Le protocole

Dans un tube à essai, 5 ml de solution tampon et 1 ml de solution aqueuse d'oxychlorure de zirconium à 3% sont ajoutés à 0,1ml de chaque extrait aqueux (décocté, infusé, macéré). Après 15 minutes, la densité optique (DO) est mesurée à 400 nm par rapport à un blanc obtenu en mélangeant 5 ml de tampon d'acétate à 2 ml d'eau distillée.

La teneur en flavonoïdes est obtenue par référence à une courbe d'étalonnage. Les résultats seront exprimés en gramme de rutoside pour 100g de matière sèche.

*VII.3.2 L'étude toxicologique : recherche de la **DL₅₀***

L'étude toxicologique a été faite selon la méthode modifiée de Trevan (1927). La voie d'administration utilisée est la voie intrapéritonéale en raison de sa facilité d'accès chez les rongeurs. Cette voie permet une inoculation rapide et quantifiable. Les substances qui sont introduites dans la cavité péritonéale sont rapidement adsorbées dans la circulation (CCPA, 1980).

a) Le principe

La détermination de la **DL₅₀** consiste, suite à une administration en intrapéritonéale (IP) de doses uniques croissantes d'une substance à différents lots d'animaux, à évaluer la dose qui tue 50% des animaux en expérience selon la méthode cumulée.

b) Le protocole

Les souris sont mises à jeûn pendant 24 heures. La **DL₅₀** a été déterminée sur six lots de quatre souris dont un lot témoin. Les doses testées sont : 1300, 1500, 1700, 1800, 2000 mg/kg.

De l'eau pour préparation injectable (Eppi) est administrée aux témoins. Le volume d'extrait administré à chaque souris est de 0,3 ml.

La durée d'observation a été de 24 heures. On dénombre les souris qui sont mortes à chaque concentration d'extrait et on détermine la **DL₅₀**.

Les tests ont été répétés trois fois.

VII.3.3 L'étude de l'activité antiplasmodique

Elle a été faite selon une technique adaptée du protocole de Peters (Peters et al., 1975).

a) Le principe

Le test pharmacologique consiste, suite à l'administration en intrapéritonéale (IP) de doses uniques croissantes d'une substance à différents lots d'animaux, à vérifier l'activité antiplasmodique à travers l'inhibition parasitaire.

b) Le protocole

Les tests ont été réalisés sur des souris NMRI ayant un poids compris entre 20-25 g et maintenues dans les mêmes conditions de diète (24 heures), de température et d'éclairage pendant toute la durée de l'expérience.

Nous avons constitué pour chaque test des lots de quatre souris dont un lot témoin. Chaque souris reçoit approximativement en IP 10^7 érythrocytes parasités obtenus par dilution de sang parasités de souris infestées. Le volume à injecter à chaque souris est 0,2 ml.

A J_0 , 10^7 érythrocytes parasités par le *P.berghei* sont administrés par voie IP à chaque souris. Les souris des lots tests reçoivent en plus 0,2 ml des extraits de Saye par voie IP.

Le lot témoin reçoit de l'eau ppi. Les différentes doses ont été administrées en une seule fois dans la journée.

De J_1 à J_3 , on administre les mêmes doses.

A J_4 , les frottis sanguins sont réalisés en prélevant le sang sur le bout de la queue de chaque souris.

Les lames sont fixées au méthanol, colorées au Field et la réduction de la parasitémie dans chaque lot est appréciée par rapport au témoin.

Le pourcentage de la réduction de la parasitémie est donné par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de réduction de la parasitémie} = (P_o - P) \times 100 / P_o$$

P_o = Parasitémie moyenne du lot témoin

P = Parasitémie moyenne du lot test

- Recherche de l'extrait le plus actif :

La recherche de l'extrait le plus actif a été réalisée dans les mêmes conditions. Pour cela, nous avons constitué quatre lots de quatre souris dont un lot témoin. Les lots tests reçoivent chacun en IP à la dose de 25 mg/kg le décocté, l'infusé et le macéré aqueux, ceci dans la but de déterminer l'extrait le plus actif.

- Détermination de la DE_{50} et de la DE_{90} de l'extrait le plus actif :

La détermination de la DE_{50} et de la DE_{90} de l'extrait le plus actif a été également réalisée dans les mêmes conditions. Pour cela, nous avons constitué sept lots de quatre souris dont un lot témoin.

Les lots tests reçoivent en IP l'extrait le plus actif, ceci dans le but de déterminer la DE_{50} et la DE_{90} de cet extrait. Les doses testées sont : 5, 25, 50, 75, 100, 150 mg/kg.

Un test comparatif a été réalisé avec de la chloroquine sulfate. Les doses de chloroquine sulfate administrées sont : 1,25, 2,5, 5 mg/kg. Ces différentes doses ont été administrées en une seule fois dans la journée.

VII.3.4 L'analyse des résultats

La mise en évidence des principaux groupes chimiques présents dans les extraits de *Saye* sera réalisée et appréciée qualitativement selon les réactions de caractérisation de Ciulei (1982) et par la Chromatographie sur Couche Mince. Les composés polyphénoliques présents dans les extraits seront évalués quantitativement selon la méthode de Ribereau – Gayon et ses collaborateurs (1972).

La toxicité de l'extrait aqueux le plus actif sera appréciée par la mesure de la DL_{50} (dose létale qui entraîne 50% de mortalité) qui sera déterminée par le tracé de la courbe doses – réponses (% mortalité des souris) à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2000. La DL_{50} obtenue sera comparée à l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943), ce qui permettra de classer l'extrait aqueux de *Saye* en extrait faiblement, moyennement ou très toxique.

L'activité antiplasmodique de l'extrait aqueux le plus actif sera appréciée par le calcul des pourcentages de réduction de la parasitémie en fonction des doses d'extrait administrées. La dose-effet 50 de l'extrait aqueux le plus actif, c'est à dire la dose d'extrait qui entraîne 50 % de réduction de la parasitémie chez les souris sera déterminée à partir de la courbe doses – réponses (pourcentage de réduction de la parasitémie). La courbe sera tracée grâce au logiciel Microsoft Excel 2000. La DE_{50} sera exprimée sous forme de moyenne.

Le logiciel Pharmacologic Calculation System (PHARM/PCS) - Version 4.2, va nous permettre par le test de l'analyse des variances de comparer l'activité des trois extraits aqueux (décocté, infusé, macéré).

RESULTATS

VIII Résultats

VIII.1 Résultats de l'analyse phytochimique

VIII.1.1 Le rendement de l'extraction

Le tableau II résume les résultats du rendement des extractions. Les rendements sont exprimés en pourcentage par rapport à la drogue végétale sèche.

Tableau II : Résultats du rendement des extractions du Saye.

	Décocté aqueux (300g)	Infusé aqueux (300g)	Macéré aqueux (300g)
Résidu sec (g)	29, 26	30, 07	38, 93
Rendement (%)	9, 75	10, 02	12, 98

Le macéré aqueux présente le meilleur rendement avec **12,98 %** soit **38,93 g** de résidu sec.

VIII.1.2 Les groupes chimiques caractérisés

Le criblage phytochimique a été réalisé par des réactions de caractérisation et par la CCM. Il a été réalisé sur les extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) et les hydrolysats des extraits aqueux.

Les réactions de caractérisation effectuées sur les extraits aqueux et sur les hydrolysats des extraits aqueux, ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les stérols et/ou les triterpènes, les flavonoïdes, les

anthracénosides, les tanins galliques ou polyphénols et les saponosides. Les alcaloïdes sels sont absents dans nos extraits aqueux.

Le tableau III présente les groupes chimiques mis en évidence par des réactions de caractérisation dans les extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) et dans les hydrolysats des extraits aqueux.

Tableau III : Groupes chimiques mis en évidence par caractérisation chimique dans les extraits aqueux et dans les hydrolysats des extraits aqueux.

Extraits	Groupes chimiques		Réactifs chimiques de caractérisation	Colorations observées
Hydrolysats D, I, M	Stérols et/ou triterpènes	++	H ₂ SO ₄ concentré	Brun rougeâtre
	Flavonoïdes	++	HCl concentré + 2 tournures de magnésium	Jaune orangé
	Anthracénosides	++	NH ₄ OH 25%	Rouge cerise
D, I, M	Tanins galliques ou polyphénols	++	FeCl ₃ 1% dans l'eau distillée	Bleu noir
	Alcaloïdes sels	-	Réactif de Mayer	
	Saponosides	+	Mousse 1 cm de haut	

++ : abondant

+ : présent

- : absent

D : Décocté

I : Infusé

M : Macéré

La CCM effectuée sur les extraits aqueux et les hydrolysats des extraits aqueux a permis de détecter les groupes chimiques mis en évidence par les réactions de caractérisation. Les stérols et/ou les triterpènes, les flavonoïdes et les tanins galliques ou polyphénols et les saponosides.

Les triterpènes (couleur violette) ont été mis en évidence dans les hydrolysats des extraits aqueux et les deux spots de couleur violacée observés dans chaque hydrolysat d'extrait (décocté, infusé, macéré) sont respectivement de Rf 0,5 et 0,79 avec le solvant S₁ comme éluant. Le témoin, l'α-amyrine a un spot de Rf 0,88.

Les flavonoïdes (couleur jaune) sont présents dans les hydrolysats des extraits aqueux avec des spots de Rf 0,5 avec comme éluant S₂. La quercétine utilisée comme témoin a une Rf de 0,5.

Les anthracénosides (couleur rouge cerise) sont également présents dans les hydrolysats des extraits aqueux avec des spots de Rf 0,75 avec comme éluant S₄. Le témoin des anthracénosides qui est un extrait éthanolique de *Cassia tora* a présenté un spot de Rf 0,75.

Les tanins galliques ont été retrouvés dans les extraits aqueux et les spots de couleur bleue noire observés dans chaque extrait ont une Rf de 0,78 avec S₃ comme éluant. Le témoin, l'acide tannique a un spot de Rf 0,8.

Les saponosides sont présents dans les extraits aqueux et les deux spots (couleur violette) observés dans chaque extrait aqueux sont de Rf 0,69 et 0,76 avec le solvant S₃ comme éluant. Le témoin des saponosides qui est un extrait éthanolique de Panax de Ginseng a également présenté deux spots de Rf 0,69 et 0,79.

Les chromatoplaques sont présentées par les figures 5, 6, 7, 8, 9.

Le tableau IV présente les groupes chimiques mis en évidence par CCM dans les extraits aqueux et les hydrolysats des extraits aqueux.

Tableau IV : Caractéristiques des groupes chimiques mis en évidence par CCM dans les extraits aqueux.

Extraits analysés	Groupes chimiques	Spots (Rf)				Révélateurs	Colorations observées
		S ₁	S ₂	S ₃	S ₄		
Hydrolysats D, I, M	Triterpènes	0,5 ; 0,79				H ₂ SO ₄ 3% dans l'éthanol	Violet
	Flavonoïdes		0,5			KOH éthanolique 5 %	Jaune
	Anthracénosides				0,75	Idem	Rouge cerise
D, I, M	Tanins (galliques) ou polyphénols			0,78		FeCl ₃ 1% dans l'éthanol	Bleu-noir
	Saponosides			0,69 ; 0,76		H ₂ SO ₄ 3% dans l'éthanol	Violet

D : décocté ; I : infusé ; M : macéré

Système S₁ : chloroforme, acétone (8, 2 v/v)

Système S₂ : n-hexane, acétate d'éthyle, acide acétique (9, 4, 1 v/v)

Système S₃ : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1.25 v/v)

Système S₄ : acétate d'éthyle, n-propanol, eau distillée (4, 4, 3 v/v)

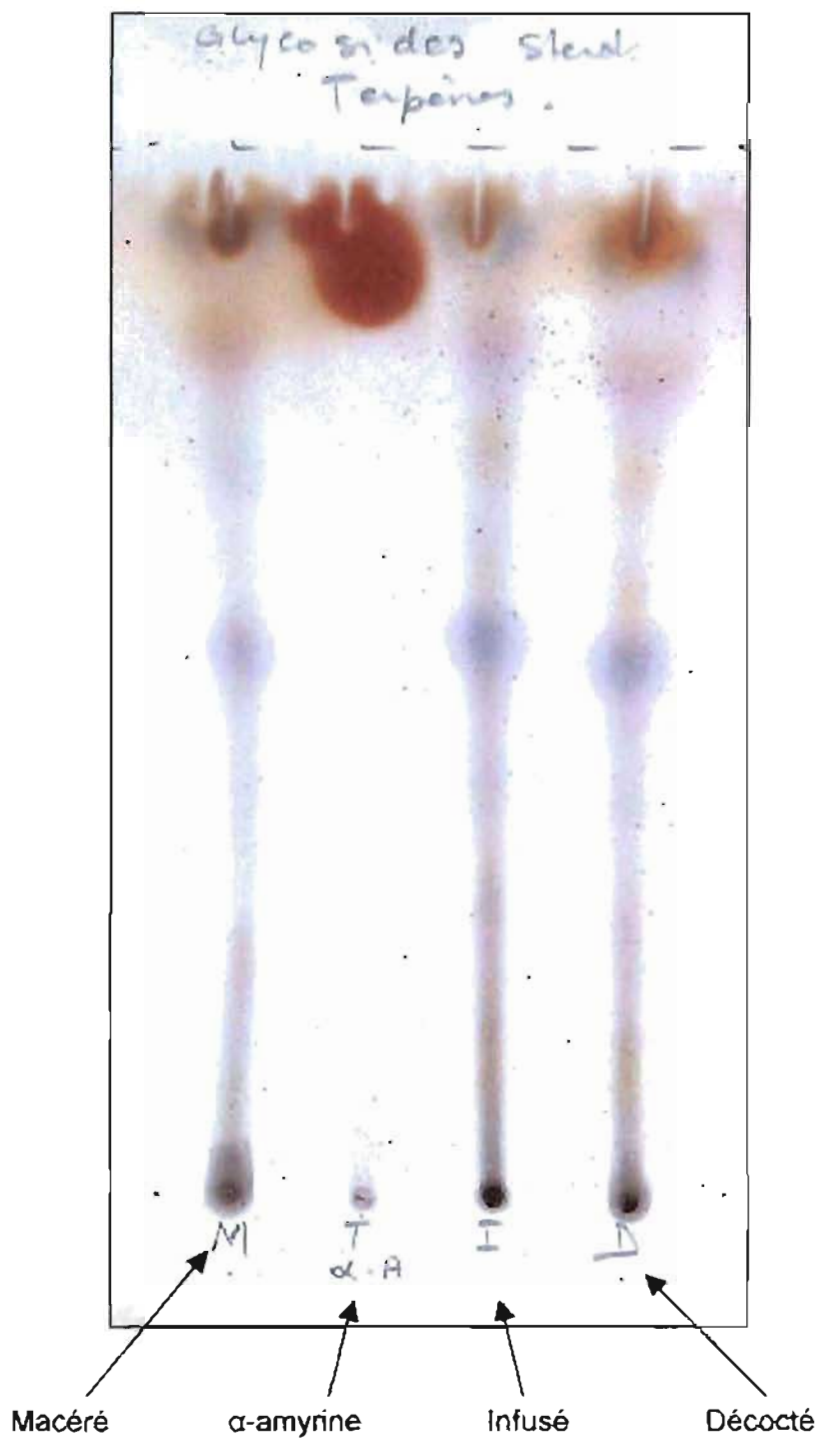


Figure 5 : Chromatogramme des triterpènes des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye.

Eluant : chloroforme, acétone (8, 2 v/v)

Révélation : H₂SO₄ 3 % dans l'éthanol (réactif de Liebermann-Burchard)

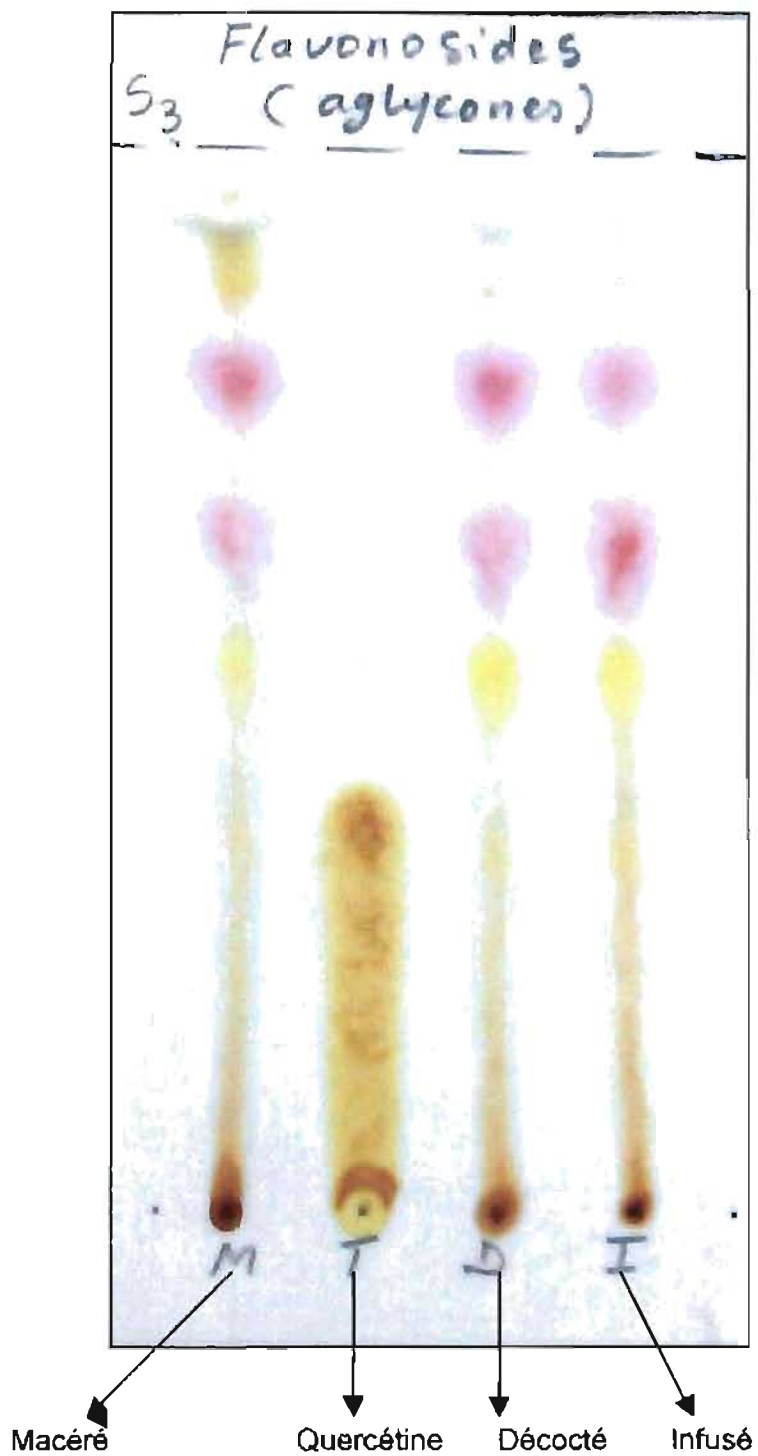


Figure 6 : Chromatogramme des flavonosides aglycones des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye .

Eluant : n-hexane, acétate d'éthyle, acide acétique (9, 4, 1 v/v)

Révélation : KOH éthanolique 5 %

S₂ ANTHRACENOSIDES
(aglycones)



Figure 7 : Chromatogramme des anthracénosides aglycones des hydrolysats des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de *Saye* .

Eluant : acétate d'éthyle, n-propanol, eau distillée (4, 4, 3 v/v)

Révélation : KOH éthanolique 5 %

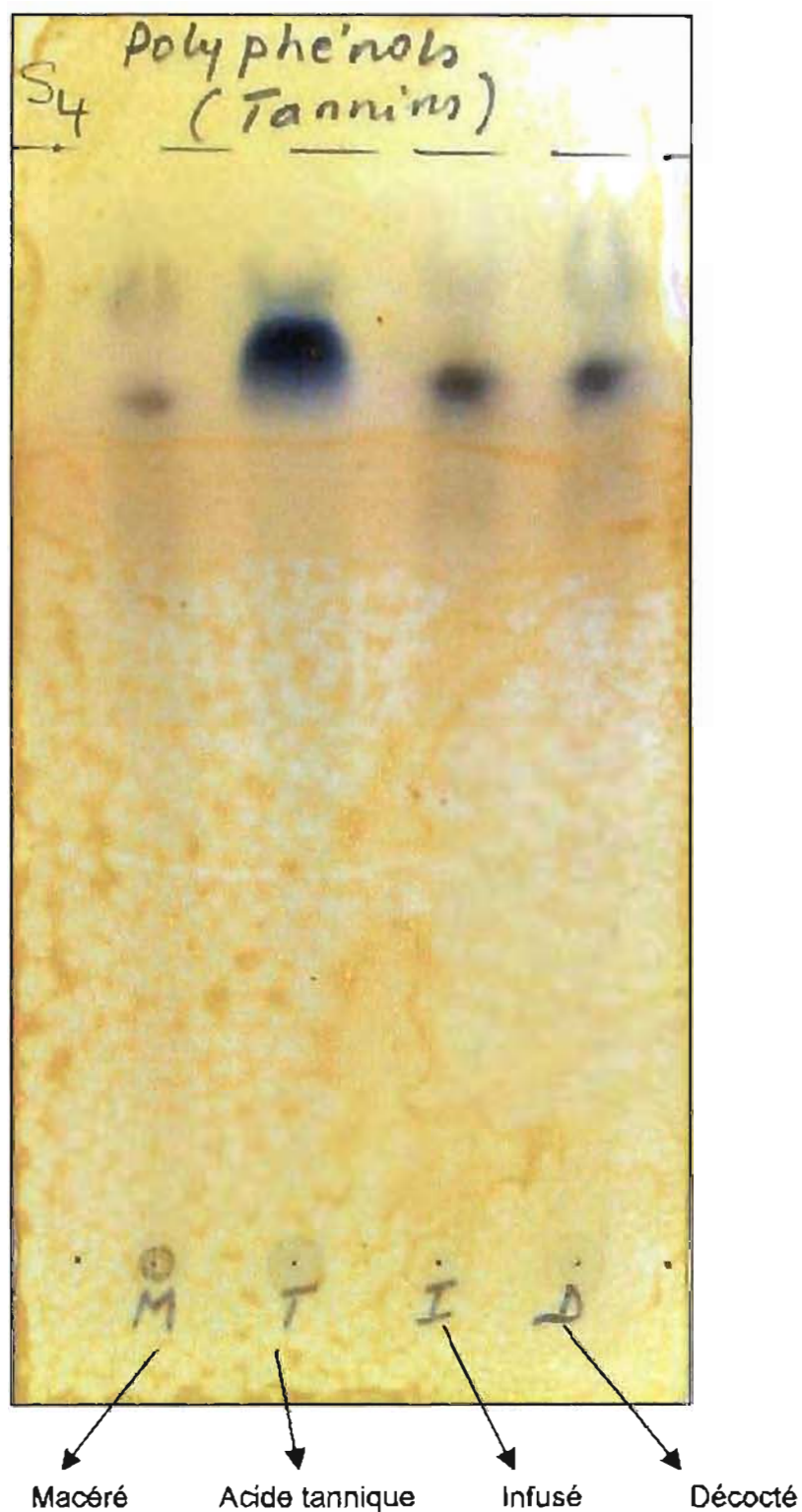


Figure 8 : Chromatogramme des tanins galliques (polyphénols) des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Sayer.

Eluant : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1, 25 v/v)

Révélation : FeCl_3 1 % dans l'éthanol

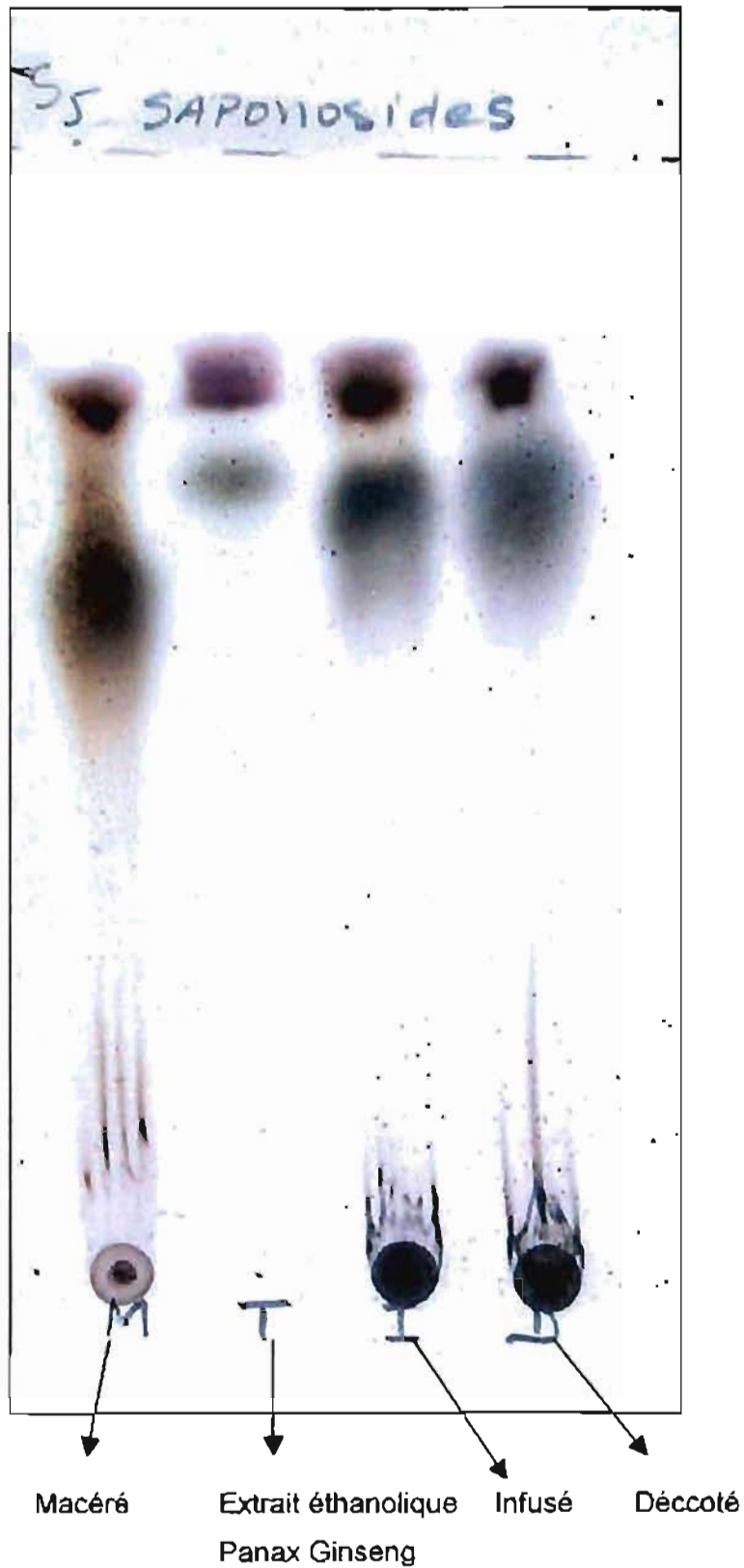


Figure 9 : Chromatogramme des saponosides des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de Saye.

Eluant : n-butanol, eau distillée, acide acétique (10, 5, 1,25 v/v)

Révélation : FeCl_3 1 % dans l'éthanol

VIII.1.3 Les dosages des composés phénoliques

Les résultats du dosage sont présentés sous formes de tableau V et VI.

a) Dosage des polyphénols totaux

Tableau V : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits aqueux.

	Décocté aqueux	Infusé aqueux	Macéré aqueux
Concentrations en mg/kg des extraits aqueux	52	43, 2	27, 2
Pourcentage en polyphénols totaux équivalents en acide tannique	13 %	15,2 %	20,2 %

Le pourcentage en polyphénols totaux est plus élevé dans le macéré aqueux (20,2%) que dans le décocté aqueux (13%) et l'infusé aqueux (15,2%).

b) Dosage des flavonosides totaux

Tableau VI : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits aqueux.

	Décocté aqueux	Infusé aqueux	Macéré aqueux
Concentrations en mg/kg des extraits aqueux	52	43,2	27,2
Pourcentage en Flavonoïdes équivalents en rutoside	9, 90 %	8, 87 %	12, 87 %

Le pourcentage en flavonoïdes est plus élevé dans le macéré aqueux (12, 87%) que dans le décocté aqueux (9,90%) et l'infusé aqueux (8,87%).

VIII.2 L'extrait aqueux le plus actif

Le tableau VII présente les résultats *in vivo* des pourcentages d'inhibition parasitaire du décocté aqueux, de l'infusé aqueux et du macéré aqueux à la dose de 25 mg/kg.

Tableau VII : Pourcentages d'inhibitions parasitaires du décocté aqueux, de l'infusé aqueux, du macéré aqueux à la dose de 25 mg/kg.

	% d'inhibition du décocté aqueux 25 mg/kg	% d'inhibition de l'infusé aqueux 25 mg/kg	% d'inhibition du macéré aqueux 25 mg/kg
Test 1	17, 02	22, 74	19, 37
Test 2	11, 23	18, 07	18, 46
Test 3	26, 37	13, 1	14, 54
Test 4	28, 05	24, 56	12, 18
Moyenne	21	20	16
Ecartype	7	4	3

Le décocté aqueux (21±7)% présente un pourcentage d'inhibition parasitaire légèrement plus élevé que celui de l'infusé aqueux (20±4)% et plus élevé que celui du macéré aqueux (16±3) % à la dose de 25 mg/kg.

L'analyse statistique des résultats effectuée par le logiciel PHARM/PCS - Version 4.2 a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des pourcentages d'inhibition parasitaire des trois extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) à P>0,05. Ce qui signifie que le décocté, l'infusé et le macéré ont une activité antiplasmodique comparable.

Pour la suite de notre étude, nous avons choisi le décocté aqueux parce qu'il est la forme traditionnelle préconisée par le promoteur.

VIII.3 La DL₅₀ du décocté aqueux

Le pourcentage de mortalité des souris en fonction des doses administrées par voie IP est exprimé dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Mortalité des souris en fonction de la dose administrée par voie IP.

Doses (mg/kg)	Pourcentage de mortalité des souris
1300	0 %
1500	25 %
1700	50 %
1800	75 %
2000	100 %

Avec la dose de **1300 mg/kg** et **2000 mg/kg** nous avons observé des mortalités respectives de **0 %** et de **100 %**.

La figure 9 représente la courbe dose létale 50 % du décocté aqueux en IP. Les valeurs de **DL₀₅**, **DL₅₀**, **DL₉₅**, déterminées sont :

$$DL_{05} = 1351,27 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{50} = 1660,55 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{95} = 1969,83 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{50} / DL_{05} = DL_{95} / DL_{50} = 1,2$$

$$DL_{95} / DL_{05} = 1,5$$

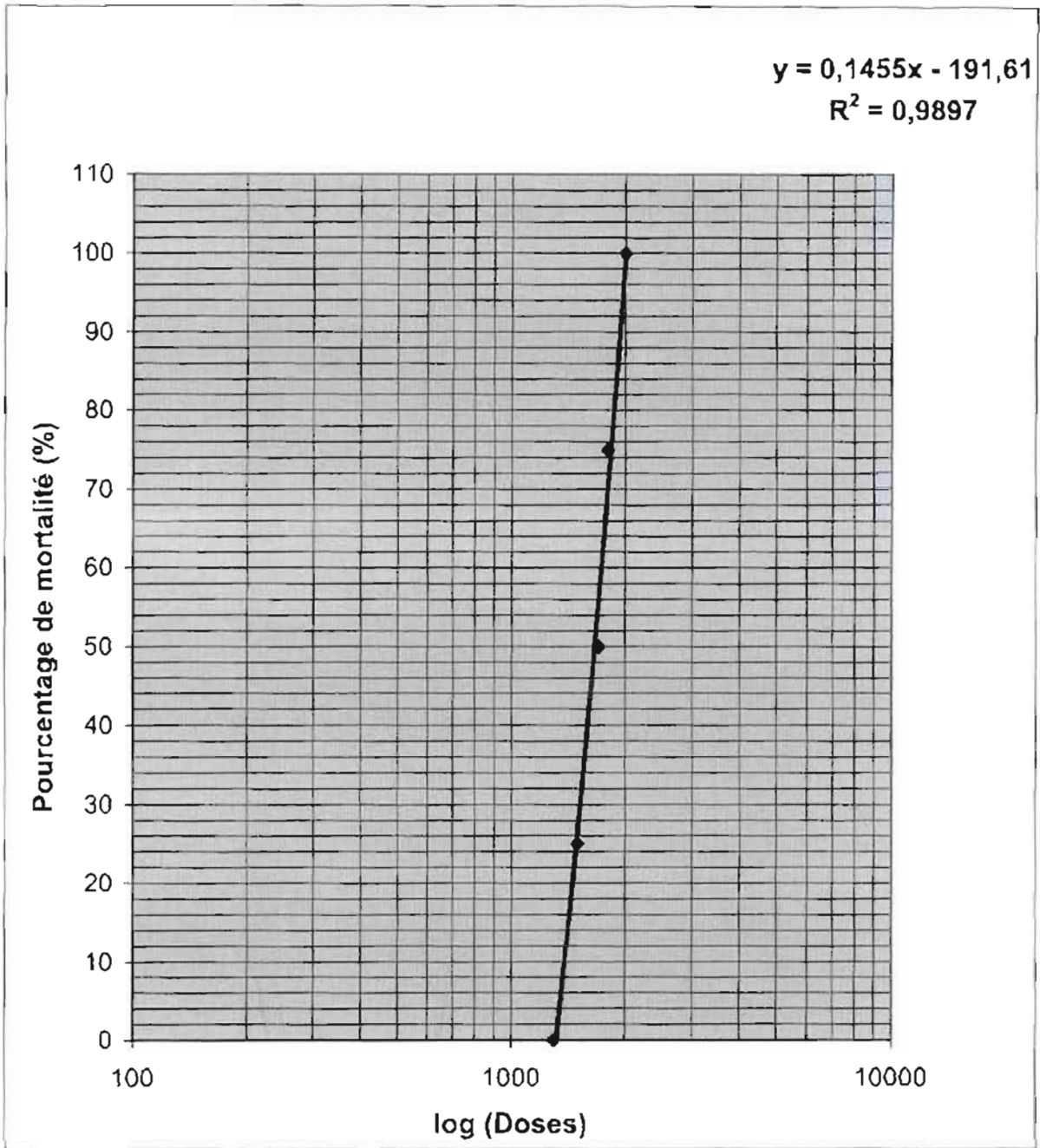


Figure 10 : Courbe de toxicité générale du décocté aqueux de Sayer chez la souris en IP.

La DL_{50} obtenue nous permettra de classer la toxicité du décocté aqueux par rapport à l'échelle du tableau IX.

Tableau IX : Echelle de toxicité d'après Hodge et Sterner (1943)

Classe de toxicité	DL50 (rat, souris) mg/kg
Extrêmement toxique	<1
Très toxique	1 à 50
Moyennement toxique	50 à 500
Faiblement toxique	500 à 5000
Pratiquement non toxique	5000 à 15000
Relativement sans danger	>15000

Ce tableau permet de classer le décocté aqueux ($DL_{50} = 1660,55$ mg/kg) comme étant faiblement toxique par voie IP. Cependant, la valeur du rapport DL_{95} / DL_{05} (1,5), indique que le décocté aqueux présente un indice de sécurité étroit et est donc d'utilisation délicate en thérapeutique si les doses actives se situaient au niveau des doses toxiques.

VIII.4 La DE_{50} et la DE_{90} du décocté aqueux

L'activité antiplasmodique du décocté aqueux est appréciée par rapport à la réduction de la parasitémie en fonction des doses testées en comparaison au lot témoin.

Les résultats sont consignés dans le tableau X.

Tableau X : Pourcentages moyens de réduction de la parasitémie en fonction des doses administrées par voie IP.

	% de réduction 5 mg/kg	% de réduction 25 mg/kg	% de réduction 50 mg/kg	% de réduction 75 mg/kg	% de réduction 100 mg/kg	% de réduction 150 mg/kg
Test 1	15	25	24	27	50	70
Test 2	13	18	25	32	57	69
Test 3	14	24	32	37	59	79
Test 4	13	19	24	40	56	80
Moyenne	14	22	26	34	56	75
Ecartype	1	4	4	6	4	6

DE₅₀ = 95,78 mg/kg

DE₉₀ = 188,74 mg/kg

DE₅₀ : Dose provoquant une létalité de 50 % de la population parasitaire.

DE₉₀ : Dose provoquant une létalité de 90 % de la population parasitaire.

La réduction de la parasitémie est dose dépendante. A la dose de **150 mg/kg**, la réduction est de **(75±6) %**.

- Détermination de l'indice thérapeutique

La **DL₅₀** étant de **1660,55 mg/kg**, l'indice thérapeutique du décocté aqueux de la tisane composée Saye est déterminé par le rapport **DL₅₀ / DE₅₀ = 17,3**.

La valeur de ce rapport nous permet de dire qu'il faut 17 fois la dose thérapeutique pour provoquer des effets toxiques.

Le décocté aqueux de la tisane composée Saye paraît tout à fait digne d'intérêt comme extrait antipaludique.

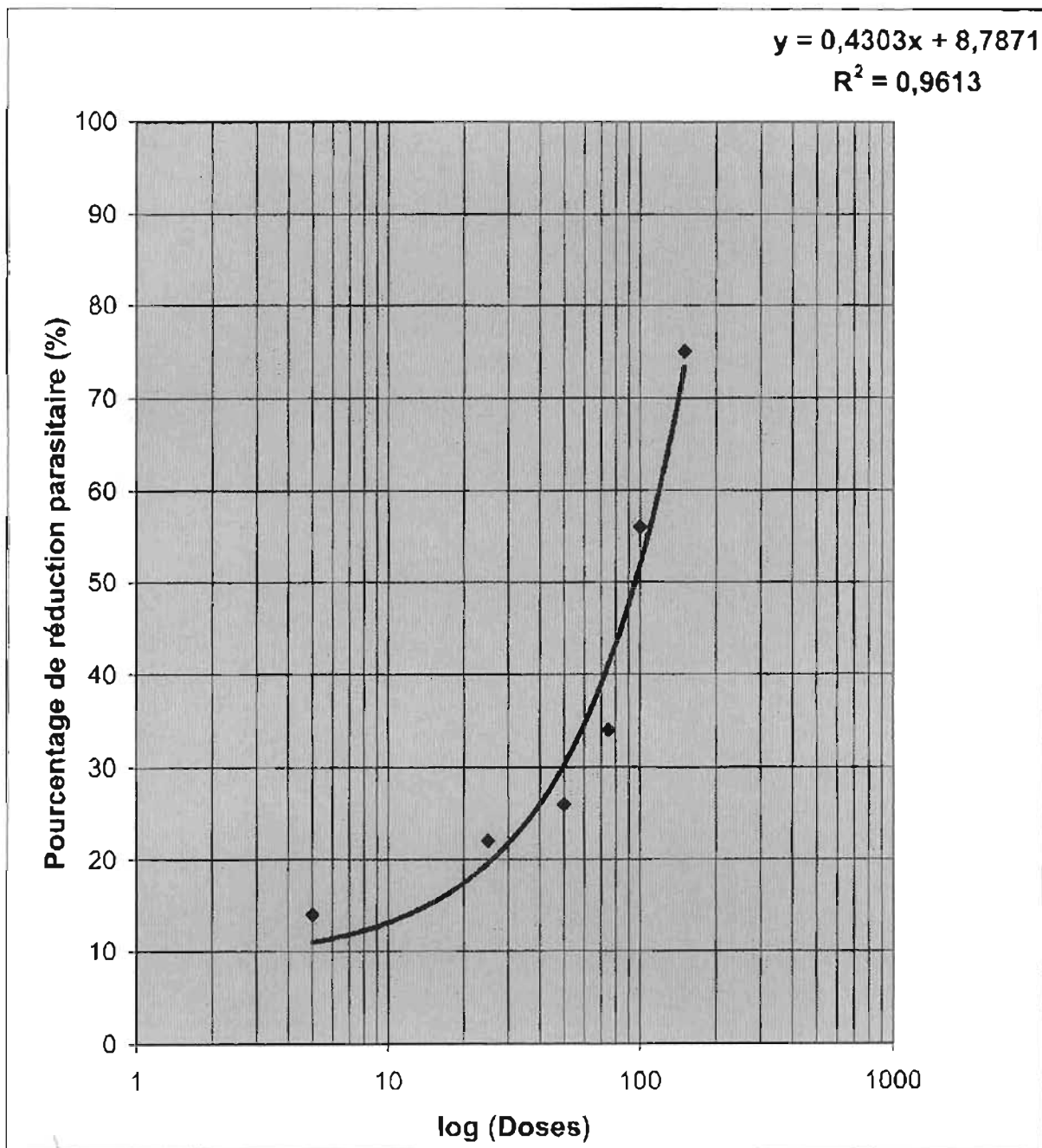


Figure 11 : Courbe dose-réponse de l'activité antiplasmodique du décocté aqueux de Saye chez la souris en IP.

VIII.5 *Activité antiplasmodique de la chloroquine sulfate*

Le tableau XI représente les pourcentages moyens de réduction de la parasitémie en fonction des doses de chloroquine sulfate.

Tableau XI: Pourcentages moyens de réduction de la parasitémie en fonction des doses de chloroquine sulfate administrées.

	% de réduction 1, 25 mg/kg	% de réduction 2, 5 mg/kg	% de réduction 5 mg/kg
Test 1	94	97	100
Test 2	98	99	100
Test 3	86	99	100
Test 4	95	98	100
Moyenne	93	98	100
Ecartype	5	1	0

La réduction de la parasitémie est dose dépendante. A la dose de **1,25 mg/kg**, la réduction de la parasitémie est de **93 %** et à la dose de **5 mg/kg**, la réduction de la parasitémie est de **100 %**.

DE₉₀ = 1,25 mg/kg

DE₉₀ décocté / DE₉₀ chloroquine sulfate = 150, 9

VIII.6 *Activité antiplasmodique comparée du décocté aqueux de Saye et de la chloroquine sulfate à la dose de 5 mg/kg*

Le tableau XII représente le pourcentage de réduction de la parasitémie du décocté aqueux et de la chloroquine sulfate à la dose de 5 mg/kg.

Tableau XII : Pourcentages de réduction de la parasitémie du décocté aqueux et de la chloroquine sulfate à la dose de 5 mg/kg.

	% de réduction 5 mg/kg
Décocté aqueux	14%
Chloroquine sulfate	100%

A la dose de **5 mg/kg**, la réduction parasitaire est de **100 %** pour la chloroquine sulfate et **14 %** pour le décocté aqueux de Saye. Les résultats obtenus montrent que la chloroquine sulfate est plus active que le décocté aqueux de Saye.

DISCUSSION

IX Discussion

IX.1 Criblage phytochimique des extraits aqueux de Saye.

Les résultats du criblage phytochimique réalisé par des réactions de caractérisation et par CCM sur le décocté, l'infusé et le macéré aqueux de la tisane composée Saye, ont permis de noter la présence d'un certain nombre de groupes chimiques susceptibles d'activités pharmacologiques :

- Les stérols et/ou triterpènes tétracycliques et pentacycliques
- Les tanins galliques ou polyphénols
- Les flavonoïdes
- Les anthracénosides
- Les saponosides

Les résultats de notre criblage phytochimique sont en accords avec ceux obtenus par certains auteurs sur chacune des plantes composantes de la tisane Saye (*Cassia alata* Linn ; *Cochlospermum planchonii* Hook ; *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn).

Les auteurs comme Elujoba et collaborateurs (1989), Gupta et collaborateurs (1991), Fuzellier et collaborateurs (1982), Khan et collaborateurs (2001), ont mis en évidence dans *Cassia alata* les groupes chimiques suivants : Stérols et/ou triterpènes , tanins , flavonoïdes, anthraquinones et saponosides.

Coulibaly (1996) a mis en évidence dans le *Cochlospermum planchonii*, les stérols et/ou terpènes, les tanins.

Weniger et ses collaborateurs (1984), Foo Yeap (1992), Bahar Ahmed et ses collaborateurs (2003), ont mis en évidence dans le *Phyllanthus amarus*, les groupes chimiques suivants : stérols et/ou terpènes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides.

Au cours de notre expérimentation, la présence d'alcaloïdes n'a pas été décelée. Cela peut s'expliquer par une variation de la composition chimique du *Phyllanthus amarus* qui compose la tisane Saye en fonction des facteurs écologiques (climatiques et édaphiques), c'est à dire le milieu dans lequel la plante a été récoltée. Ces facteurs sont d'une importance capitale dans les synthèses végétales (Millogo, 1992).

La revue de la littérature ne nous fournit pas de données chimiques sur l'association des trois plantes qui composent le Saye.

Les différents groupes chimiques mis en évidence dans les extraits aqueux de Saye peuvent agir ensemble en synergie ou au contraire en antagonisme ; ou selon le cas un seul de ces groupes chimiques peut manifester un effet pharmacologique. Cela permet d'expliquer pourquoi cette tisane peut être préconisée dans le traitement de plusieurs pathologies (paludisme, ictère, constipation).

Les propriétés pharmacologiques de ces groupes chimiques sont bien connus dans la littérature. En rapport avec leur activité antiplasmodique expérimentale et/ou thérapeutique, nous nous intéresserons en particulier aux composés polyphénoliques et aux terpènes mis en évidence dans nos extraits aqueux.

IX.1.1 Les composés polyphénoliques

Les composés polyphénoliques sont des substances très actives. L'efficacité de certains polyphénols sur le *P.f.* a été démontrée. C'est le cas des naphtoquinones tel que le lapachol (Nkunya, 1992). Selon l'auteur, ces naphtoquinones auraient sur les souches résistantes de *P.f.* une activité supérieure à celle de la quinine et de la chloroquine utilisées comme produits de référence.

Il y a également le gossypol qui a montré une activité *in vitro* sur le *P.f* mais qui présente cependant une toxicité (Nkunya, 1992).

Onegi et ses collaborateurs (2002) ont montré que les naphthoquinones (sterekunthals A et B, pyranokunthones A et B) et les anthraquinones (anthra-kunthones) extraits des écorces de racines de *Stereospermum Kunthianum* Cham. (Bignoniaceae) ont une activité antiplasmodique *in vitro* sur le *P.f*.

Bringmann et ses collaborateurs (1999) ont également montré l'activité antiplasmodiaque *in vitro* de la phénylanthraquinone sur le *P.f*.

Phillipson et Wright (1991) ont montré que l'artémétine et la casticine (flavonoïdes) ont une activité antiplasmodique à doses élevées.

Cependant, l'activité antiparasitaire des tanins (polyphénols) n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études. Il ressort de quelques études que les plantes riches en tanins ont une faible activité sur le *P.f*. Ces plantes sont considérées par certains auteurs comme étant uniquement antipyrétiques (Rasoanaivo et al, 1992).

IX.1.2 Les terpènes

L'activité antiplasmodique de certains terpènes a été démontrée. Il s'agit des quassinoides (triterpénoïdes) tels que : ailanthilone, 2'acétylglaucarubinone, glaucarubinone et halocantone, extraits de *Simarouba amara* qui ont révélé une activité antiplasmodique *in vivo* sur le *P. berghei* chez la souris (O' Neill et al., 1988).

Carvalho et ses collaborateurs (1991) ont mis en évidence l'activité antiplasmodique de l'artémisinine (sesquiterpènes) et de ses dérivés sur les souches résistantes de *P.f*.

Au stade de notre étude, il serait difficile de faire une quelconque relation structure-activité mais nous pouvons dire que l'activité observée pourrait être due à l'ensemble des groupes chimiques identifiés dans nos extraits.

IX.2 Dosage des composés polyphénoliques dans les extraits aqueux (décocté, infusé, macéré)

Le dosage des composés polyphénoliques par complexiométrie a permis d'avoir une estimation de la teneur des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) en polyphénols totaux et flavonoïdes.

La teneur du décocté aqueux en polyphénols totaux est de **13 %** dont **9,90 %** en flavonoïdes, celui de l'infusé aqueux **15,2 %** dont **8,87 %** en flavonoïdes et du macéré aqueux **20,2 %** dont **12,87 %** en flavonoïdes.

Il ressort donc que le macéré aqueux est plus riche en composés polyphénoliques que le décocté aqueux et l'infusé aqueux.

IX.3 Etude pharmacologique

IX.3.1 La recherche de l'extrait le plus actif.

Nous avons effectué des tests d'inhibition parasitaire *in vivo* des extraits aqueux (décocté, infusé, macéré) de la tisane composée Saye à la concentration de 25 mg/kg dans le but de déterminer lequel des trois extraits aqueux présenterait une inhibition parasitaire importante donc le plus actif. L'analyse statistique des résultats a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les moyennes des pourcentages d'inhibition parasitaire des trois extraits aqueux.

Nous pouvons donc dire que les extraits aqueux (décocté, l'infusé et le macéré) ont une même activité antiplasmodique.

Ainsi, pour la suite de l'étude, nous avons retenu le décocté parce qu'il est la forme traditionnelle préconisée par le promoteur.

Cependant, pour des études ultérieures, il serait nécessaire d'effectuer des tests toxico-pharmacologiques sur l'infusé aqueux et le macéré aqueux afin de déterminer les doses létales 50 % et les doses actives 50 %.

IX.3.2 La toxicité du décocté aqueux de Saye

L'étude de la toxicité du décocté aqueux occupe une place importante, car elle permet de fixer une fourchette de dose d'utilisation dans les conditions de sécurité d'emploi.

La dose létale 50 % (DL_{50}) du décocté aqueux est de **1660,55 mg/kg**. Cette valeur de la DL_{50} permet de classer l'extrait aqueux comme étant faiblement toxique d'après l'échelle de Hodge et Sterner (1943).

Les rapports DL_{50} / DL_{05} (1,2) et DL_{95} / DL_{50} (1,2) sont égales. Ceci atteste de la régularité de la pente de la droite de régression de la mortalité des souris selon la dose.

Le rapport DL_{95} / DL_{05} (1,5), montre que la DL_{95} est de 1,5 fois la DL_{05} , ce qui veut dire qu'il faut donc 1,5 fois la dose non toxique pour provoquer sûrement la toxicité. Cet intervalle est très petit et indique une utilisation à risque entre ces deux extrémités. Cependant, cet aspect est atténué par le caractère pratiquement non toxique de l'extrait aqueux.

Au cours de l'expérimentation, les manifestations de l'intoxication observées chez les souris sont :

- Un étirement du train postérieur avec une tendance à la compression juste après l'administration.
- Une anorexie.

- Un hérissément des poils.
- Une atteinte oculaire caractérisée par la fermeture d'un ou des 2 yeux.
- Une perte de tonus.
- Un tableau de somnolence et d'atonie générale conduisant à la mort. Ce tableau clinique est observé à des doses fortes.

Le tableau de somnolence observé pourrait être dû à l'action sédatrice de l'extrait aqueux. En effet, Anton (1979) a rapporté que les composés terpéniques que nous avons identifiés dans notre extrait sont doués de propriétés sédatives.

IX.3.3 L'activité antiplasmodique du décocté aqueux

Au vu des pourcentages de réduction de la parasitémie en fonction de la dose administrée, nous constatons un effet dose dépendant. A la dose d'administration de **150 mg/kg**, l'inhibition des parasites par le décocté aqueux est de **75 %** alors qu'à la dose de **5 mg/kg**, la chloroquine entraîne une inhibition parasitaire de **100 %**.

La **DE₅₀** du décocté aqueux déterminée graphiquement est de **95,78 mg/kg** et celle de la **DE₉₀** est de **188,74 mg/kg**.

La valeur de la **DE₅₀** du décocté aqueux est supérieure à celle des dérivés de l'artéméthère qui est de **5 à 8 mg/kg** selon des études menées par O'Neill et ses collaborateurs (1999) et aussi supérieure à celle de la méfloquine qui, d'après les études menées par Xy et ses collaborateurs (1992), est de **25 mg/kg**.

Le rapport **DE₉₀ décocté / DE₉₀ chloroquine sulfate = 150,9**. Cette valeur montre que la **DE₉₀** du décocté aqueux est environ **151 fois** la **DE₉₀** de la chloroquine sulfate. Ce qui signifie que le décocté aqueux est beaucoup moins actif que la

chloroquine sulfate. Cela se comprend aisément quand on sait que la chloroquine (schizontocide d'action rapide) est une molécule pure alors que le décocté aqueux de la tisane composée Saye est un totum de molécules chimiques qui peuvent agir en synergie ou développer un antagonisme. A ce niveau, un isolement des molécules actives responsables de l'activité antiplasmodique, permettrait de faire une étude comparative beaucoup plus fiable.

Cependant, si nous nous référons aux travaux antérieurs et surtout à ceux de Sauvain et ses collaborateurs (2000), sont considérés comme :

- Extraits à activité antiplasmodique modérée, ceux qui à la dose de 500 mg/kg/jour, entraînent une réduction de la parasitémie égale ou supérieure à 50 %.
- Extraits à activité antiplasmodique bonne, ceux qui à la dose de 250 mg/kg/jour, entraînent une réduction de la parasitémie égale ou supérieure à 50 %.
- Extraits à activité antiplasmodique très bonne, ceux qui à la dose de 100 mg/kg/jour, entraînent une réduction de la parasitémie égale ou supérieure à 50 %.

Dans nos conditions expérimentales, à la dose de **100 mg/kg/jour**, le décocté aqueux de la tisane composée Saye entraîne une réduction de la parasitémie égale à **56 %**.

Nous pouvons donc dire que le décocté aqueux de la tisane composée Saye présente une très bonne activité antiplasmodique. De plus, l'indice thérapeutique étant égal à **17,3**, le décocté aqueux est tout à fait digne d'intérêt comme extrait antipaludique.

Cette activité antiplasmodique peut s'expliquer par la présence dans l'extrait de composés polyphénoliques et de composés terpéniques.

CONCLUSION ET SUGGESTIONS

X Conclusion

A l'issue de cette étude qui a consisté à tester *in vivo* l'activité antiplasmodique des extraits aqueux de la tisane composée Saye sur *P.berghei*, nous avons mis en évidence une activité antiplasmodique du décocté aqueux. Le décocté aqueux de la tisane composée Saye est la forme la plus utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme simple. Le Saye, mélange de trois plantes (*Cassia alata* Linn, *Cochlospermum planchonii* Hook, *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn) est un cocktail de groupes chimiques qui peuvent agir en synergie ou en antagonisme.

L'étude phytochimique du décocté aqueux a permis de mettre en évidence des composés polyphénoliques et des composés terpéniques. Ces composés pourraient être les composés majeurs à activité antiplasmodique du décocté aqueux de la tisane composée Saye.

Sur le plan toxicologique, les tests effectués sur des souris NMRI par voie IP ont montré que le décocté aqueux est faiblement toxique selon l'échelle de Hodge et Sterner (1943).

Au plan pharmacologique, les résultats de l'étude de l'activité antiplasmodique indiquent une faible activité du décocté aqueux par rapport à la chloroquine (la DE_{90} du décocté étant égale à 151 fois celle de la chloroquine). Mais, par rapport à son indice thérapeutique (17,3) et au classement effectué par Sauvain et ses collaborateurs, le décocté aqueux de la tisane Saye est considéré comme ayant une très bonne activité antiplasmodique.

XI ***Suggestions***

De cette étude, nous suggérons :

- Une étude chimique plus approfondie du décocté aqueux à l'aide des méthodes de fractionnement pour identifier la fraction responsable de l'activité antiplasmodique et plus tard déterminer la structure chimique de la ou des molécules actives.

- Une étude *in vitro* du décocté aqueux sur les souches chloroquinosensibles et chloroquinorésistantes afin de comparer l'effet antiplasmodique.

- Une étude comparative *in vivo* et *in vitro* de l'activité antiplasmodique, de l'infusé aqueux et du macéré aqueux de la tisane composée *Saye*.

- Une extraction des tanins de la drogue végétale pour préparer des formes galéniques qui seront utilisées comme fébrifuges.

- Une extraction des composés terpéniques de la drogue végétale pour préparer des formes galéniques qui seront utilisées comme antiplasmodiques.

- Une inscription du numéro de lot , de la date de péremption et des effets indésirables sur les sachets de la tisane *Saye*.

- Un encouragement à l'étude des associations de plantes qui sont des formes très utilisées en médecine traditionnelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

XII Références bibliographiques

1. **Addae-Mensah I., Waibel R., Achenbach H. (1985)**
Novel long-chain triacylbenzenes from *Cochlospermum planchonii* constituents of West African Medicinal plants, XUI.
Leibigs Ann. Chem., pp. 1284-1287
2. **Adjanohoun E.J., Adjakidje U., Ahyi M.R.I., Aké Assi L., Akoegninou A., et al. (1989)**
Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin.
Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, ACCT, Paris, p 895
3. **Adjanohoun E.J., Ahyi M.R.A., Aké Assi L., Akpagnana K., Chibon P., El-Hadji A., Garba M., Gassita J.N., et al. (1986)**
Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo.
Collection Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, ACCT, Paris, p 671
4. **Adjanohoun Edouard, Simone De Souza (2002)**
Guide pratique de phytothérapie.
Bulletin Régional d'information du CENPREBAH, vol 4 : 46-62
5. **Aké Assi L. Guinko S. (1991)**
Plantes utilisées dans la médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest.
Edition Roche. Suisse, pp. 46-47
6. **Anton R. (1979)**
Médicaments aromatiques, une thérapeutique d'avenir ?
Les actualités pharmaceutiques, vol 154 : 26
7. **Assane M., Traoré M., Bassene E., Sere A. (1993)**
Etude cholérétique de *Cassia alata* Linn chez le rat.
Dakar-Médicale, vol 38: 73-77

8. **Bahar Ahmed and Tanveer Alan. (2003)**
 Components from whole plant of *Phyllanthus amarus* Linn.
Indian J. Chemistry, vol 42B: 1786-1790

9. **Balkouma P. (1999)**
 Etude de l'activité antiplasmodique *in vivo* de l'extrait hydroethanolique de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae) sur la souris NMRI infestée par *Plasmodium berghei*.
 Thèse de doctorat en Pharmacie, Bamako, p 122

10. **Benoît F., Valentin A., Da B., Dakuyo Z., Descamps L., Mallié M. (1996)**
 Traitement du paludisme à Banfora (Burkina Faso) : Enquête sur l'efficacité du N'Dribala (*Cochlospermum planchonii* Hook).
Abstracts du 13^e Colloquio Europeo di Ethnopharmacologia. Genova, Erga .

11. **Berhaut J. (1975)**
 Flore illustrée du Sénégal.
 Tome III. Dakar, p 634

12. **Bringmann G., Menche D., Bezabih M., Abegaz B.M., Kaminsky R. (1999)**
 Antiplasmodial activity of knipholone and related natural phenylanthraquinnes.
Planta Med., vol 65 (8): 757-758

13. **Bryskier A., Labro M.T. (1988)**
 Paludisme et médicaments.
 Arnette, p 276

14. **Carvalho L.H., Brandao M.G., Santos Filho D., Lpoez J.L., Krettli A.U. (1991)**
 Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied *in vivo* in *P.berghei* infected mice and *in vitro* against *P.f.* in culture.
Brazilian J. Med. Biol. Res., vol 24 (11): 1113-1123

15. **Chevli R., Fitch C.D. (1982)**
The antimalarial drug mefloquine bind to membrane phospholipids.
Antimicrob. Agents Chemother., vol 21 (4): 581-586
16. **Chou A.C., Chevli R., Fitch C.D. (1980)**
Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites.
Biochemistry, vol 19 : 1543-1549
17. **Ciulei I. (1982)**
Methodology for analysis of vegetable drug.
Practical Manual on Industrial Utilization of Medicine an Aromatic Plants.
Bucharest : Ministry of Chemical Industry, pp. 16-27
18. **Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) (1980)**
Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, vol1,
CCPA, Ottawa, Ont.
19. **Coulibaly M. (1996)**
Contribution à l'étude *in vitro* de l'activité antiplasmodique de huit plantes médicinales du Burkina Faso.
Thèse de doctorat en sciences, FAST, UO, p 151
20. **Dakuyo Z.P. (1992)**
Le paludisme en Afrique.
Vie et santé, n°10
21. **Descotes E.J. (1985)**
La DL₅₀ en 1984.
Lyon Pharm., vol 36 : 189-191
22. **Dhar M.L., Dhar M.M., Dhawan B.N., Mehrotra B.N. and Ray C. (1968)**
Screening of Indian plants for biological activity. Part I.
Indian J. Exp. Biol., vol 6: 232-247

- 23. Divo A.A., Geary T.G., Jensen J.B. (1985)**
Oxygen and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *P. falciparum* in culture.
Antimicrob. Agents chemother., vol 27 (1): 21-27
- 24. Elujoba A.A., Ajulo O.O., Iweibo G.O. (1989)**
Chemical and biological analyses of Nigerian *Cassia* species for laxative activity.
J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol 7 (12) : 1453-1457
- 25. Fitch C.D. (1984)**
Mode of actions of antimalarial drugs In: Malaria and the red cell.
Ciba foundation. Symposium 94. Pitman éd. London, p 222-232
- 26. Foo Yeap L. (1993)**
Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenol hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*.
Phytochemistry, vol 33 (2): 487-491
- 27. Foster H.L., Small J.D., Fox J.G. (1983)**
The mouse in Biomedical research.
Normative Biology, Immunology and Husbandry.
Academy Press, New York, vol III
- 28. Fuzellier M. C., Mortier F., Lectard P. (1982)**
Activité antifongique de *Cassia alata* L.
Ann. Pharm. Fr., vol 40 (4): 357-363
- 29. Gentillini M. (1993)**
Paludisme In : Médecine tropicale.
Flammarion - Méd. Sciences, 5e éd., pp. 91-122

30. **Gentillini M., Dufflo B. (1986)**
Maladies parasitaires : Paludisme.
Médecine tropicale Flammarion – Méd. Sciences, 4e éd., p 850
31. **Ginsburg H. (1988)**
Effet of calcium antagonists on malaria susceptibility to chloroquine.
Parasitology today, vol 4 (8): 209-211
32. **Gu H.M., Ellis D.S., Li Z.L., Peters W., Robinson B.L., Tovey G., Warhust D.C. (1985)**
The chemotherapy of rodent malaria, XXXIX. Ultrastructural changes following treatment with artemisinin of *P. berghei* infection in mice, with observations of the localization of (3H) dihydroartemisinin in *P. falciparum* in vitro.
Ann. Trop. Med. Parasitol., vol 79 (4): 367-374
33. **Guiguemdé T.R., Gbary A.R., Coulibaly S.O., Ouédraogo J.B. (1996)**
Comment réaliser et interpréter les résultats d'une épreuve de Chimiorésistance de *P. falciparum* chez les sujets malades en zone tropicale.
Cahiers de santé, vol 6 : 187-191
34. **Gupta D., Singh H.J. (1991)**
Flavonoid glycosides from *Cassia alata*.
Phytochemistry, vol 30 (8): 2761-3
35. **Hemelata and Surai B. Kalidar. (1993)**
Alatinone, an anthraquinone from *Cassia alata*.
Phytochemistry, vol 32 (6): 1616-1617
36. **Hodge H.C., Sterner J.H. (1943)**
Determination of substances acute toxicity by LD₅₀.
American Industrial Hygien Association, vol 10: 93

37. **Houghton P.J. et al. (1996)**
Two securinega-type alkaloids from *Phyllanthus amarus*.
Phytochemistry, vol 43 (3): 715-717
38. **Ibrahim D., Osman H. (1995)**
Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia.
J. Ethnopharmacol., vol 45 (3): 151-6
39. **Kerharo J., Adams J.G. (1974)**
La pharmacopée sénégalaise traditionnelle In: Plantes médicinales et toxiques.
Edition Vigot et Frères. Paris, pp. 264-265
40. **Khan M.R., Kihara M., Omoloso A.D. (2001)**
Antimicrobial activity of *Cassia alata*.
Fitoterapia, vol 72 (5): 561-4
41. **Kitisin T. (1952)**
Pharmacological studies 3. *Phyllanthus niruri*.
(Siriraj Hospital Bangkok Thailand) *Siriraj Hosp. Gaz*, vol 4: 641-649
42. **Krogstad D.J., Schlesinger P.H. (1987)**
The basis of antimalarial action: Non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH.
Am. J. Trop. Med. Hyg., vol 36 (2) : 213-220
43. **Krogstad D.J., Gluzman I.Y., Kyle D.E., Oduola A.M., Martin S.K., Milhous W.K., Schlesinger P.H. (1987)**
Efflux of chloroquine from *P.falciparum* : mechanism of chloroquine – resistance.
Science, vol 238: 1283-1285

44. **Kwaky E., Berko F., Meshnick S.R. (1989)**
Blinding of chloroquine to DNA Mol.
Biochem. Parasito., vol 35 : 51-56
45. **Le Bras J., Basko L.K. (1991)**
Chimiorésistance des Plasmodiums In : Paludisme.
Universités francophones « UREF » p 146-167
46. **Lichtfield C.J.T., Wilcoxon F.A. (1949)**
A simplified method of evaluation of doses-effects experiments.
J.Pharmacol. Exp. Ther., vol 95 : 99-113
47. **Makler M.T., Hinrichs D.J. (1993)**
Measurement of the Lactate Deshydrognase : stage-specific lactate
production in synchronized culture.
Exp.Parasitol., vol 54: 391-396
48. **Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M. (2000)**
Plasmodies-Malaria : traitement, prévention.
Encycl. Méd. Chir., Maladies infectieuses, 8-507-A20, p 16
49. **Mandava V. Rao and Kurian M. Alice (2001)**
Contraceptive effects of *Phyllanthus amarus* in female rat.
Phytother. Res., vol 15: 265-267
50. **Meshnick S.R. (1990)**
Chloroquine as intercalator: A Hypothesis revised.
Parasitology today, vol 6 (3): 77-79
51. **Miller B.L.C., Tainter M.T. (1944)**
Estimation of DL₅₀ and its error by log-probit graph Riper.
Proc-Soc. Biol. Exp. Med., vol 57: 261-264

- 52. Millogo H. (1992)**
Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Holarrhena floribuuda* (G.Don) Dur. et Schinz (Apocynaceae) : Etude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxico-pharmacologique.
Thèse de Doctorat de 3^e cycle, FAST, UO, p 117
- 53. Moriyama H., Lizuka T., Nagai M. (2001)**
A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation.
Yakugaku Zasshi, vol 121 (11): 817-20
- 54. Morton J.F. (1981)**
Atlas of Medicinal Plants of Middle America.
C.C. Thomas Pub., Springfield, Ill., USA, p 1420
- 55. Nkunya M.H.H. (1992)**
Progress in the search for antimalarials .
Published by Napreca, Addis Abeba University. Addis Abeba , p 35
- 56. O.M.S. (1998)**
Aide mémoire n° 94 révisé Octobre.
- 57. O.M.S. (2001)**
Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques, rapport d'une consultation technique de l'OMS . Genève du 4-5 Avril.
- 58. O'Neill M.J., Phillipson J.D. (1988)**
Plants as sources of antimalarial drugs, Part VI : Activity of *Simarouba amara* fruits.
J. of Ethnopharmacol., vol 22 (2): 183-190

59. **O'Neill M.J., Searle N.L., Kan K.W., Starr R.C., Maggs J.L., Ward S.A., Raynes K., Park B.K. (1999)**
Novel, potent, semisynthetic antimalarial carba analogues of the first generation 1, 2, 4-trioxane arthemether.
J. Med. Chem., vol 42 (26): 5478-5493
60. **Odetola A.A., Akojenu S.M. (2000)**
Anti-diarrhoeal and gastro-intestinal potentials of the aqueous extract of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae).
Afr. J. Med. Sci., vol 29 (2): 119-22
61. **Ogunti E.O., Elujoba A.A. (1993)**
Laxative activity of *Cassia alata*.
Fitoterapia, vol 64 (5): 437-439
62. **Onegi B., Kraft C., Kohler I., Freund M., Jenett-Siems K., Siems K., Beyer G., Melzig MF, Bienzle U., Eich E. (2002)**
Antiplasmodial activity of naphthoquinones and anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*.
Phytochemistry, vol 60 (1): 39-44
63. **Peters W. et Portus J.H., Robinson B.L. (1975)**
The chemotherapy of rodent malaria, XXV : Antimalarial activity of WR 122, 455 (9-phenanthrenemethanol) in vivo and in vitro.
Ann. Trop. Med. Parasitol., vol 70 (3) : 262
64. **Phillipson J.D., Wright W.C., Bray H.D., O'Neil J.M., Warhurst D.C., Quetin-Leclercq J., Angenot L. (1991)**
Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *strychnos usambarensis*.
Planta Med., vol 57: 337-340

65. **Phillipson J.D., Wright W.C. (1991)**
Antiprotozoal agents from plants sources.
Planta Med., vol 57(1): 57-58
66. **Pousset J.L. (1992)**
Plantes médicinales africaines.
Possibilités de développement. Ellipses, p 156
67. **Pouvelle B., Buffet P.A., Lepolard C., Scherf A., Gysin J. (2000)**
Citoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes.
Nat. Med., vol 6 : 1264-1268
68. **Presber W., Hegenscheid B., Hernandez-Alvarez H., Herrmann D.K., Brendez C. (1992)**
Inhibition of the growth of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* *in vitro* of *Cochlospermum angolense* (Welw.).
Acta Tropica 50, pp. 331-338
69. **Presber W., Herrmann D.K., Hegenscheid B. (1991)**
The effect of an extract from *Cochlospermum angolense* ("Burututu") on *Plasmodium berghei* in the mouse malaria suppression test.
Angew Parasitol., vol 32: 7-9
70. **Prieur D.D.J. et al. (1973)**
Procedure of preclinical toxicologic evaluation of cancer chemotherapeutic agents : Protocols of the laboratory VI mouse LD₅₀ study cancer.
Chemother., vol 3: 8
71. **Rahman Nik Najib Nik A., et al. (1999)**
Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants.
J. Ethnopharmacol., vol 64: 249-254

72. **Rajeshkumar N.V.et al. (2002)**
Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract.
J. Ethnopharmacol., vol 81: 17-22
73. **Raphael Regi K., Sabu M.C., Ramadasan Kuttan. (2002)**
Hypoglycemic effect of methanol extract of *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential.
Indian J. Exp. Biol., vol 40: 905-909
74. **Ribereau – Gayon J. et P., Peynaud E., Sudraud P. (1972)**
Sciences et Techniques du Vin.
Tome I. Dunod.
75. **Rosoanoaivo R., Ratsimamanga-Urverg S., Rakoto-Ratsimamanga A. (1992)**
Quatre ans de recherche en chimiothérapie antipaludique. Bilan et perspectives.
Rev. Méd. Pharm. Afr., vol 6 (2)
76. **Ross Kelly T., Zhenkun Ma and Wei Xu . (1993)**
Revision of structure of alatinone to emodin.
Phytochemistry vol 36 (1): 253 - 254.
77. **Saïssy J.M. (2001)**
Paludisme grave.
Arnette. Paris, pp. 4-5
78. **Sauvain M. et al. (2000)**
A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo Indians.
J. Ethnopharmacol., vol 69: 127-137

79. **Spencer C.F. et al. (1947)**
Survey of plants for antimalarial activity.
Lloydia, vol 10: 145-147
80. **Srividya N., Perival S. (1995)**
Diuretic, Hypotensive and Hypoglycaemic effect of *Phyllanthus amarus*.
Indian J. Exp. Bio., vol 33 (11): 861-4
81. **Syamasundar K.V. et al. (1985)**
Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs.
J. Ethnopharmacol., vol 14: 41-44
82. **Thamlikitkul V., Bunyaphatsara N., Dechatiwongse T., Theerapong S., Chantrakul C., Thanaveerasuwan T., Nimitnon S., Boonroj P., Punkrut W., Gingsungeon V., et al. (1990)**
Randomized controlled trial of *Cassia alata* Linn. for constipation.
J. Med. Assoc. Thai., vol 73 (4): 217-22
83. **Tiwari R.D., Yadava O.P. (1971)**
Structural Study of the quinone pigments from the roots of *Cassia alata*.
Planta Med., vol 19 (4): 299-305
84. **Treva A.J.W. (1927)**
The error of determination of toxicity.
Proc. Royal.Soc., vol(101B): 483-514
85. **Unander David W., Webster Grady L., Blumberg Baruch S. (1995)**
Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) IV. Clustering of antiviral uses and other effects.
J. Ethnopharmacol., vol (45): 1-18

86. **Venkateswaran P.S., Millman I., Blumberg B.S. (1987)**
Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and wood chuck hepatitis viruses : *in vitro* and *in vivo* studies.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), vol 84 (1): 274-278
87. **Villasenor I.M., Canlas A.P., Pascua M.P., Sabando M.N., Soliven L.A. (2002)**
Bioactivity studies on *Cassia alata* Linn. leaf extracts.
Phytother. Res., pp. S93-S96
88. **W.H.O. (1997)**
World malaria situation in 1994.
Wkly Epidemiol Rec., vol 72: 269-74
89. **Warhurst D.C. (1981)**
The quinine hemin interaction and its relevance to anti-malarial activity.
Biochem. Pharmacol., vol 30: 3323-3327
90. **Warhurst D.C. (1986)**
Antimalarial schizontocides: Why a permease is necessary?
Parasitology Today, vol 2 (16):331-332
91. **Weniger B., Savary H., Daguihl R., Saturne A. (1984)**
Tri phytochimique de plantes de la liste TRAMIL.
Seminario TRAMIL I, Puerto Principe, Haiti, p 175
92. **Xy Y., Shao B.R., Chu Y.H. (1992)**
The blood schizontocidal effects of pyronaridine, amodiaquine, mefloquine and quinghaosu on mice infected with *Plasmodium berghei*.
Chung Kuo Chi Shen Chung Hsueh Yu Chi Sheng, vol 10 (2): 120-123

- 93. Ye Z., Dyke K.V. (1989)**
Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquine resistant of *Plasmodium falciparum*.
Biochem. Biophys. Res. Comm., vol 159 (1):242-247
- 94. Zhao Y., Manton W.K., Lee K.H. (1986)**
Antimalarial agents 2-Artesunate, an inhibitor of cytochrome-oxidase activity in *P.berghei*.
J.of Natural Products, vol 49: 139-142

ANNEXES

Coloration de Field (1948)

Solution A

Bleu de méthylène officinal.....	0.8g
Azur 1 (= Azur 2).....	0.5g
Phosphate disodique, anhydre.....	5.0g
Phosphate monopotassique.....	5.25g
Eau distillée.....	500g

Solution B

Eosine, hydrosoluble.....	1.0g
Phosphate disodique, anhydre.....	5.0g
Phosphate monopotassique.....	6.25g
Eau distillée.....	500g

Dissoudre d'abord les phosphates, ajouter les colorants. Verser chaque solution dans un flacon et mettre au bain marie pendant 30 minutes. Filtrer et conserver séparément en flacons de verre.

Technique :

Préparer 4 béchers de coloration à large col, le premier pour la solution A, le second pour la solution B et les deux autres pour l'eau distillée. Les solutions A et B doivent être filtrés avant l'emploi.

- Plonger la lame dans la solution A pendant 25 secondes. S'il s'agit d'un frottis sanguin, la lame doit être d'abord fixée au méthanol avant d'être plongée dans la solution A.
- Retirer la lame et laver dans un bécher à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans la solution B pendant 25 secondes.

- Retirer la lame et la laver à l'eau distillée.
- Plonger à nouveau dans la solution A pendant 10 secondes.
- Retirer la lame et la laver à nouveau à l'eau distillée.
- Laisser sécher la lame sur un râtelier.

Coloration de Giemsa

Matériel :

Solution mère de Giemsa.

Méthanol.

Coton hydrophile.

Cuves à coloration (pouvant contenir 20 lames dos à dos).

Eau distillée ou désionisée, tamponnée à pH 7.2

Eprouvette graduée de 100ml à 500ml (suivant le nombre de lames à colorer).

Eprouvette graduée de 10 à 025ml (suivant la quantité de solution mère de colorant à mesurer).

Flacon ou bécher (la capacité dépend de la quantité de colorant à préparer).

Une minuterie.

Un égouttoir pour le séchage des lames.

Méthode :

Remarque : cette méthode donne de meilleurs résultats si les lames sont séchées toute la nuit.

- Fixer le frottis en tamponnant délicatement avec un petit morceau de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant quelques secondes dans une cuve contenant du méthanol. Eviter le contact de la goutte épaisse avec le méthanol ou avec ses vapeurs, ce qui le fixerait et gênerait la coloration.
- Mettre les lames dos à dos dans la cuve à coloration, en s'assurant que toutes les gouttes épaisses sont du même côté de la cuve.
- Préparer une solution de Giemsa à 3% de la solution mère de Giemsa à 97ml d'eau tamponnée.
- Verser délicatement le colorant dans la cuve jusqu'à recouvrir entièrement les lames. Eviter de verser directement le colorant sur les gouttes épaisses.

- Laisser les lames dans le colorant entre 30 à 45 minutes. C'est l'expérience qui vous permettra d'évaluer le temps exact qui convient à chaque lot de préparation.
- Verser doucement de l'eau propre dans la cuve pour faire remonter la pellicule risée à la surface du colorant . Verser l'eau du côté où se trouvent les frottis pour ne pas abîmer les gouttes épaisses.
- Rejeter délicatement le reste du colorant et rincer de nouveau à l'eau propre pendant quelques secondes. Vider l'eau.
- Enlever les lames une par une et les placer sur l'égouttoir, la face portant les étalements vers le bas. S'assurer que la goutte épaisse ne touche pas le bord de l'égouttoir.

Réactif de Folin-Denis

Préparer en dissolvant 100g de Walfarmate de sodium, 20g d'acide phosphomolybdtique, 50 ml d'acide phosphorique, dans 750 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à reflux pendant 2 heures et après refroidissement, il est complété à 1litre avec de l'eau distillée.

Réactif de Mayer

A :

HgCl ₂ (chlorure mercurique)	1.358 g
H ₂ O	60 ml

B :

KI	5 g
H ₂ O	10 ml

Mélanger A et B, et réajuster à 100 ml avec de l'eau.

TITRE

ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE DES EXTRAITS AQUEUX DE LA TISANE COMPOSEE SAYE (*Cassia alata* Linn ; *Cochlospermum planchonii* Hook ; *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn) CHEZ LA SOURIS NMRI INFESTEE PAR *Plasmodium berghei*.

RESUME

La présente étude s'est proposée de tester *in vivo* l'efficacité antiplasmodique des extraits aqueux du Saye qui est une association de trois plantes (*Cassia alata* Linn, *Cochlospermum planchonii* Hook, *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn), utilisé traditionnellement au Burkina Faso dans le traitement du paludisme. Cette étude a été effectuée sur des souris NMRI infestées par *Plasmodium berghei*.

Le criblage phytochimique effectué sur les trois extraits aqueux (le décocté, l'infusé et le macéré), a mis en évidence des stérols et/ou triterpènes, des tanins galliques ou polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides.

L'étude de la toxicité du décocté a donné une DL₅₀ = 1660,55 mg/kg, ce qui a permis de le classer comme étant faiblement toxique selon l'échelle de Hodge et Sterner.

Sur le plan de l'activité, le décocté aqueux de Saye présente une très bonne activité antiplasmodique. Avec une DE₅₀ = 95,78 mg/kg et un indice thérapeutique égal à 17,3, le décocté aqueux de Saye utilisé en médecine traditionnelle paraît tout à fait digne d'intérêt comme extrait à activité antiplasmodique.

Des études plus poussées mériteraient d'être poursuivies.

Mots clés : Paludisme - Saye - Extraits aqueux - Activité antiplasmodique - Souris – *Plasmodium berghei*.

Adresse de l'auteur : Aïda Tiendrebeogo/Diallo 01 BP 581 Ouagadougou 01

TITLE

IN VIVO STUDY OF ANTIPLASMODIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF THE SAYE COMPOUND (*Cassia alata* Linn ; *Cochlospermum planchonii* Hook ; *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn) IN THE NMRI MICE INFESTED BY *Plasmodium berghei*.

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the antiplasmodial efficiency of aqueous extracts of Saye in mice infested by *Plasmodium berghei*. The Saye is a combination of three plants (*Cassia alata* Linn , *Cochlospermum planchonii* Hook , *Phyllanthus amarus* Schum et Thonn), traditionally used in Burkina faso in the treatment of malaria.

The phytochemical screening from the aqueous forms (decoction, infusion, soaking) revealed the presence of sterols and/or triterpenoids, tannins gallic or polyphenols, flavonoids and saponins.

The DL₅₀ (1660.55 mg/kg) allowed as to classify the extract (decoction) as lowly toxic according to Hodge and Sterner toxicity scale.

The decoction of Saye showed a very good antiplasmodial activity . With a DE₅₀ = 95.78 mg/kg and a therapeutic index of 17.3, the extract used in traditional medicine appears quite interesting and could justify it's utilization as antimalarial herbal medicine.

Further studies should be carried out.

Key words : Malaria - Saye - Aqueous extracts - Antiplasmodial activity - Mice – *Plasmodium berghei*.

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.

THESE DE DOCTORAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 13 mai 2004 par :


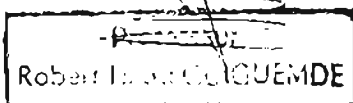
Aïda DIALLO épouse TIENDREBEOGO

TITRE

ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIQUE DES
EXTRAITS AQUEUX DE LA TISANE COMPOSEE *SAYE* (*Cassia*
alata Linn ; *Cochlospermum planchonii* Hook ; *Phyllanthus*
amarus Schum et Thonn) CHEZ LA SOURIS NMRI INFESTEE PAR
Plasmodium berghei

Ouagadougou le 03/06/ 2004

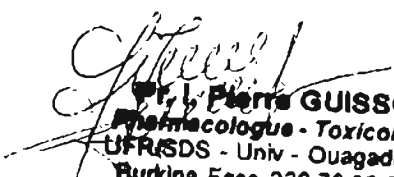
Lu et approuvé

Robert Laurent GUILLEMDE

Le Directeur de thèse

Lu et approuvé


Pr. Pierre GUISSOU
Pharmacologue - Toxicologue
UFR/SDS - Univ - Ouagadougou
Burkina Faso 226.70.20.63.70
Pierre.guissou@univ-ouaga.bf
Le Président du Jury
