

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
SCIENCE DE LA VIE ET DE LA TERRE  
(UFR/SVT)

CENTRE DE RECHERCHE EN SCIENCES  
BIOLOGIQUES, ALIMENTAIRES ET  
NUTRITIONNELLES  
(CRSBAN)



UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE II  
FACULTE DE PHARMACIE  
MARSEILLE, FRANCE

CENTRE NATIONAL DE  
RECHERCHE ET DE  
FORMATION SUR LE  
PALUDISME  
(CNRFP)

# THESE DE DOCTORAT UNIQUE

Présentée par :  
Souleymane SANON, Maître ès Science

Pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

*Option* : BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

*sur le thème :*

**EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE  
ANTIPLASMODIALE DE QUELQUES PLANTES  
UTILISEES EN MEDECINE TRADITIONNELLE  
DANS LE TRAITEMENT DU PALUDISME AU  
BURKINA FASO : Cas de *Pavetta crassipes* K. Schum, de  
*Terminalia macroptera* Guill. et Perr, de *Cassia siamea* Lam et  
d'*Acanthospermum hispidum* DC**

Soutenue le .../.../ 2003

Devant le Jury :

Président : Pr. Comlan de SOUZA, Professeur titulaire, Université de Lomé, Togo

Membres : Pr. Alfred S. TRAORE, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso  
Pr. François TALL, Professeur titulaire, Université de Ouagadougou, Burkina Faso  
Pr. Fulvio ESPOSITO, Professeur titulaire, Université de Camerino, Italie  
Pr. Evelyne OLLIVIER, Professeur, Université d'Aix-Marseille II, France

*Directeur de thèse*: Pr. Alfred S. TRAORE (Burkina Faso)  
*Codirecteurs de thèse*: Pr. Guy Bajansard (France),  
Pr. Fulvio ESPOSITO (Italie)

*Année Académique 2002 -2003*

IL Y A DES ORGANISMES SANS LESQUELS LE TRAVAIL N'AURAIT PAS VU LE JOUR. GRACE A L'ENSEMBLE DE LEURS CONTRIBUTIONS FINANCIERES, LES MOBILITES EN EUROPE, LES TRAVAUX DE LABORATOIRES AINSI QUE LA CONCEPTION DU DOCUMENT ONT PU ETRE REALISES. A TOUS LES RESPONSABLES SCIENTIFIQUES ET ADMINISTRATIFS DE CES ORGANISATIONS ET LEURS PERSONNELS, NOUS DISONS MERCI QU'ILS RECOIVENT LE TEMOIGNAGE DE NOTRE PROFONDE GRATITUDE ET NOS SINCERES RECONNAISSANCES !

IL S'AGIT :



**UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU**  
UFR/SVT, Centre de Recherche en Sciences  
biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles  
(CRSBAN)  
**BURKINA FASO**



**UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE /**  
**AIX MARSEILLE II- Laboratoires de**  
**Pharmacognosie et de Parasitologie**  
**FRANCE**



**AGENCE UNIVERSITAIRE DE LA**  
**FRANCOPHONIE**  
**(AUF) / FRANCE**



**MINISTRE DES AFFAIRES**  
**ETRANGERES / AMBASSADE DE LA**  
**FRANCE (MAE)**



**CENTRE NATIONAL DE RECHERCHE ET**  
**DE FORMATION SUR LE PALUDISME**  
**(CNRFP)**  
**BURKINA FASO**

**DEDICACES**  
**REMERCIEMENTS**

# JE DEDIE CE TRAVAIL

**A ma MERE Mme SANON Téné (in memoriam)**

**A mon PERE Mr. SANON Salla Kalo (in memoriam)**

*Vous avez planté un arbre dont la mort ne vous a pas laissé déguster le fruit. Ce document atteste de l'approbation d'un de vos souhaits les plus chers au monde. J'aurais aimé vous voir, le tenir dans vos mains pour dire qu'il est le vôtre. Il représente pour nous le symbole de votre existence car sans vous il n'aurait pas vu le jour.*

*Votre attitude de bons parents, votre sens strident pour la discipline ainsi que votre amour pour vos enfants, ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui. Nous vous disons encore merci !*

**REPOSEZ EN PAIX**

**A mon oncle Kolo SANOU (in memoriam)**, Tu as été pour moi plus qu'un père qu'un tuteur durant mes études secondaires. Celui qui nous était étranger ne réalisait pas que je n'étais pas ton fils car tu nous considérais tous comme tes enfants.

**reposes en paix**

**A mes frères et sœurs, SANON et TRAORE**, Je sais que mon succès est votre premier souhait. Trouvez ici tout mon attachement fraternel.

**A ma FEMME SANON SANGA Aéta**, ta compréhension, tes encouragements et ton amour ont été d'une grande contribution à la réussite de ce travail. Sois rassurée de mon fidèle amour.

**A mon FILS SANON Sompro Salla Cheick Ahmed**, tu es pour moi ce qui est cher pour un père.

**A tous ceux qui ont souffert et qui souffrent du Paludisme**

# **NOS REMERCIEMENTS VONT**

**A notre maître et juge, Directeur de thèse, Pr. Alfred S. TRAORE**

Professeur titulaire en Biochimie Microbiologie

Chancelier-Président de l'Université de Ouagadougou, Directeur du Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Responsable Pédagogique du Département de Biochimie et Microbiologie à l'UFR/SVT. Nous ne pouvons finir de vous remercier du riche enseignement que vous nous avez prodigué avec clarté et précision. Nous apprécions à juste valeur votre qualité d'homme de science. Vous avez démontré par votre disponibilité que ce travail vous tenait scientifiquement à cœur. Votre simplicité et votre amour pour un travail bien fait font de vous un maître admiré. Nous avons abusé de votre temps, mais vos qualités humaines ont prévalu.

*En témoignage, toutes nos gratitude, notre profond respect et notre attachement.*

**A notre maître et juge, Pr. De Souza COMLAN**

Professeur titulaire en Microbiologie au Togo

Vous nous faites un grand honneur en acceptant d'être membre de cet honorable jury de mémoire malgré vos multiples occupations. Nous apprécions à juste valeur votre qualité d'homme de science. Nous ne saurons vous remercier du riche enseignement que vous nous avez dispensé en microbiologie alimentaire. Votre compétence et votre rigueur dans le travail, vos grandes connaissances scientifiques et votre disponibilité malgré vos lourdes tâches sont les motifs de notre admiration pour vous. *Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements*

**A notre maître et juge, Pr. Evelyne OLLIVIER**

Professeur en Pharmacognosie-Homéopathie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de la Méditerranée à Marseille (France).

Vos conseils, votre rigueur pour un travail bien fait, vos soutiens moraux ont été remarquables dans l'élaboration de ce travail du début jusqu'à la fin. Votre disponibilité malgré vos multiples occupations, à suivre minutieusement l'élaboration de ce travail du début jusqu'à la fin. Nous avons eu la chance et le privilège de bénéficier de votre riche enseignement. Nous avons été profondément marqués par votre modestie, vos connaissances scientifiques immenses, votre disponibilité pour les étudiants et vos qualités humaines. *Soyez assurée de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.*

**A notre maître et juge, Pr. TALL François René**

Professeur titulaire médecine à l'Université de Ouagadougou,

Pédiatre de formation.

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos temps si précieux. Votre sens élevé des relations humaines, votre contribution sans merci dans votre carrière professionnelle ont forcé notre admiration. Vous restez un modèle à suivre. *Trouvez ici cher maître, le témoignage de notre sincère reconnaissance, de notre admiration et de notre respectueuse considération.*

**A notre maître et juge, codirecteur de thèse, Pr. Fulvio ESPOSITO**

Professeur titulaire de la chaire de Parasitologie à Camerino

Chargé de cours à l'Université de Camerino (Italie)

Expert dans le cadre du programme de l'assistance technique de la coopération italienne au CNRFP (Burkina Faso).

Nous ne saurons vous remercier car il nous manque des termes plus recherchés pour exprimer votre amour du travail bien fait, votre expérience dans le raisonnement logique scientifique. A vos côtés, nous nous sommes sentis utiles et soutenus. *Acceptez, à travers ce travail, notre profonde gratitude.*

# SOMMAIRE

Résumé.....	1
INTRODUCTION.....	3
<b>Chapitre I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>1. GENERALITES SUR LE PALUDISME.....</b>	<b>6</b>
1.1 Historique du paludisme.....	6
1.2 Biologie du paludisme.....	7
1.3 Prévalence et épidémiologie.....	10
1.4 Lutte antiplasmodiale.....	11
1.4.1 Les antipaludiques.....	12
1.4.1.1 Les antipaludiques naturels.....	13
1.4.1.2 Les antipaludiques de synthèse.....	14
□ Les dérivés de la quinine.....	14
• Les amino-4-quinoléines.....	14
• Les amino-8-quinoléines.....	15
• Les aryl-amino-alcools.....	15
• Les antifoliques et antifoliniques.....	16
□ Les dérivés de l'artémisinine.....	17
1.4.2 Résistance des parasites aux antipaludiques.....	17
1.4.3 Mécanismes de résistance aux antipaludiques.....	18
1.4.4 Répartition géographique de la résistance de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	19
1.5 Lutte anti-vectorielle.....	21
<b>2. PALUDISME, MEDECINE ET PHARMACOPEE TRADITIONNELLES EN AFRIQUE.....</b>	<b>23</b>
2.1 Généralités.....	23
2.2 Recherche phytochimique et pharmacologique de quelques plantes africaines.....	29
2.3 Structures de quelques molécules isolées.....	33
<b>3. PALUDISME, MEDECINE ET PHARMACOPEE TRADITIONNELLES AU BURKINA.....</b>	<b>37</b>
3.1 Présentation du Burkina.....	37
3.2 Prévalence et épidémiologie.....	40
3.2.1 Incidence du paludisme.....	40
3.2.2 Parasites et vecteurs.....	40
3.2.3 Chimiorésistance.....	41
3.3 Médecine et pharmacopée traditionnelles.....	41

## Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

### 1. ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

<b>1.1 Recensement des plantes.....</b>	<b>44</b>
1.1.1 Premier recensement .....	44
1.1.2 Deuxième recensement.....	44
1.1.2.1 Zone d'enquête.....	44
1.1.2.2 Démarche ethnobotanique.....	45
<b>1.2 Présentation des sept plantes à usage fréquent selon le recensement.....</b>	<b>48</b>
1.2.1 <i>Pavetta crassipes</i> .....	48
1.2.2 <i>Terminalia macroptera</i> .....	49
1.2.3 <i>Cassia siamea</i> .....	52
1.2.4 <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	53
1.2.5 <i>Crossopteryx febrifuga</i> .....	55
1.2.6 <i>Fadogia agrestis</i> .....	57
1.2.7 <i>Ficus sycomorus</i> .....	58
<b>1.3. Récolte du matériel végétal.....</b>	<b>60</b>

### 2. ESSAIS PRELIMINAIRES

2.1 Extractions et analyses chromatographiques.....	63
2.1.1 Extractions.....	63
2.1.2 Analyses chromatographiques.....	65
2.2 Tests antiparasitaires.....	66

### 3. ETUDES PHYTOCHIMIQUES

<b>3.1 Extractions.....</b>	<b>68</b>
3.1.1 Extraction des alcaloïdes totaux.....	68
3.1.2 Extraction des composés terpéniques.....	68
<b>3.2. Etude analytique.....</b>	<b>68</b>
<b>3.3 Isolement des molécules.....</b>	<b>70</b>
3.3.1 Chromatographie liquide préparative basse pression.....	70
3.3.2 Chromatographie préparative sur cartouche Sep pak.....	71
3.3.3 Chromatographie préparative sur colonne ouverte.....	71
<b>3.4 Elucidation structurale.....</b>	<b>72</b>
3.4.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	72
3.4.1.1 RMN mono-dimensionnelle.....	72
3.4.1.2 RMN bi-dimensionnelle.....	74

3.4.2 Spectrométrie de Masse (SM).....	76
<b>4. ETUDES PHARMACOLOGIQUES</b>	
<b>4.1 Evaluation de l'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>.....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Matériel biologique.....	78
4.1.1.1 Souches de parasites.....	78
4.1.1.1.1 Technique de culture selon Trager et Jensen.....	78
4.1.1.1.2 Condition de culture.....	79
4.1.1.2 Synchronisation des parasites.....	80
4.1.1.3 Conservation des parasites.....	80
4.1.2 Techniques de mesure de l'inhibition de la croissance des parasites.....	80
4.1.2.1 Mesure de l'inhibition de la maturation.....	81
4.1.2.2 Mesure de l'inhibition de la prolifération.....	81
<b>4.2 Tests antiparasitaires sur les souches de laboratoire.....</b>	<b>81</b>
4.2.1 Les souches de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	81
4.2.2 Culture continue de <i>P. falciparum</i> .....	81
4.2.2.1 Préparation du sérum.....	82
4.2.2.2 Préparation du milieu de culture RPS10.....	82
4.2.2.3 Préparation du sang non parasité (SNP).....	82
4.2.2.4 Préparation du sang parasité (SP).....	83
4.2.3 Evaluation de l'activité antiplasmodiale des produits végétaux.....	83
4.2.3.1 Préparation des produits végétaux.....	83
4.2.3.2 Culture des parasites.....	83
4.2.3.3 Lecture de la parasitémie.....	85
4.2.3.4 Expression des résultats.....	85
<b>4.3 Tests antiparasitaires sur les souches sauvages.....</b>	<b>86</b>
4.3.1 Préparation des produits végétaux.....	86
4.3.2 Souches de parasites.....	86
4.3.3 Culture des parasites.....	87
4.3.4 Evaluation de la parasitémie.....	87
4.3.5 Expression des résultats.....	88
<b>Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	
<b>1. Enquête ethnobotanique et choix des plantes pour l'étude.....</b>	<b>89</b>
<b>2. Etude phytochimique.....</b>	<b>92</b>
2.1 Extraits bruts.....	92

2.2 Extraits totaux et substances isolées.....	93
2.2.1 Extractions et purifications.....	93
2.2.1.1 Etude phytochimique de <i>Pavetta crassipes</i> .....	93
2.2.1.1.1 Composés alcaloïdiques.....	93
2.2.1.1.2 Composés terpéniques.....	96
2.2.1.2 Etude phytochimique de <i>Cassia siamea</i> .....	99
2.2.1.2.1 Extraction des alcaloïdes totaux.....	100
2.2.1.2.2 Etude analytique.....	100
2.2.1.2.3 Purification.....	100
2.2.1.3 Etude phytochimique de <i>Terminalia macroptera</i> .....	102
2.2.1.3.1 Extraction des composés terpéniques.....	103
2.2.1.3.1 Etude analytique.....	103
2.2.1.3.1 Purification.....	103
2.2.1.4 Etude phytochimique d' <i>Acanthospermum hispidum</i> .....	107
2.2.1.4.1 Extraction des alcaloïdes totaux.....	107
2.2.1.4.1 Etude analytique.....	108
2.2.1.4.1 Purification.....	108
2.2.2 Elucidation structurale.....	109
2.2.2.1 Les alcaloïdes de <i>P. crassipes</i> .....	109
2.2.2.1.1 Elaeocarpidine.....	109
2.2.2.1.2 Hydroxyélaeocarpidine.....	112
2.2.2.2 Les composés terpéniques de <i>P. crassipes</i> .....	115
2.2.2.2.1 Acanthospermol- $\beta$ -Galactosidopyranoside.....	115
2.2.2.2.2 Rutine.....	120
2.2.2.3 Produit isolé de <i>C. siamea</i> .....	123
2.2.2.4 Produits isolés de <i>T. macroptera</i> .....	125
2.2.2.4.1 Arjungénine (TmE2).....	125
2.2.2.4.2 Acide séricique (TmF2).....	127
2.2.2.4.3 Séricoside (TmE1).....	130
<b>3. Tests biologiques.....</b>	<b>133</b>
<b>3.1 Extraits bruts.....</b>	<b>133</b>
<b>3.2 Extraits totaux et substances isolées.....</b>	<b>134</b>
3.2.1 Tests parasitologiques sur les souches de référence.....	134
3.2.1.1 Tests antiparasitaires avec les extraits de <i>P. crassipes</i> .....	134

3.2.1.2 Tests antiparasitaires avec les extraits de <i>T. macroptera</i> .....	137
3.2.1.3 Tests antiparasitaires avec les extraits de <i>C. siamea</i> .....	140
3.2.1.4 Tests antiparasitaires avec les extraits d' <i>A. hispidum</i> .....	142
3.2.2 Tests parasitologiques sur les isolats.....	143
<b>3.3 Discussion des résultats parasitologiques.....</b>	<b>150</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>155</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>158</b>
<b>ANNEXES</b>	

## Résumé

Le paludisme est une maladie parasitaire qui sévit dans tous les continents, mais la majorité des cas et décès (80%) imputables à cette maladie, est observée en Afrique. Depuis plusieurs décennies, on note une lutte acharnée basée sur la tentative de destruction des parasites par la mise au point de médicaments antipaludéens. Malheureusement, les moyens de lutte basés sur le traitement des malades sont moins efficaces qu'attendu, du fait de la résistance des parasites à ces antipaludéens. Selon l'OMS, cette maladie reste l'un des problèmes majeurs de santé publique surtout dans les pays en voie de développement où 80% de la population utilisent la médecine traditionnelle pour résoudre ses problèmes de santé primaire. De nos jours, en particulier dans les pays en développement, les chercheurs s'intéressent aux espèces de plantes médicinales locales (sauvages et cultivées) et autres pratiques traditionnelles afin d'identifier des alternatives viables à la médecine moderne. Dans notre étude, nous avons évalué l'activité antipaludique de certaines plantes utilisées dans la pharmacopée locale du Burkina Faso. Ainsi, nous avons obtenu des recettes à base de plantes à partir d'une enquête ethnobotanique auprès des tradithérapeutes, des phytothérapeutes et des herboristes. Sur 138 espèces de plantes citées, sept ont fait l'objet d'études préliminaires phytochimiques et pharmacologiques. A l'issue de ces études, *Pavetta crassipes* K. Schum. (Rubiaceae), *Terminalia macroptera* Guill. et Perr. (Combretaceae), *Cassia siamea* Lam (Caesalpiniaceae) et *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) ont été retenues comme étant les plantes qui possèdent les principes actifs antiplasmodiaux les plus intéressants ( $1\mu\text{g/ml} < \text{CI}_{50} < 10\mu\text{g/ml}$ ). Une étude phytochimique approfondie a été réalisée sur les quatre plantes. Dix produits purs ont été isolés. Il s'agit de l'élaeocarpidine, l'hydroxyélaeocarpidine, la  $\beta$ -acanthospermol, la rutine isolées de *P. crassipes*, de deux arjungénines, l'acide séricique, l'arjunglucoside, la Séricoside isolés de *T. macroptera* et du barakol isolé de *C. siamea*. Les extraits et les produits purs ont été testés sur les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante W2 et chloroquino-sensible 3D7. Tous les extraits testés sur les souches chloroquino-sensibles ont donné un effet inhibiteur de leur croissance. Les alcaloïdes totaux obtenus de *P. crassipes*, *A. hispidum* et *C. siamea* ont donné des  $\text{CI}_{50}$  respectivement de  $1,23\mu\text{g/ml}$ , de  $5,02\mu\text{g/ml}$  et de  $21,54\mu\text{g/ml}$  sur la souche W2. Les produits purs isolés des quatre plantes présentent un bon pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites exprimé par des  $\text{CI}_{50}$  allant de  $2,51\mu\text{g/ml}$  à  $39,45\mu\text{g/ml}$ . Des tests antiparasitaires sur les souches plasmodiales

sauvages ont été réalisés avec des alcaloïdes totaux de *P. crassipes* et d'*A. hispidum*, des produits purs comme Elaeocarpidine, Barakol et la chloroquine. Les résultats obtenus sur six isolats ont montré une excellente activité antiplasmodiale avec une  $CI_{50}$  variant de 34ng/ml à 1410ng/ml. Cette étude a permis de confirmer l'usage traditionnel de ces plantes par leur activité antiplasmodiale révélée. Elle a montré également que les essais antiparasitaires sur les souches sauvages montrent une sensibilité aux antimalariques 10 fois supérieure à celle des souches de référence.

# **INTRODUCTION**

Le paludisme ou « malaria » est l'une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde. Il reste l'endémie mondiale la plus dévastatrice des maladies tropicales (OMS, 1996 ; Nkunya et *al.*, 1996 ; Jonathan et *al.*, 2001). Il menace 40 % de la population, porte atteinte à la santé et au bien-être des familles, compromet la survie des enfants, affaiblit la population active (OMS, 1998). Considéré comme l'un des problèmes majeurs de santé publique, il provoque 300 à 500 millions de cas (Ahmed et *al.*, 1991 ; Bouchard et *al.*, 1998 ; Danis et *al.*, 1998 ; Molyneux et *al.*, 1991 ; Greenwood et *al.*, 1987), il cause 2 à 3 millions de décès chaque année dans le monde (Carola et *al.*, 2000 ; OMS, 1991, 1997 ; Kuria et *al.*, 2001, Ajaiyeoba et *al.*, 1991).

Le paludisme est une maladie parasitaire dont les signes annonciateurs, quel que soit le type de parasite contracté, sont assez similaires : forte fièvre, maux de tête, douleurs musculaires et parfois vomissements et diarrhées. Son évolution ultérieure dépend de chacune des quatre espèces de *Plasmodium* : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. La forme la plus dangereuse, malheureusement responsable de la quasi-totalité des cas dans le monde particulièrement en Afrique, est celle provoquée par *Plasmodium falciparum*. Cette forme non traitée peut évoluer en accès pernicieux : troubles neurologiques graves allant jusqu'au coma, insuffisance rénale aiguë pouvant entraîner la mort.

La complexité du traitement est due au cycle de développement du parasite. Il possède deux hôtes: l'Homme et le moustique. Ce dernier est un insecte de l'ordre des Diptères, de la famille des *Anopheles* dont les principaux vecteurs en Afrique sont les espèces *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* (Sanon, 1998 ; Mouchet et *al.*, 1991).

Depuis la fin du 19<sup>e</sup> siècle, avec la découverte du parasite et du vecteur respectivement par Laveran en 1880, Ross en 1897 et Grassi en 1898, des progrès ont été réalisés dans le domaine de la lutte contre le paludisme (Mouchet et *al.*, 1991). C'est ainsi que la synthèse du DDT dans les années 40 et la mise au point de la chloroquine entre 1930 et 1940 ont amené les chercheurs à croire à une éradication possible du paludisme. Cependant, malgré les efforts entrepris dans ce sens le paludisme persiste.

Il y a quelques années, le chercheur colombien Pattaroyo avait donné espoir en annonçant la mise au point d'un vaccin synthétique, polymère de plusieurs peptides (Pattaroyo et *al.*, 1987). Cette recherche n'a pour l'instant pas abouti. Beaucoup d'études basées sur la stimulation de la réponse immunitaire ont été réalisées (Gomez-saladin et *al.*, 1999 ; Babiker et *al.*, 2001 ; Adagu et *al.*, 1999). Cependant, malgré tous ces efforts il demeure une pénurie de médicaments efficaces contre le paludisme, particulièrement ceux avec une large marge de sécurité ou sans effets indésirables.

Malgré les énormes progrès de la médecine moderne, le paludisme demeure une maladie préoccupante surtout avec le phénomène de résistance des parasites aux antipaludiques (Basco et al., 1999 ; Sharma et al., 1999 ; Henrik et al., 2001 ; Guiguemdé et al., 1994 ; Del Nero et al., 1993, Le Bras et al., 1993). Cela a laissé présager un accroissement de la gravité de la maladie et une augmentation de la mortalité (Ndifor et al., 1992 ; Saidu et al., 2000). L'inquiétude a pris de l'ampleur avec le développement des formes de multi-résistance des parasites (Basco et al., 1994 ; Kremsner et al., 1994 ; Brockman et al., 2000 ; Coupuong et al., 1998 ; Ter Huile et al., 1993 ; Chaiyaroj et al., 1999). Ces formes de résistance surviennent avec une fréquence croissante et, sont à la base de la nécessité de développer de nouveaux agents antipaludiques (Geoffrey et al., 1996 ; Benoit et al., 1995 ; Ridley et al., 1998 ; Fansworth et al., 1994).

Ce problème de résistance a déclenché un regain d'intérêt pour les médicaments traditionnels potentiels, pour la standardisation de l'usage du médicament traditionnel et pour la recherche nouvelles substances naturelles, efficaces et peu onéreuse (Onayade et al., 1990). De grands efforts pourraient être faits pour assimiler les connaissances qui existent en matière de plantes médicinales et de leur usage (Kirby et al., 1997, Rasoanaivo et al., 1999). Près de 20 000 espèces végétales sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde (Kirby et al., 1996). Il est possible qu'une étude systématique des remèdes traditionnels à base de plantes, puisse permettre de trouver un médicament efficace et sûr, disponible et accessible financièrement.

Par le passé, les plantes ont fourni plusieurs substances pharmacologiques. Récemment, des progrès en Chimie analytique ont présenté l'évidence que des complexes moléculaires élaborés par des organismes naturels pourraient être synthétisés par des processus chimiques. Parmi ces substances naturelles isolées des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle, celles qui ont une action antiplasmodiale *in vitro*, constituent une source potentielle de nouveaux médicaments antipaludiques (Gasquet et al., 1993; Wright et al., 1990). Cela a été le cas par exemple de la quinine et de l'artémisinine, deux antipaludiques isolés de plantes médicinales. Ces résultats mettent en évidence le potentiel considérable des plantes (Phillipson et al., 1994 ; White et al., 1994 ; Kirby et al., 1996).

Face au manque de médicaments, le paludisme a longtemps fait figure de "maladie orpheline", avec un cruel et persistant besoin de nouveaux médicaments antipaludiques qui soient efficaces contre les souches de parasite résistantes. En effet, cette résistance quasi générale des parasites aux composés actuels, et surtout leur poly-résistance à des composés qui appartiennent à des familles chimiques différentes, constitue le problème le plus dramatique et qui impose des solutions d'urgence, tant la diffusion de ces résistances à travers le monde est rapide et semble irréversible.

Toutefois, plusieurs initiatives témoignent d'un regain d'intérêt en faveur des recherches thérapeutiques dans ce domaine telles la stratégie actuelle de lutte contre le paludisme préconisée par l'OMS en 1993 et l'action multilatérale mondiale, suite à la « Conférence Internationale sur le paludisme en Afrique » à Dakar en janvier 1997. C'est dans ce cadre que nous avons choisi d'évaluer l'efficacité *in vitro* de quelques plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle locale au Burkina Faso. Notre étude a été fondée sur les objectifs suivants :

□ **Objectif général**

Mettre en évidence l'activité antiplasmodiale des plantes utilisées dans la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles dans les soins des affections palustres au Burkina Faso.

□ **Objectifs spécifiques**

- recenser et identifier les recettes traditionnelles à base de plantes à travers une enquête ethnobotanique à réaliser auprès de tradithérapeutes, d'herboristes et de phytothérapeutes.
- réaliser une étude phytochimique sur les plantes sélectionnées en utilisant des méthodes d'extraction, de fractionnement, de purification, de caractérisation, d'identification et d'élucidation structurale.
- réaliser une étude pharmacologique permettant d'évaluer l'activité antiplasmodiale d'extraits et de molécules isolées en utilisant des souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante et chloroquino-sensible maintenues en culture continue au laboratoire
- réaliser une étude pharmacologique permettant d'évaluer l'activité antiplasmodiale d'extraits et de molécules isolées en utilisant les souches sauvages de *Plasmodium falciparum* prélevées sur des enfants.
- Comparer la sensibilité des souches sauvages et des souches de référence aux effets des extraits et des molécules isolées.

# **Chapitre I**

## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

# 1. GENERALITES SUR LE PALUDISME

## 1.1 Historique du paludisme

En Egypte, 1600 avant J.C., sont décrits sur des papyrus l'association frissons-fièvre et splénomégalie, ainsi que les mesures à prendre pour éviter l'entrée dans les maisons de « vapeurs provoquant des fièvres ». Au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C., Hippocrate a réalisé ses premières descriptions cliniques des fièvres palustres avant la triade classique « frissons-sueur-fièvre ». Il a fallu attendre au II<sup>ème</sup> avant J.C., pour que les Grecs et les Romains révèlent une corrélation étiologique entre les fièvres intermittentes et la proximité de marécages. Le terme italien de « mal aria » traduit bien la liaison faite par les italiens entre les fièvres et les miasmes véhiculés dans l'air. C'est en 1630 que les fièvres intermittentes dites « fièvre des marécages » ont été distinguées. La même année, l'information sur les vertus de l'écorce de quinquina sur les fièvres, a été donnée par Don Francisco Lopez des indiens du Pérou. En 1717, Lancisi suggère que le paludisme est dû à un poison des marais transmis par les moustiques qui inoculent « les mauvaises humeurs dans le sang ». Pelletier et Caventou, isolent un alcaloïde actif (la quinine), contre la fièvre des marécages en 1820. Cet alcaloïde sera utilisé par Maillot en 1830 au cours de la campagne d'Algérie. Avec les progrès de la science, Laveran découvre en 1880 à Constantine l'agent pathogène. La même année l'identification de l'agent pathogène en trois espèces de parasites (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*) a été mis en évidence par Marchiafava, Celli et Golgi. De 1895 à 1897, Ross a soupçonné la transmission de l'affection par le moustique du genre *Anopheles*. Son travail a été confirmé par Grassi en 1898. Il a fallu attendre l'année 1922 pour que Stephens isole une quatrième espèce plasmodiale, *Plasmodium ovale*. Les formes érythrocytaires tissulaires du parasite dans le foie ont été mises en évidence en 1948 par Shortt et Garnham. C'est avant la seconde guerre mondiale, que les premiers progrès thérapeutiques ont vu le jour avec la mise au point du premier antipaludique de synthèse, la chloroquine. En 1942, les américains privés de quinquina lors de la guerre du pacifique, ont activé la recherche sous une autre forme. C'est ainsi que les insecticides à effet rémanent contre les vecteurs ont vu le jour. Le DDT était le produit utilisé pour la pulvérisation. En 1957, son utilisation a été entreprise à l'échelle mondiale par l'OMS. Avec la résistance confirmée des insectes au DDT, d'autres insecticides ont été mis au point. En 1961, ce fut un échec total dans l'éradication de l'infection avec la découverte

des souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines qui sont des antipaludiques de synthèse. En 1968, un autre programme de lutte visant à réduire la morbidité et la mortalité a été lancé. Depuis lors jusqu'à nos jours, des efforts scientifiques sont déployés dans le cadre de la lutte antivectorielle, de la mise au point d'un vaccin, et la recherche de nouveaux antipaludiques (Wernsdorfer et al., 1991 ; Longworth et al., 1995).

## 1.2 Biologie du parasite (figure 1)

Par sa salive, le moustique injecte le parasite à l'homme sain lors d'un repas sanguin. Le parasite a une forme sporozoïte. Il circule dans le sang pour pénétrer dans le foie 1 heure après. C'est une petite cellule effilée qui pénètre dans l'hépatocyte par endocytose où elle va effectuer le cycle de développement exoérythrocytaire. Dans le foie le sporozoïte se multiplie par division cellulaire pendant 10 à 15 jours. Il s'arrondit, se transformant en un élément de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre, uninucléé, le trophozoïte. Ce dernier se divise, formant en une à trois semaines un schizonte mature, volumineuse cellule plasmodiale de 40 à 100  $\mu\text{m}$ , contenant quelques milliers de noyaux et déformant ainsi les hépatocytes de l'hôte. Le cloisonnement du schizonte en de nombreuses cellules se produit donnant ainsi naissance à des schizozoïtes qui pourront soit infecter d'autres cellules hépatiques, soit pénétrer dans les hématies et entrer dans le cycle de schizogonie érythrocytaire. Lors de cette phase du cycle, le schizozoïte se fixe sur des récepteurs membranaires d'une hématie dans laquelle il pénètre et devient un trophozoïte en forme de faucille. Celui-ci se transforme en schizonte qui redonnera de nouveaux schizozoïtes appelées schizozoïtes secondaires ou mérozoïtes. Cette phase va aussi permettre au parasite de survivre longtemps dans l'organisme, alors qu'il aura disparu du sang. C'est ce qui explique les rechutes à longue échéance pour deux *Plasmodium* : *vivax* et *malariae*.

Ces mérozoïtes circulent dans le sang et vont infecter les globules rouges. Ils se nourrissent de l'hémoglobine et se multiplient. Puis ils se libèrent en faisant éclater les hématies. Ce sont ces éclatements brutaux et synchrones qui sont à l'origine des accès de fièvre. Le temps qui s'est écoulé entre la pénétration d'un parasite dans un globule rouge et l'éclatement de celui-ci lors de la sortie des parasites est de 72 heures pour *Plasmodium vivax* et *P. falciparum* et de 96 heures pour *P. malariae*. La destruction de ces cellules provoque une anémie et dans le cas du paludisme cérébral, la mort intervient à la suite d'une obstruction des vaisseaux sanguins du cerveau par les globules rouges

infectés. Les mérozoïtes libérés vont parasiter d'autres globules rouges et le cycle asexué continu.

Après quelques cycles asexués apparaissent des parasites de forme spéciale, les gamétocytes qui restent dans le sang périphérique, ce sont des formes sexuées produites par le *Plasmodium*. Les parasites lors de cette phase n'ont aucune chance de survie chez l'Homme. Ils restent jusqu'à 20 jours puis disparaissent. Ils ne pourront poursuivre leur évolution que chez le moustique.

A ce moment si un anophèle pique une personne malade, elle absorbe des gamétocytes contenus dans le sang. Les parasites vont subir un choc thermique en passant de 37° à 20°C mais se transforment en quelques minutes en gamètes mâles et femelles. Ces gamètes se conjuguent pour donner un zygote diploïde mobile : C'est la phase de reproduction sexuée du parasite. Dans le tube digestif de l'insecte, celui-ci migre et s'implante entre l'épithélium du tube digestif et les muscles où il devient un ookynète. Cet ookynète traverse la paroi de l'estomac de l'insecte, se divise en subissant la réduction chromatique (méiose) et forme l'oocyste. Celui-ci se divise en plusieurs centaines de cellules et forme des sporoblastes plurinucléés qui vont s'organiser en cellules uninucléées qui sont les sporozoïtes. Les sporozoïtes migrent dans les glandes salivaires jusqu'à un nouveau repas sanguin.

Lorsque le moustique ira piquer une personne pour prendre un repas de sang, les sporozoïtes seront introduits dans cette personne avec la salive qu'il utilise comme anticoagulant et le cycle peut continuer.

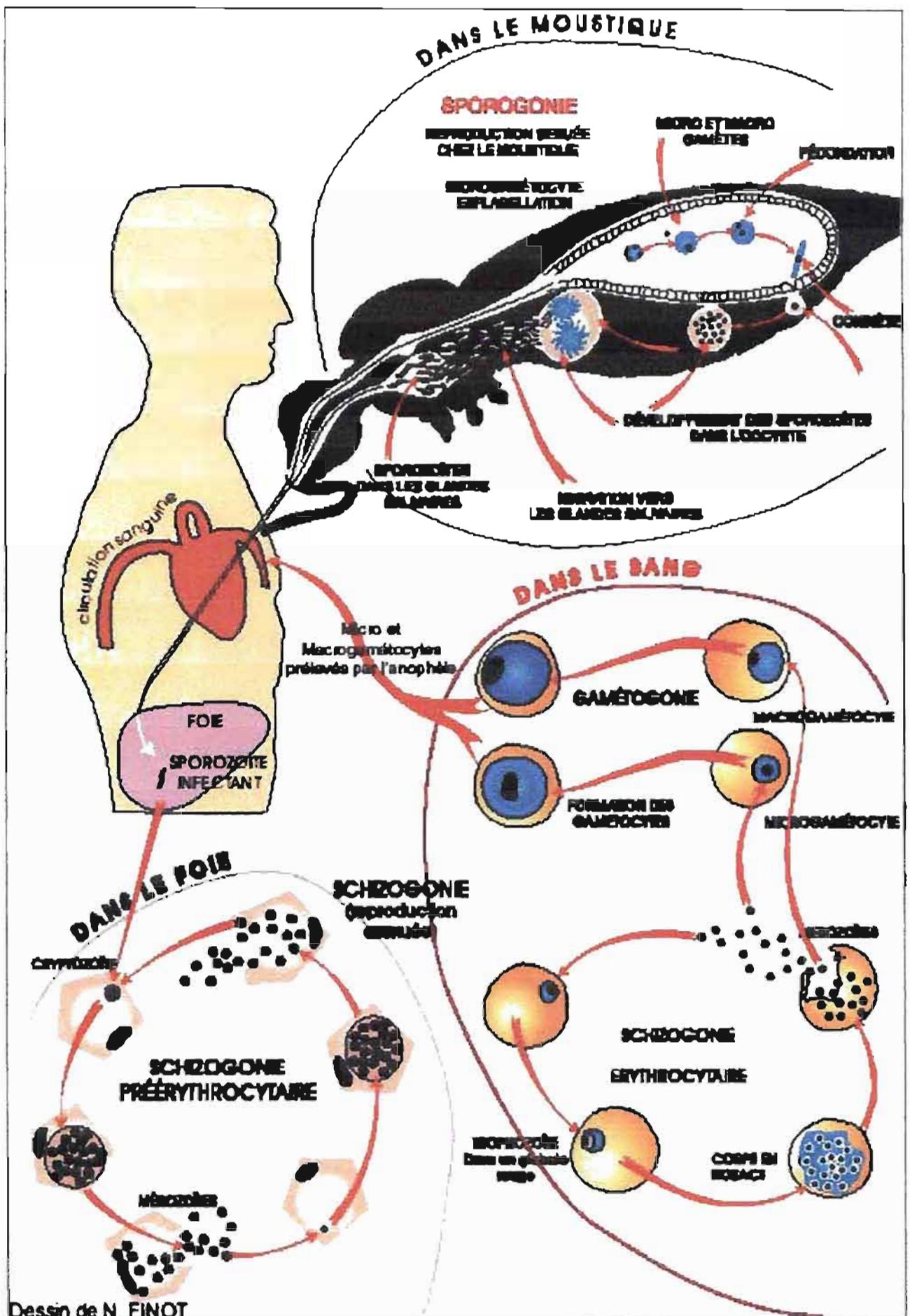


Figure 1 : Cycle biologique du *Plasmodium falciparum*

### **1.3 Prévalence et épidémiologie**

Le paludisme est une maladie parasitaire endémo-épidémique provoquée par des protozoaires du genre *Plasmodium*.

La zone géographique impaludée s'était considérablement rétrécie au cours des 50 dernières années. Mais la lutte contre cette maladie devient de plus en plus difficile et les acquis sont peu à peu érodés. L'aggravation actuelle du risque lié à cette maladie résulte de changement dans l'utilisation des terres, et à des activités telles que la construction de routes, l'exploitation minière, l'exploitation forestière et les projets d'agriculture et d'irrigation, particulièrement dans les zones « vierges » telles que l'Amazonie et l'Asie du sud-est. Ce phénomène s'observe également dans certains pays d'Afrique comme Madagascar avec les rizières (Laventure et al., 1996). D'autres facteurs favorisant cette propagation sont le changement climatique mondial, la dégradation des services sanitaires, les conflits armés et les déplacements massifs de la population. L'apparition des souches multirésistantes du parasite est un facteur d'aggravation. Du fait du développement important du tourisme international, des cas importés de paludisme sont maintenant plus fréquemment enregistrés dans les pays développés. Le paludisme est en train de réapparaître dans les zones où il était précédemment maîtrisé ou même éradiqué comme par exemple en Républiques d'Asie centrale du Tadjikistan et d'Azerbaïdjan ou en Corée (OMS, 1998).

La situation actuelle du paludisme dans le monde se présente comme suit :

- il pose de nos jours un problème de santé publique dans plus de 90 pays représentant au total 2,4 milliards de personnes soit 40 % de la population mondiale ;
- l'incidence mondiale de la maladie est estimée à 300-500 millions de cas cliniques par an ;
- c'est en Afrique subsaharienne que surviennent plus de 90 % de tous les cas de paludisme ;
- la mortalité due au paludisme est évaluée à 1 million de morts par an. La grande majorité de ces décès survient chez les jeunes enfants en Afrique, notamment dans les zones rurales reculées très mal desservies en services de santé. Le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes soit 3000 enfants de moins de cinq ans par jour ;
- le paludisme cause une mortalité très supérieure à celle du SIDA (OMS, 1998) ;
- les groupes à haut risque en plus des enfants sont les femmes enceintes, les voyageurs non immunisés, les réfugiés, les personnes déplacées et les ouvriers agricoles arrivant dans des zones d'endémie ;

- les épidémies de paludisme qui éclatent à la faveur de troubles politiques, de crises économiques et de catastrophes écologiques causent aussi des pertes considérables en termes de mortalité et de souffrance humaine ;

- au total, le paludisme est endémique dans 101 pays et territoires : 45 pays du continent africain, 21 du continent américain, 4 de la région européenne, 14 de la région de la Méditerranée orientale, 8 de la région de l'Asie du sud-est et 9 de la région du Pacifique occidental (OMS, 1998).

#### **1.4 Lutte antiplasmodiale**

Cette lutte est fondée sur la mise au point de médicaments à effet inhibiteur de la croissance des parasites. Ces molécules sont soit d'origine naturelle (quinine, artémisinine), soit des molécules de synthèse (chloroquine, méfloquine, amodiaquine, etc.) (Chandenier *et al.*, 1998).

Il n'existe actuellement qu'un nombre limité d'antipaludéens. Compte tenu de la progression de la résistance aux médicaments dans de nombreuses parties du monde, il devient de plus en plus difficile de traiter efficacement le paludisme. Bien que quelques médicaments nouveaux soient apparus au cours des 20 dernières années (méfloquine, halofantrine, artémisinine et dérivés, co-artémether malarone, atovaquone/proguanil), il existe un besoin de médicaments nouveaux.

Il y a des années déjà, en Afrique, face à la progression de la résistance à la chloroquine et compte tenu des craintes concernant la toxicité et la baisse du niveau d'efficacité de l'association sulfadoxine/pyriméthamine, il était urgent de rechercher une alternative à la chloroquine peu coûteuse, efficace et peu toxique. A cet effet, la possibilité d'utiliser l'amodiaquine comme médicament de première ou de seconde intention dans les zones de résistance à la chloroquine a été étudiée. Des études ont été aussi effectuées sur l'association des antifolates à courte demi-vie, du chloroproguanil et de la dapsonne, et sur la pyronaridine, qui est un composé de synthèse chinois et qui pourrait être mis au point sous la direction de l'OMS/TDR (OMS, 1998).

Les dérivés de l'artémisinine, actuellement, ne présentent pas de façon notable de problème de résistance croisée avec des antipaludéens connus et sont donc importants dans le traitement des cas graves de paludisme dans les zones de multirésistance. Ils nécessitent cependant des traitements de longue durée et un risque de recrudescence subsiste lorsqu'ils sont employés seuls. L'OMS/TDR a exécuté des essais

multicentriques randomisés sur l'artéméther intramusculaire et a travaillé à la mise au point de l'utilisation de l'arté-éther pour les cas sévères ou compliqués de la maladie (OMS,1998).

Des entreprises du secteur privé ont étudié des associations médicamenteuses pour traiter le paludisme multirésistant : il s'agit des associations atovaquone/proguanil, artéméther/benflumétol, artéméther/lumefantrine, artésunate-méfloquine (Looareesuwan *et al.*, 1999 ; Van Vugt *et al.*, 1999, Brockman *et al.*, 2000).

En matière de recherche d'un vaccin antipaludique, des progrès considérables ont été faits. Un vaccin efficace contre cette maladie serait une arme bienvenue dans la lutte contre le paludisme. Plus de douze prototypes de vaccin sont à l'étude. Un éventuel vaccin devra être satisfaisant du point de vue du rapport coût/efficacité; il devra notamment pouvoir être intégré dans des programmes de santé appropriés et offrir une immunité pendant une durée suffisante. Il est difficile actuellement de prédire quand un tel vaccin pourrait faire son apparition. Un programme de cartographie du génome du paludisme a été mis en œuvre par un groupe de partenaires : l'United States National Institute of Health, l'US Department of defense, le Burroughs-Wellcome Fund et le Wellcome Trust. La connaissance du génome devrait permettre d'appliquer des approches plus rationnelles pour la recherche de vaccins et de médicaments nouveaux.

Aussi, a-t-il existé un autre projet visant à interrompre la migration du parasite depuis l'intestin du moustique vers les glandes salivaires, où il devient infectieux pour l'être humain. Cette stratégie de lutte antiparasitaire devrait permettre la réduction considérable de la transmission (OMS, 1998).

#### **1.4.1 Les antipaludiques**

Depuis les découvertes empiriques, il y a plusieurs siècles, de l'activité de l'écorce de quinquina sur les « fièvres de marais » en Amérique du sud, plusieurs centaines de médicaments antipaludiques ont été étudiés. A l'heure actuelle, un faible nombre de ces produits sont disponibles, témoignant de la difficulté d'une recherche peu productive et du génie évolutif des plasmodies qui résistent de plus en plus aux médicaments déjà limités et chers dans les zones endémiques. Dans cette situation de

pénurie, il convient de bien connaître les quelques produits encore utilisables afin de tirer le meilleur profit de leur qualité (Danis *et al.*, 1991). On peut classer les antipaludiques en fonction de leur origine (naturelle ou synthèse)

#### 1.4.1.1 Les antipaludiques naturels :

Bien qu'il y ait eu en 1947 un criblage de plusieurs centaines de plantes supérieures, seules trois classes majeures de produits antiprotozoaires ont pu connaître une utilisation clinique. Il s'agit de la quinine, de l'artémisinine et de l'émétine qui est un amoebicide.

##### □ La quinine :

La quinine est l'un des quatre principaux alcaloïdes extraits du Quinquina. Elle est la première drogue antimalarique isolée de l'écorce de plusieurs espèces de *Cinchona* (Le Bras *et al.*, 1993). C'est un alcaloïde qui comporte un cycle quinoléine et un radical carbinol en position 4. Toute modification de sa formule, diminue son activité antiparasitaire. La connaissance de cette structure chimique a servi de modèle au développement et à la synthèse à partir de 1920 de plusieurs antipaludiques (figure 2).

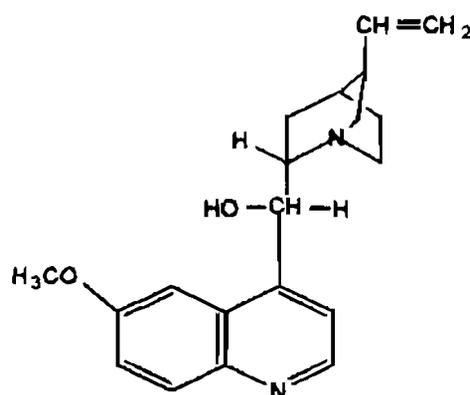


Fig.2: structure de la quinine

##### □ L'artémisinine :

L'apparition de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques a permis l'isolement récent de l'artémisinine, principe actif d'une plante médicinale chinoise, l'*Artemisia annua* (Bryskier *et al.*, 1988). L'artémisinine est une lactone sesquipénique possédant un pont endoperoxyde (Davidson *et al.*, 1991). Les sesquiterpènes lactones

sont des constituants communs à certaines espèces de plantes mais la présence d'un endoperoxyde confère ici une particularité antipaludique à l'artémisinine (figure 3).

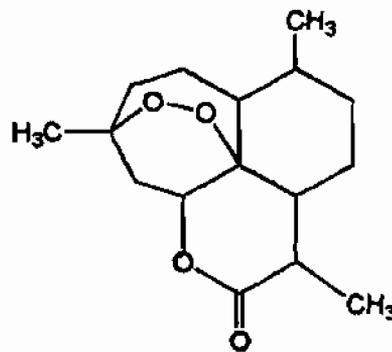


Fig.3 : structure de l'artémisinine

#### 1.4.1.2 Les antipaludiques de synthèse

##### □ Les dérivés de la quinine

La structure chimique de la quinine (Quinine lafran\*Cp ou Quinoforme\*Inj) a servi de modèle moléculaire pour la synthèse de plusieurs analogues chimiques parmi lesquels nous avons :

- **les amino-4-quinoléines** : Ils font partie des premiers antipaludiques de synthèse préparés entre 1938 et 1941. Elles ont en commun un noyau quinoléine, une chaîne latérale aminée en position 4 et un radical chloré en position 7. On utilise actuellement la chloroquine (Nivaquine\*Cp, Inj ou Nivaquine 300\*Cp) (figure 4) et l'amodiaquine (Flavoquine\*Cp) (figure 5). Les propriétés de base faible de la chloroquine lui confèrent une activité antiplasmodiale.

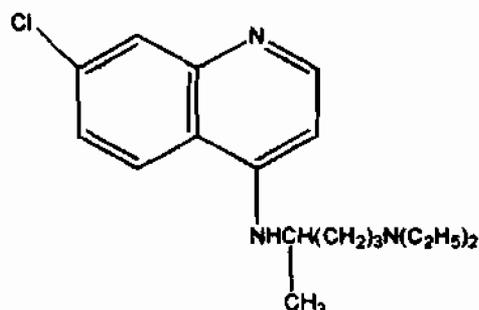


Fig.4 : structure de la chloroquine

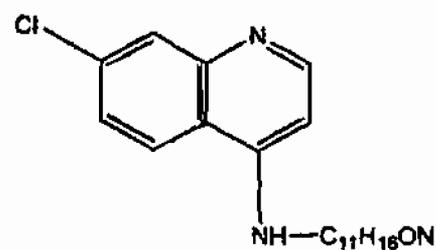


Fig.5 : structure de l'amodiaquine

*Remarque* : il existe une spécialité pharmaceutique associant la chloroquine et le proguanil qui est un inhibiteur de la déshydrofolate réductase. Cette association est destinée à la prévention du paludisme dans les zones où il existe une résistance à la chloroquine seule. Il s'agit de la Savarine (Chloroquine + Proguanil)

- **Les amino-8-quinoléines** : Ce sont des gamétocytocides dont le plus connu est la primaquine® (figure 6). Toutes les amino-8-quinoléines présentent une structure de base identique avec un noyau 6-méthoxyquinoléine et une chaîne aliphatique aminoalkylamine en position 8. L'activité antiplasmodiale serait fonction de la longueur de la chaîne aminoalkylamine et de la nature de l'amine terminale (Magidson et *al.*, 1936 ; 1937). Aussi l'activité est-elle augmentée avec l'adjonction de groupements ramifiés. Ce qui a permis de synthétiser l'isopentaquine (figure 7).

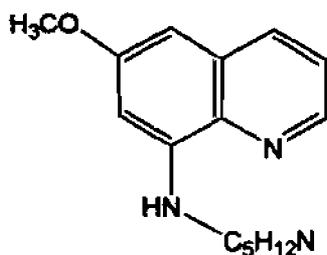


Fig.6 : structure de la primaquine

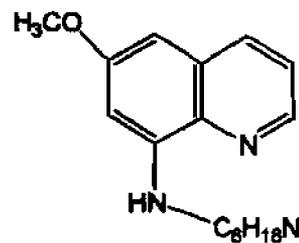


Fig.7 : structure de l'isopentaquine

- **Les aryl-amino-alcools** : Ce sont des schizonticides sanguins identifiés à partir des années 1970. Ils ont en commun un radical méthanol (CHOH). Il s'agit de la méfloquine et de l'halofantrine.

- La méfloquine (Lariam®Cp): elle est une 4-quinoléine méthanol dont la structure présente des similitudes évidentes avec celle de la quinine. La présence en position 2 et 8 des groupements trifluorométhyles serait nécessaire pour l'activité antiplasmodiale (Danis et *al.*, 1991) (figure 8).

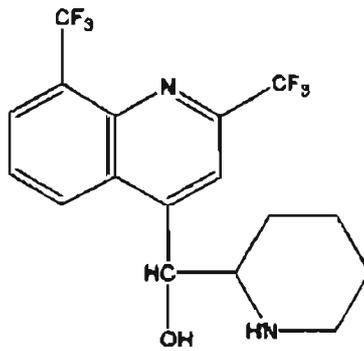


Fig.8 : structure de la méfloquine

- L'halofantrine (Halfan\* Cp) est un dérivé du 9-phénanthrénéméthanol, sous forme chlorhydrate est très liposoluble mais peu hydrosoluble (figure 9).

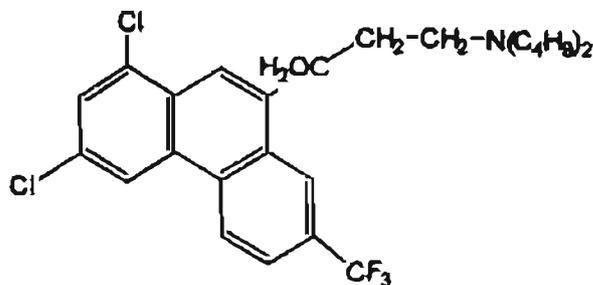


Fig.9: structure de l'halofantrine

- **Les antifoliques et antifoliniques** (Bryskier et *al.*, 1988) : ce groupe d'antipaludiques est connu depuis 1950. Ils agissent en bloquant la synthèse des acides nucléiques de l'hématozoaire.

- les antifoliques : on peut citer les sulfamides et les sulfones qui diffèrent par la nature de l'hétérocycle attaché au groupement sulfamide (figure 10).

- les antifoliniques : ce sont des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (*dhfr*). Ce sont des biguanides et des diaminopyrimidines souvent utilisés en association avec les antifoliques, leur mode d'action étant synergique. La diaminopyrimidine actuellement utilisée est la pyriméthamine qui est un bon inhibiteur de *dhfr* de *Plasmodium berghei* (Finlay et *al.*, 1946) (figure 11).

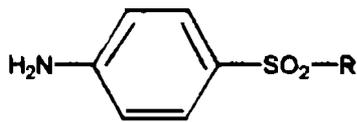


Fig.10 : structure de l'antifolate

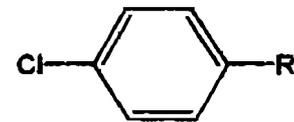


Fig.11 : structure de l'antifolinate

□ **Les dérivés de l'artémisinine** : la réduction du carbonyle lactone et la formation d'un éther donne l'artémether, un composé liposoluble connu sous le nom de Paluther® (Gu et al., 1980) (figure 12).

Un autre dérivé résultant de la réduction d'une lactone et de la formation d'éther et d'ester donne l'artésunate de sodium commercialisé sous le nom de Arsumax® (Sanofi et al., 1997). Ce composé est soluble dans l'eau.

Ces dérivés sont des schizonticides, actifs sur des souches de Plasmodies résistantes aux autres antipaludiques. Ils exercent leur effet grâce à leur pont peroxyde intramoléculaire qui, en présence de fer, donne des radicaux libres qui détruisent le parasite intraérythrocytaire.

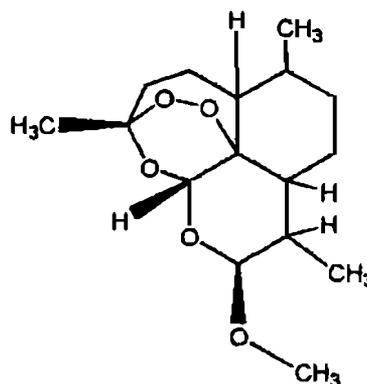


Fig.12 : structure de l'artémether

#### 1.4.2 Résistance des parasites aux médicaments antipaludiques

Le traitement du paludisme s'est compliqué avec l'apparition de résistances du parasite aux médicaments les plus employés (Gérard et al., 2000), en particulier par le développement de la résistance de *Plasmodium falciparum* et l'émergence des souches multirésistantes du parasite (Milhous et al., 1989).

La chimiosensibilité définie comme étant la capacité d'une souche parasitaire à se multiplier malgré la pression médicamenteuse à la dose létale normale, se traduit par deux échecs : l'échec thérapeutique et l'échec prophylactique.

Après un traitement avec une dose d'antimalarique normalement efficace, le patient peut présenter des formes asexuées de *P. falciparum* au septième jour si le sujet vit en zone endémique ou entre la première et la cinquième semaine s'il est à l'abri du risque de ré-infection. Dans ce cas on parle d'échec thérapeutique (Schapira et al., 1990, Longworth et al., 1995). Par contre, l'échec prophylactique se traduit par la mise en évidence de *P. falciparum* chez un patient sans antécédent palustre prenant régulièrement la chloroquine à une dose supérieure ou égale à 5 mg/kg/semaine, du proguanil à la dose supérieure ou égale à 3 mg/kg/jour ou de la méfloquine à une dose supérieure ou égale à 3mg/kg/semaine.

La détection de la résistance des plasmodiums aux antimalariques peut se faire par des tests *in vivo* en contrôlant la température et la parasitémie sur goutte épaisse pendant quatre semaines. Elle peut se faire également *in vitro* sur des souches en culture en contact avec les antimalariques pendant 24 à 48 heures (Le Bras et al., 1998).

#### 1.4.3 Mécanismes de résistance aux antimalariques

❖ **Chloroquine** : la chloroquine connue comme un médicament de référence dans le traitement du paludisme ne peut être active que si elle se concentre dans la vacuole digestive du parasite. Elle inhibe ainsi la digestion de l'hémoglobine et la polymérisation de l'hème en hémozoïne non toxique pour le parasite. Cela s'est observé avec l'**amodiaquine**, la quinine, la **méfloquine** et l'**halofantrine**. La résistance à la chloroquine se traduit par deux mécanismes : le parasite peut ralentir la pénétration de la chloroquine dans la vacuole digestive ou rejeter activement la chloroquine concentrée dans la vacuole digestive par l'activité de la perméase intravésiculaire (Krogstad et al., 1988 ; Bray et al., 1996 ; Wellems et al., 1992).

L'hypothèse de cette résistance selon Wellems (1990), est l'existence d'une liaison de la chloroquine avec une ou plusieurs glycoprotéines de transfert, dont la p-glycoprotéine 170 (Pgp 170). Le mécanisme étant génétique, les gènes associés à la résistance multi-drogues (*PF-mdr*) induisent la formation de canaux dans la membrane

de la vacuole digestive par lesquels la chloroquine est expulsée. Chez *P. falciparum*, deux gènes *mdr* codent pour la Psg 170 et sont nommés *Pfmdr-1* et *Pfmdr-2* (Roninson et al., 1992 ; Ekong et al., 1993). Une Pgp identifiée de *P. falciparum*, *Pgh-1* est codée par le gène *Pfmdr-1* qui siège sur le chromosome 5. D'après Roninson (1992) et Longworth (1995), la participation d'un système *mdr* a été également mise en évidence dans les résistances à la **méfloquine** et à la **quinine** (Wilson et al., 1989, 1993).

Une autre hypothèse des travaux plus récents, est basée sur l'existence d'un gène *cg2* qui code pour une protéine CG2 dans le mécanisme de la résistance à la chloroquine (Su et al., 1997 ; Wellems et al., 1998).

❖ **Antifolates** : le *Plasmodium* ne peut pas utiliser l'acide folique et fait appel à l'acide para-amino benzoïque (PABA). Ce dernier est transformé en acide folinique qui est réduit par la déhydrofolate réductase (*dhfr*) en acide tétrahydrofolique, un cofacteur de plusieurs enzymes dont celles responsables de la synthèse des acides nucléiques (Foote et al., 1994). La biosynthèse des folates par le germe est inhibée par les antimétabolites qui agissent en tant qu'analogues compétitifs des substrats de deux enzymes. Les antifoliques, sulfamides et sulfones, agissent sur la déhydroptéroate synthétase. La résistance correspond à une mutation de l'enzyme qui devient insensible au médicament. La sélection est rapide quand les composés sont utilisés seuls.

❖ **Antifoliniques, pyriméthamine et proguanil** agissent sur la déhydrofolate réductase/thymidilate synthétase (Shapira et al., 1990 ; Plowe et al., 1995). La séquence du gène qui code pour la déhydrofolate de *P. falciparum* est connue. Plusieurs mutations ponctuelles entraînent le remplacement d'un acide aminé et confèrent une résistance à la pyriméthamine, au proguanil ou aux deux par modification de l'enzyme.

#### **1.4.4 Répartition géographique de la résistance de *Plasmodium falciparum* (tableau 1)**

La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a été d'abord observé en 1960 en Amérique latine. Elle apparaît en 1961 dans le Sud-est de l'Asie et s'étend par la suite dans les autres continents (Eykmans et al., 1990 ; Wernsdorfer et al., 1991). La répartition géographique de cette résistance a été établie (OMS, 1993 ; Baudon et al., 1997 ; Bouchaud et al., 1998)

**Tableau I : Répartition géographique de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques**

Groupe	Existence et type de résistance	Pays
I	Pas de chloroquinorésistance rapportée	<p><b>Afrique</b> : Egypte, Maroc, Algérie, Ile Maurice, Cap vert, Libye</p> <p><b>Amérique</b> : Nord de l'Argentine, Belize, Bolivie (Sud), Brésil (Côte Est et Sud), Costa-rica, Guatemala, Haïti, Honduras, Mexique (chiapas), Nicaragua, Paraguay (Est), Pérou (Ouest), République dominicaine, El Salvador, Nord Panama.</p> <p><b>Asie</b> : Azerbaïdjan (Sud), Tadjikistan (Sud), Chine (Nord-Est).</p> <p><b>Moyen-orient</b> : Iran (sauf Sud-est), Iraq, Syrie, Turquie</p>
		<p><b>Afrique</b> : Afrique du Sud, Bénin, Botswana, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée-Bissau, Libéria, Madagascar, Mali, Mauritanie, Namibie, Niger, Sénégal, Sierra Leone, Somalie, Tchad, Togo</p> <p><b>Asie</b> : Afghanistan, Bhoutan, Inde, Indonésie (sauf Irian jaya), Malaisie, Népal, Pakistan, Philippines, Sri Lanka.</p> <p><b>Moyen-orient</b> : Arabie Saoudite (Ouest), Emirats arabes unis, Iran (Sud-Est), Oman, Yémen</p>

---

III	Prévalence élevée de Chloroquinorésistance multirésistance	<p><b>Afrique</b> : Angola, Burundi, Cameroun, Comores, Congo, Djibouti, Erythrée, Ethiopie, Gabon, Guinée équatoriale, Kenya, Malawi, Mayotte, Mozambique, Nigéria, Ouganda, République centrafricaine, Rwanda, Sao tome et Principe, Soudan, Soudan, Swasiland, Tanzanie, République démocratique du Congo, Zambie, Zimbabwe.</p> <p><b>Amérique</b> : Bolivie (Nord), Brésil (Amazonie), et Colombie, Equateur, Guyana, Guyane française (fleuves), Panama (Sud), Pérou (Est), Surinam, Venezuela.</p> <p><b>Asie</b> : Bangladesh, Cambodge, Chine (états du Sud et Hainan), Indonésie, Laos, Myanmar (ex Birmanie), Thaïlande (zones frontalières), Vietnam.</p> <p><b>Océanie</b> : Ile Salomon, Papouasie nouvelle-Guinée, Vanuatu.</p>
-----	--	--

---

### 1.5 Lutte anti-vectorielle

Il s'agit de la prévention du paludisme qui consiste en différentes mesures pouvant protéger contre la transmission. Ces mesures visent le vecteur de la maladie, à savoir le moustique. Celles-ci peuvent être des mesures de protection personnelle (individuelles ou familiales) : vêtements de protection, insectifuges, moustiquaires ou des mesures de protection de la collectivité ou population : utilisation d'insecticides, d'antilarvaires ou gestion environnementale en vue de limiter la transmission.

Mise en œuvre dès 1922, la lutte antilarvaire par des poissons larvivores (*Gambusia affinis* d'origine américaine, *Oreochromis spilurias* en Somalie) et diverses mesures d'aménagement de l'environnement n'ont guère eu de résultats tangibles (Laventure et al., 1996). Cette lutte antilarvaire est peu raisonnable étant donné l'étendue

des gîtes à traiter et la nécessité d'utiliser les poissons dans des mares temporaires, comme celles servant de gîtes à *Anopheles gambiae* en Afrique.

Outre les poissons, la bactérie *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 a été classée comme agent de lutte biologique. Mais ne pouvant pas se reproduire dans les gîtes, elle doit être répandue itérativement comme les insecticides (Mouchet et al., 1980). Toutefois cette lutte antilarvaire pourrait augmenter le risque de transmission en augmentant la longévité des moustiques résiduels (Le Bras et al., 2000).

Des insecticides et des répulsifs ont été mis au point pour lutter contre les vecteurs du paludisme. Ce sont des composés organochlorés comme le DDT et le gamma HCH (lindane) et les composés organo-phosphorés comme le malathion (peu toxique), le fenitrothion pour les traitements intradomiciliaires (Mouchet et al., 1991). C'est à partir de 1950, que des projets pilotes de pulvérisation intradomiciliaire (2g/m<sup>2</sup>) de DDT ont été mis en place. Mais dès 1960, certains anophèles devenaient résistants à cet insecticide.

Les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes constitueraient une bonne solution de remplacement théorique aux traitements intradomiciliaires. Des essais randomisés exécutés en Gambie, au Ghana, au Kenya et au Burkina Faso, par exemple ont montré qu'environ 15 à 30% des décès infantiles pourraient être évités si ceux-ci dormaient sous des moustiquaires régulièrement imprégnées d'insecticides recommandés tels que les pyréthrines que l'on trouve dans les chrysanthèmes (Binka et al., 1966 ; D'Alessandro et al., 1995 ; Habluetzel et al., 1997 ; Nevill et al., 1996). Leur efficacité est estimée à 6-12 mois.

Reste la lutte écologique par assèchement périodique de vastes sites d'irrigation culturale. En Chine, cette technique a été appliquée dans certaines régions. Il s'ensuit une réduction sensible du nombre de moustiques, notamment d'*Anopheles sinensis* et de *Culex tritaeniorhynchus*. La méthode d'irrigation intermittente a amené une forte réduction d'*Anopheles atroparvus* au Portugal (Laventure et al., 1996). Mais, nulle part, il n'a été mesuré l'impact de cette réduction numérique des vecteurs sur l'incidence du paludisme.

En dépit des progrès indéniables réalisés dans ce domaine, on constate encore aujourd'hui l'échec des programmes de lutte antivectorielle et la résistance des vecteurs aux insecticides.

## **2. PALUDISME, MEDECINE ET PHARMACOPEE TRADITIONNELLES EN AFRIQUE**

### **2.1 Généralités**

En Afrique noire, la pratique de la Pharmacopée et de la Médecine Traditionnelle est fort ancienne. Connaître la pharmacopée négro-africaine s'impose aujourd'hui pour plusieurs raisons :

- d'abord, il est impossible d'ignorer plus longtemps la composition des médicaments utilisés tous les jours à travers l'Afrique noire par 80 % des populations (Geoffrey et *al.*, 1996 ; Marsh et *al.*, 1995 ; Phillipson et *al.*, 1994).
- ensuite, parce que sous la poussée irrésistible du progrès scientifique on constate la disparition de nombreuses espèces de plantes médicinales ainsi que les guérisseurs dont le savoir est certes contesté mais beaucoup demandé.
- enfin, parce que la somme d'informations qu'apporte le pragmatisme quotidien de cette Pharmacopée Africaine Traditionnelle est de plus en plus considérée comme point de départ de nouvelles recherches par la biochimie actuelle. Ce n'est pas un hasard si les grandes firmes pharmaceutiques internationales se sont appropriées des espaces entiers de la forêt amazonienne avec la certitude de trouver des molécules nouvelles en étudiant les espèces végétales locales.

La pharmacopée africaine est riche. De nombreux travaux effectués par des spécialistes reconnus ont permis de faire le bilan de nos connaissances sur les plantes médicinales africaines du point de vue ethnobotanique, chimique, toxicologique et pharmacologique. Les diverses recherches expérimentales biochimiques faites dans les Universités corroborent de plus en plus certaines propriétés médicinales empiriquement reconnues de nombreuses de ces plantes.

A la lumière de ces faits, on peut affirmer que les soins effectués avec certaines plantes médicinales locales sont appelées à devenir de précieux traitements d'appoints dans les centres de santé, les centres médicaux, les hôpitaux pour peu que l'on effectue préalablement des études de valorisation et de validation. La Pharmacopée Africaine

Traditionnelle, le plus souvent à base de drogues végétales, prend sa source non seulement dans la diversité des groupements humains, des langues, des coutumes, mais aussi dans la diversité des climats, des sols, de la flore et de la faune. C'est donc une pharmacopée complexe qui doit être étudiée en tenant compte du binôme ethnique et botanique.

La biodiversité forestière de l'Afrique représente 50 000 espèces de plantes supérieures vascularisées connues sur les 250 000 existant dans le monde entier (Phillipson et *al.*, 1999). L'allemand Hans Dieter Neuwinger (2000) bien connu pour son expérience sur les plantes médicinales utilisées en Afrique, dénombre 5 400 espèces à usage pharmaceutique.

En effet, depuis des siècles, l'Homme de l'Afrique se réfère aux thérapeutes traditionnels pour satisfaire ses besoins sanitaires à partir des pharmacopées locales (WHO, 1959). Cependant, les inconvénients majeurs de cette utilisation traditionnelle relèvent du manque de précision dans le diagnostic des affections et la posologie des préparations. Un volet important de cette tradithérapie est l'ignorance totale des variations de la composition chimique des composés actifs que peuvent connaître les échantillons végétaux en fonction des saisons, des temps de la récolte, de la conservation et de la partie désirée (Balansard et *al.*, 1990 ; Makinde et *al.*, 1994) tenant ainsi compte des métabolites secondaires synthétisés par les plantes pour les besoins de protection contre les agressions (Nacoulma, 1996).

Depuis plusieurs années déjà, on assiste à un regain d'intérêt pour la médecine traditionnelle afin de confirmer l'usage traditionnel des plantes et d'autre part pour identifier le principe actif qui pourrait servir à la mise au point des médicaments modernes.

En Afrique où 40 % des états fébriles sont à attribuer au paludisme, ces recherches visent à identifier les plantes qui possèdent une activité antiparasitaire *in vitro* et *in vivo* et d'en extraire le principe actif pour l'isolement de la molécule (Brinkman et *al.*, 1991). Partant de là, nous reportons un certain nombre de recherches antipaludiques effectuées sur les plantes antipaludiques africaines.

A Madagascar, les alcaloïdes totaux extraits de *Hermandia voyronii*, une plante utilisée en médecine traditionnelle, ont montré un effet qui potentialisait celui de la chloroquine sur les souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum in vitro* (Ratsimamanga et al., 1994).

Au Nigéria, *Azadirachta indica* A. Juss a été une des plantes médicinales utilisées pour l'évaluation de ces effets antimalariques. Les feuilles sont utilisées à cet effet en pharmacopée traditionnelle. L'extrait alcoolique de ces feuilles testé sur la souche chloroquino-sensible ITG2F6 de *P. falciparum* avait un bon pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites à 20 µg/ml à partir de 48 heures (Iroka et al., 1993)

Toujours au Nigéria, l'équipe de Makinde a travaillé sur *Morinda lucida* en évaluant *in vivo* l'activité antiparasitaire (*Plasmodium berghei*) des extraits obtenus à partir des feuilles. Les résultats étaient satisfaisants quant à l'inhibition de la croissance des parasites (Makinde et al., 1994).

Dans ce même pays, une étude a porté sur les activités antimalariques *in vivo* de *Quassia amara* L. et *Quassia undulata* Guill and Perr. Les essais ont été réalisés sur des souris infectées par *Plasmodium berghei berghei* en utilisant la méthode suppressive de 4 jours. Les résultats rapportés montrent une large activité inhibitrice des extraits hexaniques des feuilles de *Q. amara* et ceux des écorces de *Q. undulata* avec une parasitémie respectivement de 0,16 % et 3,20 % à 100 mg/Kg. Par contre, les extraits méthanoliques des feuilles ont donné une densité parasitaire de 0,05 % pour *Q. amara* et 1,47 % pour *Q. undulata* à la concentration de 200 mg/Kg (Ajaiyeoba et al., 1999).

Les propriétés antiplasmodiales d'*Erythrina senegalensis* ont été évaluées *in vivo* au nord du Nigéria à partir des extraits aqueux. Le décocté obtenu des écorces de tronc de l'espèce a montré une activité suppressive de 23,2 % à la dose de 100 mg/kg et 16,5 % à la dose de 50 mg/kg (Saidu et al., 2000).

Il y a plus de 10 ans déjà que des études au Mali, ont concerné une association de plantes appelée « Malarial 5 » (*Cassia occidentalis*, *Lippia chevalieri* et *Spilanthes oleracea*). L'extrait aqueux obtenu à partir de cette association a donné une  $CI_{50} > 600$  µg/ml *in vitro*. Des tests *in vivo* ont relevé une disparition de la parasitémie chez les souris infectées par *Plasmodium berghei* (Gasquet et al., 1993).

Trois plantes de la médecine traditionnelle du Mali ont fait l'objet d'une étude ethnopharmacologique en vue de confirmer leur usage traditionnel. Il s'agit de *Glimus oppositifolius* (L.) AUG.D.C., *Nauclea latifolia* SM. et *Mitragyna inermis* (Willd.) O.

Kuntze. Les extraits alcaloïdiques et saponosiques ont été testés sur les souches chloroquino-sensible 3D7 et chloroquino-résistante W2 *in vitro*. Le meilleur pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites a été obtenu pour les alcaloïdes totaux de *Mitragyna inermis* avec des CI<sub>50</sub> comprises entre 4 et 5 µg/ml (Traoré-Keita et al., 2000)

En Tanzanie, quatre plantes avaient été identifiées parmi d'autres comme plantes antipaludiques en médecine traditionnelle. Les extraits bruts de *Cissampelos mucronata*, *Maytemus senegalensis*, *Salacia madagascariensis* et *Zanthoxylum chalybeum* ont provoqué une suppression de la parasitémie respectivement de 59 %, 90 %, 19 % et 4 % à la dose de 500 mg/kg (Gessler et al., 1995).

En 1989 au Togo, Gbeassor et ses collaborateurs ont travaillé sur des plantes connues de la médecine traditionnelle. Les extraits aqueux de ces plantes, *Cassia siamea*, *Dialium guineense*, *Dichapetalum guineense*, *Gomphrena celosioides*, *Jatropha gossypifolia*, *Nauclea latifolia*, *Paullinia pinnata* et *Pavetta crassipes* ont donné des CI<sub>50</sub> comprises entre 7 et 30 µg/ml. Par ailleurs, les extraits de *Cassia siamea*, de *Jatropha gossypifolia* et de *Pavetta crassipes* ont donné une meilleure inhibition de la croissance parasitaire, de l'ordre de 100 % à la concentration de 30µg/ml (Gbeassor et al., 1989).

Au Gabon, *Nauclea diderrichii* est une plante utilisée pour traiter les affections fébriles. En 1996, les alcaloïdes et les saponosides contenus dans les écorces ont été étudiés. La valeur de la CI<sub>50</sub> de 7 µg/ml a été trouvée donnée pour les alcaloïdes et celle de 0,68 µg/ml a été attribuée à l'association des deux groupes chimiques (Lamidi et al., 1996).

Le Burkina Faso, un des pays africains où la médecine traditionnelle est bien développée n'est pas à l'écart de cette étude ethnopharmacologique. En effet, des études ont été effectuées sur le genre *Cochlospermum*. Les extraits aqueux de *C. tinctorium* A. Rich. ont donné respectivement une CI<sub>50</sub> comprise entre 3-7 µg/ml pour les feuilles et entre 1-2µg/ml pour les tubercules. Les huiles essentielles de *C. planchonii* ont donné une CI<sub>50</sub> comprise entre 22 et 35µg/ml (Benoit-Vical et al., 1995, 1999)

En Côte d'Ivoire, les extraits bruts de *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* et *Ancistrocladus barteri*, plantes de la médecine traditionnelle ont présenté des CI<sub>50</sub> allant de 0,017 à 0,648 µg/ml lors des essais réalisés sur les souches de *P. falciparum* chloroquinosensible et chloroquinorésistante (François et al., 1994).

L'effet inhibiteur de l'évolution des parasites trophozoïtes en schizontes a été attribué aux huiles essentielles de *Lippia multiflora*, une plante connue de la médecine traditionnelle de la République de Côte d'Ivoire (Valentin et al., 1995).

Benoit-Vidal et ses collaborateurs ont effectué un « screening » avec *Combretum micranthum* (L), *Lippia multiflora* (Moldenke), *Ximenia americana* (L), *Vernonia colorata* (Drake), *Guiera senegalensis* (J.F. Gmel), *Cinnamomum camphora* (Ness) et *Sambucus nigra*, des plantes d'origine ivoirienne. Les tests sur les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-sensible F-32 tanzanienne et chloroquino-résistante FcB1 colombienne ont donné des  $CI_{50}$  comprises entre 0,7 et 50  $\mu\text{g/ml}$ . Toutefois, le meilleur résultat a été obtenu à partir des extraits aqueux de *Combretum micranthum*. Ils ont par ailleurs montré que cette activité avait diminué après trois mois de conservation à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Benoit-Vidal et al., 1996)

Toujours en Côte d'Ivoire, une étude a été conduite pour évaluer l'activité antiplasmodiale des plantes utilisées en médecine traditionnelle en Afrique de l'ouest. Cinq espèces d'origine ivoirienne ont fait l'objet de l'étude dont *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae), *Mitragyna inermis* (Rubiaceae), *Nauclea diderrichii* (Rubiaceae), *Pterocarpus santalinoides* (Papilionacea) et *Terminalia glaucescens* (Combretaceae). Les tests ont concerné les souches chloroquino-résistantes FcM29-cameroun et FcB1-columbienne. Le meilleur pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites a été obtenu avec les extraits aqueux d'*Alchornea cordifolia* et de *Terminalia glaucescens* avec des  $CI_{50}$  comprises entre 2 et 5  $\mu\text{g/ml}$  (Mustofa et al., 2000)

Au Soudan, El Tahir et collaborateurs ont évalué en 1999 l'activité antiplasmodiale de plusieurs plantes médicinales. L'activité antiplasmodiale des extraits a été testée sur les souches chloroquino-sensible 3D7 et Chloroquino-résistante Dd2 de *P. falciparum*. L'extrait méthanolique de *Harrisonia abyssinica* inhibait Dd2 avec une  $CI_{50}$  de 4,7  $\mu\text{g/ml}$  par contre, il inhibait 3D7 avec une  $CI_{50}$  de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Sur les deux souches, *Khaya senegalensis*, *Azadirachta indica* et *Trichilia emetica* ont montré une  $CI_{50}$  inférieure à 5  $\mu\text{g/ml}$  (Ahmed et al., 1999).

Des tests préliminaires phytochimiques et antiplasmodiaux ont été entrepris au Kenya sur 16 plantes de la médecine traditionnelle. Les souches de *Plasmodium* utilisées étaient la chloroquino-sensible K67 et la chloroquino-résistante ENT36. Les extraits méthanoliques de *Phyllanthus reticulatus* et de *Suregada zanzibariensis* et les extraits des écorces de *Terminalia spinosa* et de *Dissotis brazzae*, ont donné une bonne activité antiplasmodiale avec une  $CI_{50}$  inférieure ou égale à 10  $\mu\text{g/ml}$  (Omulokoli et al., 1997)

Au Kenya, d'autres tests d'évaluation *in vitro* de l'activité antimalarique d'*Ajuga remota* Benth (Labiatae) et de *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae) ont été effectués pour confirmer leur usage ethnopharmacologique. Des extraits aqueux, éthanolique, hydrométhanolique et éthéropétrolique ont été testés sur les souches chloroquino-sensible FCA/20GHA et chloroquino-résistante W2. La meilleure activité antiplasmodiale est donnée par l'extrait éthanolique d'*Ajuga remota* avec une  $CI_{50}$  de 55  $\mu\text{g/ml}$  pour la souche sensible et 57  $\mu\text{g/ml}$  pour la souche résistante (Kuria et al., 2001).

*Artemisia annua* L. (Asteraceae) est une plante antimalarique de la pharmacopée chinoise. En République démocratique du Congo, cette plante a été hybridée et cultivée en vue de son exploitation dans les traitements antipaludiques au Congo à cause de l'artémisinine qui est le principe actif de la plante. Pour les patients traités avec des préparations obtenues à partir d'artémisinine de la plante hybride cultivée, on note une disparition de la parasitémie en moins de 4 jours (Mueller et al., 2000).

Dans ce même pays, une étude a été conduite sur 20 extraits éthanolique et Chlorométhylénique de 9 espèces de plantes médicinales africaines. Après les tests antiparasitaires, les résultats ont montré que les extraits des feuilles de *Cassia occidentalis*, des écorces de racines de *Cryptolepis sanguinolenta*, d'*Euphorbia hirta*, des écorces de tronc de *Garcinia kola*, des feuilles de *Morinda lucida* et de *Phyllanthus niruri* produisaient une inhibition de plus de 60 % de la parasitémie à 6  $\mu\text{g/ml}$  après 48 heures d'incubation (Tona et al., 1999).

Au Cameroun, des études ont porté sur les limonoïdes de *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). Les tests parasitaires conduits sur les souches de *P. falciparum* ont montré que les extraits bruts avaient une  $CI_{50}$  de 13,23  $\mu\text{g/ml}$ . Par contre les 5 limonoïdes isolés avaient des  $CI_{50}$  comprises entre 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$  (Bickii et al., 1999).

En Afrique du sud, des tests d'évaluation de l'activité antiplasmodiale des plantes médicinales ont été conduits. Les extraits ont été préparés avec du dichlorométhane. Les résultats ont montré que le meilleur pouvoir inhibiteur de la croissance des souches de *P. falciparum* est obtenu avec l'extrait dichlorométhane de *Ozoroa engleri*. La  $CI_{50}$  reportée est de 1,7  $\mu\text{g/ml}$ . Le test de cytotoxicité a montré que le même extrait est toxique à 35  $\mu\text{g/ml}$  (Prozesky et al., 2001).

Au Ghana, l'équipe de Jonathan Addae-Kyereme a travaillé sur des plantes utilisées en Médecine Traditionnelle Ghanéenne contre les accès de fièvre. Parmi les quatorze plantes testées, les extraits méthanoliques de *Pleiocarpa mutica* Benth (Apocynaceae) ( $CI_{50} = 17 \mu\text{g/ml}$ ), *Cleistopholis patens* Engl. Diels. (Annonaceae) ( $CI_{50}$

= 8 µg/ml) et *Uvaria chamae* Beauv. (Annonaceae) (CI<sub>50</sub> = 22 µg/ml) avaient une activité antiplasmodiale significative. Cinq alcaloïdes (pleiocarpine, kopsinine, pleiocarpamine, eburnamine et pleiomutinine) étaient isolés des racines de *P. mutica*. Les résultats parasitologiques ont montré que le meilleur pouvoir inhibiteur de la croissance de la souche K1 de *P. falciparum* était attribué à la pleiomutinine avec une CI<sub>50</sub> de 5µM (Jonathan et al., 2001).

## **2.2 Recherche phytochimique et pharmacologique de quelques plantes africaines**

Beaucoup de plantes d'origine africaine, à usage thérapeutique, ont fait l'objet d'études phytochimique et pharmacologique. Ces études ont pour objectif d'une part de confirmer leur usage dans le milieu traditionnel pour soigner des affections et d'autre part de mettre en évidence leur pouvoir thérapeutique. Nous rapportons ici les résultats de quelques études portées sur quelques plantes utilisées en Afrique dans le traitement du paludisme (tableau II).

**Tableau II : quelques molécules pures isolées des plantes africaines**

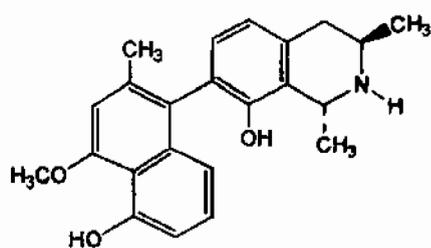
Molécules isolées	Plantes sources	Pharmacologie	Références
Justicidine A	<i>Haplophylum tuberculatum</i>	Tests sur les souches chloroquino sensible et résistante de <i>P. falciparum</i> . $0,8 < CI_{50} (\mu g/ml) < 9$	Khalid et al., 1989 (Soudan)
(+)-glabratephrine	<i>Tephrosia apollinea</i>		
Abrorinine	<i>Orcia renieri</i>		
Ostruthine	<i>Peucedanum ostruthium</i>		
5,6,7-trimethoxycoumarine,	<i>Diosma pilosa</i>		
Quercetine	<i>Melia azedarach</i> L.		
Gedunine	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. ; <i>Melia azedarach</i> L.		
$\alpha$ -cyperone	<i>Cyperus rotundus</i> L.	Tests réalisés sur la souche multirésistante de <i>P. falciparum</i> avec des $CI_{50} \leq 5 \mu g/ml$	Weenen et al., 1990 (Tanzanie)
N-isobutyldeca-2,4-dienamide	<i>Zanthoxylum giletti</i> (De Wild.)		
Securinine	<i>Margaritaria dioscoidea</i> (Baill.) Webster		
Uvaretine	<i>Uvaria faulknerae</i> , <i>U. kirkii</i> , <i>U. lucioda</i> , <i>U. tanzaniae</i> , <i>U. ssp</i>	Tests réalisés sur la souche multirésistante de <i>P. falciparum</i> avec des $2 < CI_{50} < 8 \mu g/ml$	Nkunya et al., 1991 (Tanzanie)
Diuvaretine			
Chamuvaretine			
(-)-pipoxide	<i>Uvaria pandesis</i>		
3-farnesylindole			

Dioncophylline A et B, Dioncopeltine,	<i>Triphyophyllum peltatum</i> (Huch et Dalz)	Tests sur les souches chloroquino sensible et résistante de <i>P. falciparum</i> . meilleur résultat de Dioncophylline A CI <sub>50</sub> ≤ 0,063 µg/ml	François et <i>al.</i> , 1994 (Côte d'Ivoire)
N-methyldioncophyllineA, Ancistrobrevine D, Ancistrocladine	<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>		
Dioncophylline	<i>Triphyophyllum peltatum</i> (Huch et Dalz)	Tests sur la souche de <i>P. falciparum</i> CI <sub>50</sub> = 1,44 µg/ml	Bringmann et <i>al.</i> , 1990 (Côte d'Ivoire)
5'-O-demethyldioncophylline	<i>Triphyophyllum peltatum</i> (Huch et Dalz)	Tests sur la souche de <i>P. falciparum</i> CI <sub>50</sub> de 0,3 µg/ml	
Acide betulinique	<i>Triphyophyllum peltatum</i> (Huch et Dalz) ; <i>Ancistrocladus heyneanus</i>	Tests sur la souche de <i>P. falciparum</i> CI <sub>50</sub> = 10,46 mg/ml	Bringmann et <i>al.</i> , 1997 (Côte d'Ivoire)
Strychnoxanthine	<i>Strychnos gossweileri</i>	Tests sur la souche multirésistante de <i>P. falciparum</i> .	Wright et <i>al.</i> , 1996 (Togo), Grellier et <i>al.</i> , 1996 (Ghana)
Melinonine F	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	CI <sub>50</sub> entre 0,1 et 6 µg/ml avec la plus faible valeur attribuée à la cryptolepine	
Serpentine			
5,6-dihydroflavopereirine			
Cryptolepine			

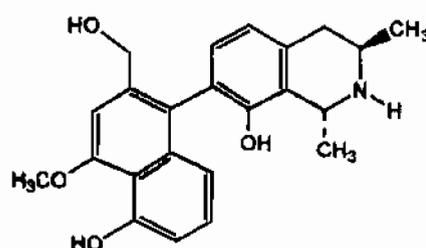
Gedunine	<i>Cedrela odorata</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> . CI <sub>50</sub> = 9 µg/ml	Mackinnon <i>et al.</i> , 1997,
Gedunine, Nimbolide	<i>Azadirachta indica</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> . CI <sub>50</sub> = 2 µg/ml pour gedunine et de 0,95 µg/ml pour Nimbolide	Rochnakij <i>et al.</i> , 1985 (Togo)
(+)-nyasol	<i>Asparagus africanus</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> . CI <sub>50</sub> = 12 µg/ml	Oketch-Rabah <i>et al.</i> , 1997 (Kenya)
Muzanzagenine	<i>Asparagus africanus</i>	Tests sur les deux souches de <i>P. falciparum</i> CI <sub>50</sub> entre 1 et 13 µg/ml selon les souches	
16,17-dihydrobrachycalxolide	<i>Vernonia brachycalyx</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> CI <sub>50</sub> entre 4 et 16 µg/ml	Oketch-Rabah <i>et al.</i> , 1998 (Kenya)
Acide Ursolique	<i>Spathodea campanulata</i>	Tests <i>in vivo</i> sur <i>P. berghei</i> . Activité antiparasitaire comparable à celle de la chloroquine à la dose de 60 mg/kg	Makinde <i>et al.</i> , 1988, Oluvole <i>et al.</i> , 1996 (Nigeria)
Palmatine, Jatrorrhizine, Columbamine	<i>Enantia chlorantha</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> , CI <sub>50</sub> entre 0,1 et 2 µg/ml	Vennerstrom <i>et al.</i> , 1988 (Nigeria)
Korupensamine	<i>Ancistrocladus korupensis</i>	Tests sur les souches de <i>P. falciparum</i> . CI <sub>50</sub> = 2 µg/ml mais toxique	Hallock <i>et al.</i> , 1997 (Cameroun)
Pleiocarpine, Kopsinine, Pleiocarpamine, Eburnamine, Pleiomutinine	<i>Pleiocarpa mutica</i>	Bonne activité antiparasitaire avec Pleiomutinine CI <sub>50</sub> = 5µM	Jonathan <i>et al.</i> , 2001 (Ghana)

### 2.3 Structures de quelques molécules pures isolées des plantes africaines

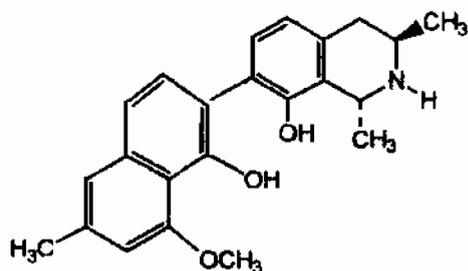
Lors des nombreuses recherches dans le domaine de l'ethnopharmacologie, de nombreuses molécules ont été isolées des plantes africaines. Parmi elles, figurent ces structures ci-après (figure 13).



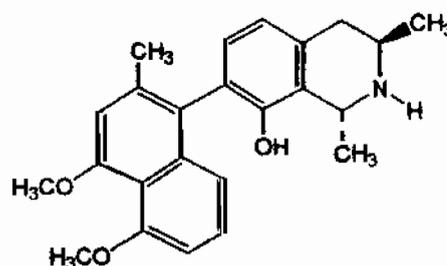
5'-O-demethyldioncophylline



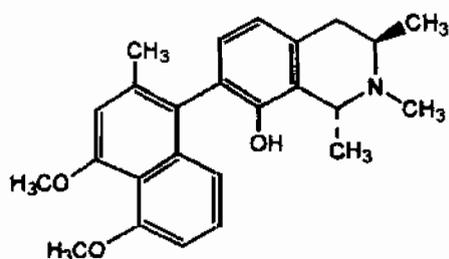
Dioncopeltine A



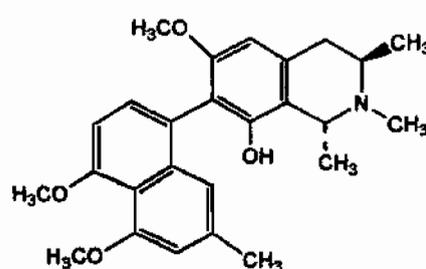
Dioncophylline B



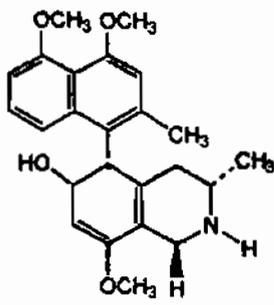
Dioncophylline A



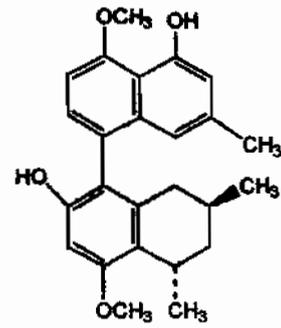
N-methyldioncophylline A



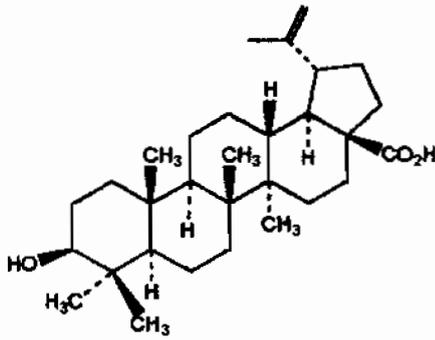
Ancistrobrevine D



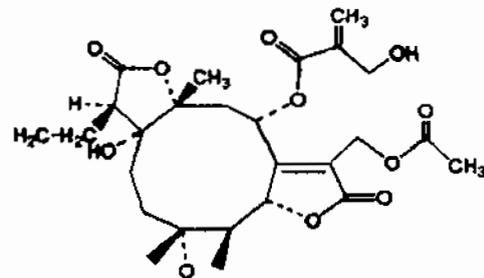
Ancistrocladine



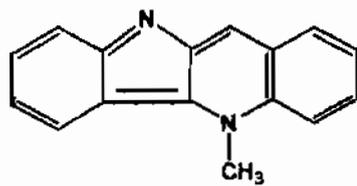
Korupensamine



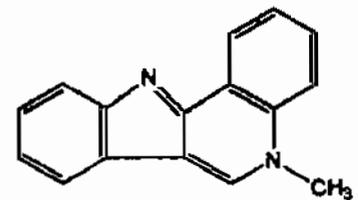
Acide bétulinique



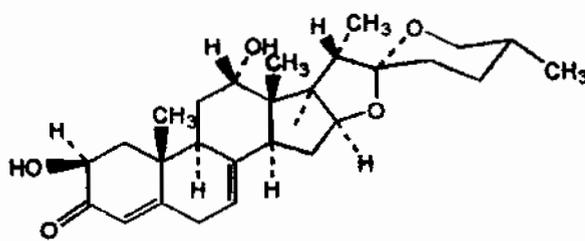
16,17-dihydrobrachycalixolide



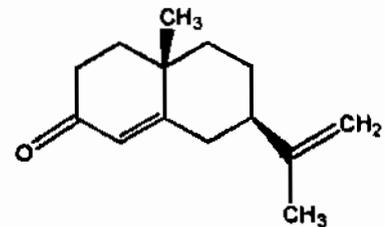
Cryptolepine



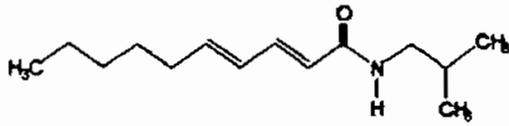
Isocryptolepine



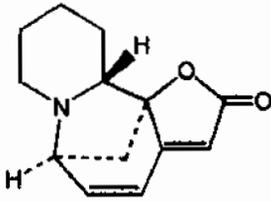
Myzangagénine



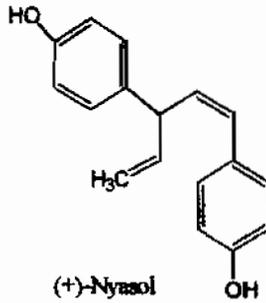
alpha-cyperone



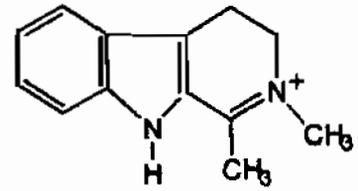
N-isobutyldeca-2,4 dienamide



Sécurinine



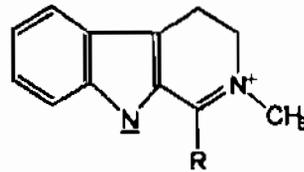
(+)-Nyasol



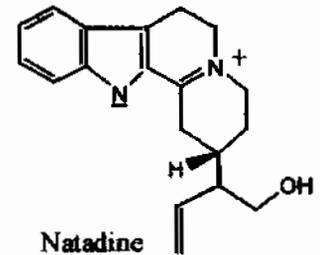
Nb-méthylharmaline



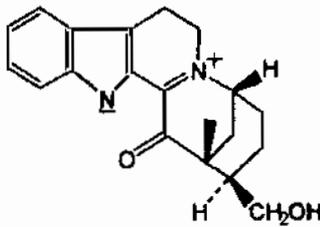
5,6-dihydroflavopareine



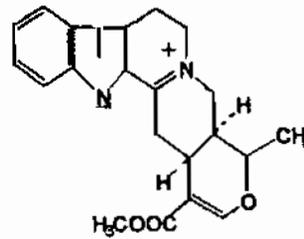
R= CH Mélimonine F  
R= H Normélimonine F



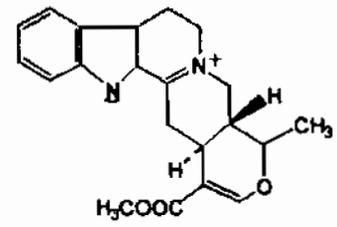
Natadine



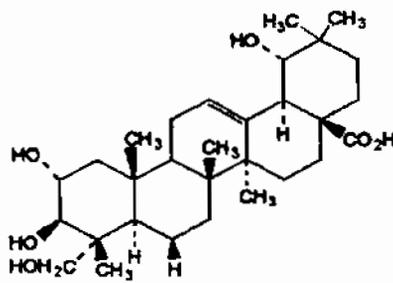
Strychnoxanthine



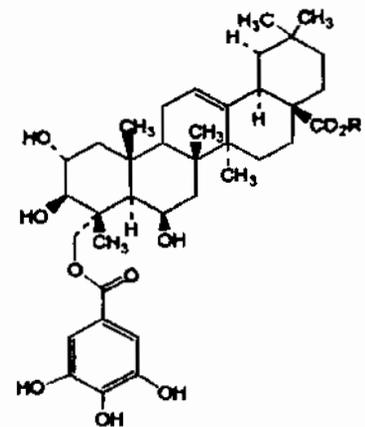
Alatonine



Serpentine



Arjungénine



- Acide 23-galloylarjunolique (R=H)  
- Ester beta-D-glucopyranosyl (R= beta-D-glucopyranosyl)

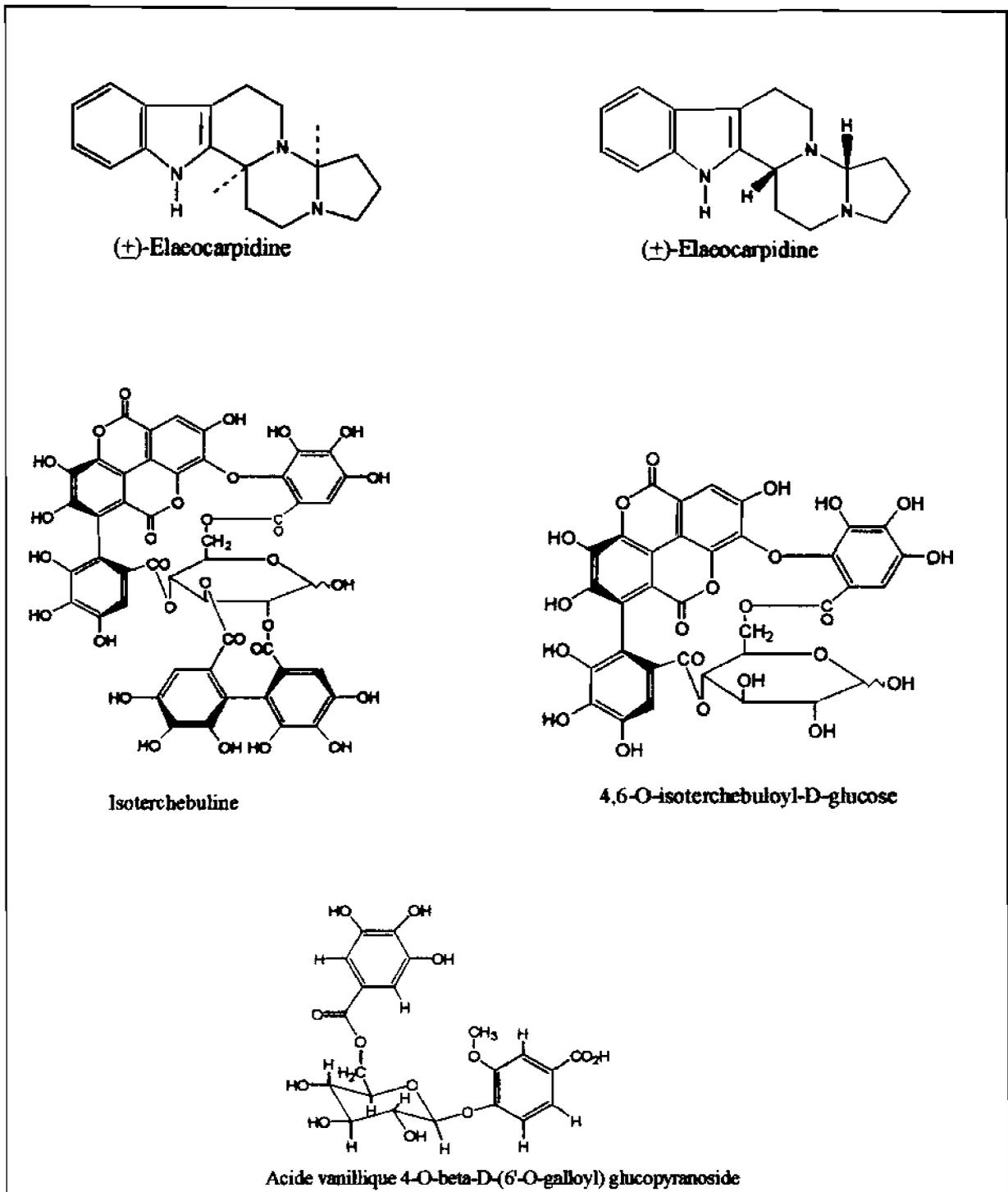


Figure 13 : structures chimiques de quelques molécules isolées des plantes médicinales africaines

### **3. PALUDISME, PHARMACOPEE ET MEDECINE TRADITIONNELLES AU BURKINA FASO**

Au Burkina Faso, l'incidence du paludisme en saison de haute transmission (saison pluvieuse) est de 60 % et se place en tête des maladies transmissibles, suivi des affections respiratoires (29 %) et des entérites et autres maladies diarrhéiques (28 %) (Diallo et *al.*, 1994). Le pays connaît une situation qualifiée de « pluralisme médical » c'est à dire que la médecine traditionnelle coexiste à côté de la médecine moderne (Sindiag et *al.*, 1995 ; Van der Geest et *al.*, 1997). Cette médecine traditionnelle remplit les critères de l'accessibilité, de la disponibilité et de l'acceptabilité (Nchinda et *al.*, 1976). Les infrastructures, le personnel médical et paramédical sont insuffisants et mal repartis géographiquement. La couverture sanitaire est limitée à moins de 50 % de la population (Diallo et *al.*, 1994) et le coût des soins médicaux est élevé et n'est pas à la portée de la population la plus touchée par le mal. Il est évident que les patients ont recours à la médecine traditionnelle pour les premiers soins des affections courantes.

#### **3.1 Présentation du Burkina Faso**

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé par le Mali, le Niger, le Bénin, le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire. Il est situé dans la partie ouest de l'Afrique avec une superficie de 274 000 km<sup>2</sup>. Sur le plan démographique, le Burkina Faso compte actuellement plus de 11 000 000 habitants dont 84 % vivent dans les campagnes et 16% dans les villes. Cette population est composée d'une soixantaine d'ethnies. Sur le plan administratif, le pays est organisé en 45 provinces, 322 départements, 33 communes et 8 100 villages. Le taux de croissance annuelle de la population est d'environ 2,5 %. Les moins de 15 ans représentent 49 % et les femmes 51 % de la population totale. La population du Burkina se caractérise par un dynamisme de croissance démographique avec une projection montrant qu'en 2010, elle augmentera de près de 50 % et cette progression concernera les groupes vulnérables tels que les enfants de moins de 5 ans et les femmes en âge de procréer (Figure 14).

La situation sanitaire des mères et des enfants demeure un sujet de préoccupation. Selon les estimations de l'enquête démographique en 1994, le taux de mortalité maternelle et infantile varie entre 500 et 1600 décès pour 100 000. Les causes sont

principalement liées à la pauvreté, la couverture prénatale très faible (46 % en 1994), l'accès physique aux formations sanitaires très limitées, la faible qualité des services, le coût élevé des produits pharmaceutiques disponibles.

Depuis 1994, les indicateurs sanitaires ont été repartis comme suit:

- le taux de mortalité infantile des enfants de 0 à 1 an s'élève à 114,6 pour 1000
- le taux de mortalité maternelle est de 5,66 pour 1000 naissances
- l'insuffisance alimentaire chronique présente un taux de 19 % de la population
- la malnutrition (sécurité alimentaire) des enfants de moins de 5 ans s'exprime à 29 % dont 1 % de malnutrition sévère.
- Parmi les pathologies, celles dominantes sont le paludisme, le SIDA, les parasitoses intestinales, les affections respiratoires, cutanées, bactériennes (diarrhée). En 1996, près de 45 000 cas de méningite ont été enregistrés au Burkina Faso. A ce chiffre évocateur, s'ajoutaient les nombreux cas de choléra, de rougeole, de tuberculose.
- Un médecin pour 33 227 habitants
- Le prix de vente des médicaments a augmenté de 76,3 % en moyenne de 1994 à nos jours.
- La baisse considérable du pouvoir d'achat en zone urbaine (16 % de la population) a appauvri par voie de conséquence les couches défavorisées. L'accès de cette population pauvre aux services de santé est donc devenu difficile suite à une baisse de revenu de 15 % et l'augmentation des prix des services curatifs et des médicaments de plus de 50 %.
- L'augmentation du prix des transports de l'ordre de 50 %, le faible équipement des centres de santé déjà insuffisants et les difficultés d'accès font que les habitants ruraux (84 % de la population) les plus exposés aux maladies, ont recours à la médecine traditionnelle pour traiter les affections courantes.

Dans la stratégie de réponse à ces problèmes sanitaires, le Burkina a mis en place des réformes dont les axes de la politique de santé reposent sur des orientations parmi lesquelles, la réforme pharmaceutique et la promotion de la médecine et de la pharmacopée traditionnelle basées sur la politique des médicaments essentiels génériques préconisés par l'OMS, la planification et le développement des ressources humaines dans le cadre de la décentralisation et de la modernisation de l'administration sans oublier la recherche en santé encore faible, mais qui constitue un moyen important pour la résolution des problèmes de santé au Burkina Faso.



## 3.2 La prévalence et épidémiologie

### 3.2.1 Incidence du paludisme

Au Burkina Faso, le paludisme est la première cause de morbidité avec plus de 1,5 millions de cas chez les enfants de mois à 5 ans (DMP, 1993 ; Sanon et al., 1997). Il constitue également la première cause de mortalité avec 20 % de l'ensemble des décès dans les formations sanitaires (Sanon et al., 1997 ; DMP, 1993 ; Dabiré et al., 1992). Les manifestations cliniques du paludisme varient selon l'âge et le niveau d'endémicité de la maladie (Greenwood et al., 1987 ; Marsh et al., 1995 , Hayes et al., 1992). Une étude réalisée dans les mois d'août à novembre des années 1993 et 1994 sur la détermination de la fréquence des formes cliniques du paludisme grave et compliqué en milieu hospitalier pédiatrique à Ouagadougou a montré que:

- l'insuffisance rénale due au paludisme est rare chez l'enfant (DEP, 1995 ; Warrell et al., 1990), le taux de létalité de 13 % avec des décès précoces de l'ordre de 88 % avant la 48<sup>ème</sup> heure (Sanon et al., 1997 ; Molyneux et al., 1990 ; Ayivi et al., 1992).

- les manifestations neurologiques et l'anémie sévère constituent les formes les plus fréquentes et les plus mortelles chez l'enfant (Sanon et al., 1997 , Molyneux et al., 1990 , Bermejo et al., 1992 , Hedberg et al., 1993 , Moyen et al., 1993 ; Senga et al., 1991).

- l'hypoglycémie est une complication habituelle du paludisme chez l'enfant reconnue au Burkina Faso (Sanon et al., 1997 ; Marsh et al., 1995 ; Warrell et al., 1990) Elle est significativement associée à l'existence de coma qui l'aggraverait (Hedberg et al., 1993 ).

### 3.2.2 Parasites et vecteurs

Les espèces plasmodiales responsables du paludisme sont *Plasmodium falciparum* présent dans plus de 90 % des cas, suivi de *Plasmodium malariae* (3 – 8 %) et de *Plasmodium ovale* (0,5 – 2 %) (CNLP, 1993). L'endémicité du paludisme au Burkina a été décrite pour une zone de Ouagadougou par Sabatinelli et collaborateurs (1986 a, b). Les indices plasmodiques et spléniques étaient respectivement de 44 à 71 % et de 27 à 41 % dans deux villages près de Ouagadougou (Pietra et al., 1991).

Les études entomologiques menées au Burkina révèlent que les principaux vecteurs du paludisme sont *Anopheles gambiae s.l.* et *Anopheles funestus*. *An. gambiae s.l.* est composé de 3 taxa qui se retrouvent dans une dynamique de population variable selon les

zones éco-climatiques du pays et les saisons, ce sont *An. arabiensis* et *An. gambiae* s.s. sous 2 formes chromosomiques.

La transmission palustre évaluée en milieux ruraux dans deux zones (zone sahéenne et la savane) était différente. Elle était moins forte dans la zone sahéenne qu'en milieu rural de savane (Gazin et al., 1988).

Le seuil de transmission se situe entre 25 et 350 piqûres infectées par personne et par année (Robert et al., 1985). A cause d'une différence climatique, le nombre de piqûres infectées par personne et par année se situe entre 300 et 500 pouvant atteindre 2000 (Habluetzel et al., 1997). Chaque année, les enfants sont piqués environ 396 fois par des *Anopheles* infectés par *P. falciparum* mais seulement 22 fois par des *Anopheles* infectés par *P. malariae* au Burkina Faso (Boudin et al., 1991).

### **3.2.3 La chimiorésistance**

Depuis 1988, la situation du paludisme s'est compliquée au Burkina Faso avec l'apparition de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine (CNLP, 1993). Des études faites *in vitro* (Ouedraogo et al., 1987) et *in vivo* (Rotigliano et al., 1990 ; Pietra et al., 1992 ; Del Nero et al., 1993) ont montré cette résistance. De 1982 à 1991, une étude *in vitro* et *in vivo* basée sur la surveillance de la résistance à la chloroquine, la quinine, la méfloquine et la sulfadoxine-pyriméthamine, a montré des cas de résistance dans les régions de Bobo Dioulasso et de Koudougou (Guiguemdé et al., 1994).

Dans la province de l'Oubritenga, il a été montré *in vivo* une prévalence élevée de *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine ainsi qu'une résistance probable à la sulfadoxine-pyriméthamine (Del Nero et al., 1994).

A Dori, en 1995, la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine a également été observée (CNLP, 1996).

### **3.3 Médecine et pharmacopée traditionnelles au Burkina Faso**

Au Burkina Faso, l'un des pays les plus touchés par le paludisme, l'homme a cherché dans le milieu environnant des remèdes pour soigner les maladies et calmer les douleurs. Ces connaissances, transmises de génération en génération, de bouches à oreille, ont quelquefois été collectées et conservées sous forme écrite par les ethnobotanistes et sont souvent à l'origine de grandes découvertes scientifiques comme

la quinine et la chloroquine avec le quinquina des indiens au Pérou (Rasoavaivo et *al.*, 1999).

Avant la colonisation, l'organisation de la société burkinabè intégrait la médecine et la pharmacopée traditionnelles comme fonction sociale destinée à résoudre les problèmes de santé des populations. Sa pratique et sa structuration correspondaient à une codification adoptée autorisant son développement harmonieux avec des limites et performances en rapport avec chaque type de société.

Pendant la période coloniale, la pratique traditionnelle en matière de santé n'a pas échappé au rejet du colonisateur comme tout ce qui était autochtone. Cette pratique est rentrée dans la clandestinité. Une telle situation a pu provoquer la disparition indéniable de certaines connaissances et acquis traditionnels d'autant plus que la plupart des médecins traditionnels ne savaient pas écrire. La dépréciation de la médecine et de la pharmacopée traditionnelle a continué après l'indépendance avec les séquelles de la colonisation ainsi que l'aliénation culturelle du pays.

Si de nos jours, la médecine et la pharmacopée traditionnelles intéressent tant les chimistes, les pharmacologues et les médecins de la médecine conventionnelle qui les tolèrent, c'est qu'elles s'imposent objectivement pour deux raisons majeures :

- elles sont populaires, plus accessibles et couvrent les soins de base de la santé au Burkina Faso.

- la présence du secteur médical traditionnel soulage considérablement le travail du personnel de la santé moderne. Son audience est réelle (Bognonou et *al.*, 1988). Les thérapies traditionnelles sont encore largement utilisées même lorsqu'il y a un dispensaire dans le village (Vaugelade et *al.*, 1987)

Les guérisseurs constituent un maillon non négligeable du réseau sanitaire, avec lesquels il faut compter et dialoguer. Des chercheurs ont mené des enquêtes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques à travers le pays. Cette dynamique trouve son fondement dans le fait que le Burkina a souscrit à la recommandation de la conférence d'Alma-Ata (URSS) de 1978 qui intègre la médecine traditionnelle comme composante des soins de santé primaires dans l'objectif « santé pour tous d'ici l'an 2000 ».

A partir de 1980, la médecine et la pharmacopée traditionnelles ont occupé sans doute une place importante dans le système de santé au Burkina Faso.

La collaboration entre médecins traditionnels et modernes connaît un succès relatif depuis 1984 du fait de la création d'un service de pharmacopée traditionnelle à la direction des services pharmaceutiques du ministère de la santé (Eureka, CNRST n°

0001, avril 1992) et la création d'unités provinciales de pharmacopée à Ouagadougou, Fada et Banfora.

En 1985, le Ministère chargé de la santé a réuni les tradithérapeutes en associations et a proposé de créer des cellules de pharmacopée traditionnelle dans toutes les provinces. Ces cellules ont pour tâche, entre autres, d'utiliser les recettes traditionnelles améliorées dans les formations sanitaires (Rapport du premier atelier inter-pays sur les médicaments traditionnels, 1994) Une Association Nationale des Tradithérapeutes (ANT) a été fondée en 1987 à Ouagadougou.

Actuellement, on utilise de nombreuses plantes dans le traitement du paludisme au Burkina Faso. Le décocté des feuilles de *Combretum micranthum* est considéré comme un bon fébrifuge en pays mossi (Bognonou et al., 1975). N'dribala (écorces des racines de *Cochlospermum tinctorium*) possède des propriétés antiparasitaires réelles *in vitro* et donne des résultats positifs dans certains cas de résistance à la chloroquine (Benoît et al., 1995). Beaucoup d'autres espèces de plantes sont utilisées contre le paludisme par la population burkinabè.

# **Chapitre II**

## **MATERIEL ET METHODES**

**1.**

**ENQUETE ETHNOBOTANIQUE**

## **1.1 Recensement des plantes**

Pour notre étude, nous nous sommes adressés à un certain nombre de connaisseurs en phytothérapie. Le but de l'enquête était de rechercher des informations concernant les plantes utilisées en médecine traditionnelle, particulièrement celles utilisées pour traiter les affections fébriles lors des accès palustres. Les deux recensements effectués ont permis d'inventorier 185 recettes.

### **1.1.1 Premier recensement**

Cette enquête s'est déroulée en novembre 1999 dans la ville de Ouagadougou et à Dinderesso situé à 15 Km à l'ouest de Bobo Dioulasso. Elle était basée sur la fouille des revues littéraires (Œuvres de Sofowora, du Père César, des publications et des thèses), le contact avec les pharmaciens (Dr. Zéphérin DAKYO à Banfora, ville située à environ 80 Km au sud-ouest de Bobo Dioulasso) et des chercheurs et aides écologistes, Mr. Lucien BOYONOU au Centre National en Recherche Scientifique et Technologique (CNRST), Mr. Dieudonné KINDA à l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) et Mr. Alassane OUEDRAOGO à l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts (ENEF) de Dinderesso dans la province du Houet.

### **1.1.2 Deuxième recensement**

Cette enquête était basée sur des questionnaires conformément à une fiche d'enquête préétablie. Elle a concerné les tradithérapeutes, les herboristes et les phytothérapeutes et s'est déroulée en décembre 2000 dans des sites de la région de Bobo Dioulasso uniquement. Au Burkina Faso, les tradithérapeutes sont organisés en associations reconnues ou non par l'Etat. Pour notre étude, nous avons rencontré les tradithérapeutes connus par les habitants des villages de manière à les entendre individuellement. Il en était de même pour les herboristes.

#### **1.1.2.1 Zone d'enquête**

La zone d'enquête pour sa biodiversité forestière très dense et sa grande utilisation par les populations. Vu le temps de sensibilisation des tradithérapeutes, presque inexistant, il fallait choisir un terrain où l'enquêteur était directement ou

indirectement connu de la population des localités choisies pour faciliter son intégration et par conséquent l'obtention des informations justes.

### 1.1.2.2 Démarche ethnobotanique:

#### ➤ Fiche d'enquête .

Les informations attendues des personnes interviewées sont présentées sur une fiche dite fiche d'enquête ethnobotanique (annexe 1). Elle comporte une partie concernant l'interviewé et les informations sur la plante (mode de préparation, de traitement et observations).

#### ➤ Procédure de recensement:

Nous avons interviewé les **tradithérapeutes**. Ils appartiennent à la catégorie de personnes qui donnent les soins curatifs à partir de la pharmacopée locale accompagnés ou non des rites (figure 15).

Une première visite dans le village a été effectuée dans le but de rencontrer individuellement les tradithérapeutes généralement illettrés pour leur expliquer l'objet de notre présence et l'importance du travail qui doit être fait. La première question à laquelle ils devaient répondre portait sur la reconnaissance du paludisme qu'ils désignaient par « Kon » en bobo, « Sumaya » en Dioula. Ces différentes désignations signifiant « humidité » pour exprimer Paludisme en français. Nous avons insisté sur la ravité de cette endémie et sur les dégâts qu'elle cause chaque année. Mais les thérapeutes traditionnels étaient conscients de l'importance du problème. Nous leur avons expliqué l'intérêt que notre travail pourrait avoir, à savoir exploiter ces plantes pour la mise au point de médicaments simples moins chers et disponibles dans les dispensaires et les districts sanitaires pour eux, leur est prononcée.

D'une manière générale, les tradithérapeutes ne connaissent pas la notion de transmission du paludisme par les moustiques. Pour eux, cette maladie qui sévit normalement pendant les périodes humides (saison des pluies) ne pouvait être provoquée que par l'humidité. La meilleure façon de ne pas la contracter est d'éviter de rester dans des endroits humides ou sous la pluie pendant longtemps. Selon ces thérapeutes traditionnels, le paludisme peut être provoqué par la consommation excessive des fruits comestibles comme les mangues, les fruits de karité ( *Vitellaria paradoxa* synonyme de

*Butyrospermum parkii* ou *Butyrospermum paradoxa* ) surtout aux moments de fraîcheur. C'est d'ailleurs cette notion d'humidité qui a valu le nom « Kon » ou « Sumaya » au paludisme.

Une deuxième visite a été effectuée pour rencontrer à nouveau les tradithérapeutes prêts à donner leurs recettes. Les questions leur ont été posées conformément à la fiche ethnobotanique. Chaque tradipraticien recevait une rémunération en échange de sa contribution.



Fig. 15 : un tradithérapeute interrogé

Nous avons également rencontré des **phytothérapeutes**. Il s'agit des personnes qui ne donnent pas forcément les soins curatifs mais qui ont des connaissances sur des plantes médicinales. C'est le cas des écologistes et des botanistes. Ces personnes généralement lettrées sont plus faciles à aborder. Elles sont généralement conscientes de la situation du paludisme. La condition pour bénéficier de leur contribution est le plus souvent un acte de collaboration pour l'étude. Ce personnage est rémunéré en fonction du temps consacré au travail (figure 16).



Fig. 16: un Phytothérapeute interviewé

Nous avons interviewé des **herboristes** qui vendent les différentes plantes médicinales qu'ils n'ont pas forcément récoltées eux-même. Ils peuvent les obtenir des tradithérapeutes vivant dans les villages aux environs de la ville comme ils peuvent être récolteur et vendeur (figure 17). Il n'était pas facile de leur expliquer l'objet de notre visite. L'idéal était de passer pour un client à la recherche d'un très bon médicament antipaludique. Dans ces conditions, ils donnaient les recettes qu'ils connaissaient. Généralement, les informations recueillies sur la fiche étaient incomplètes parce qu'ils n'ont pas été questionnés comme les tradithérapeutes et les phytothérapeutes. Les recettes étaient payées et par la suite, identifiées soit par un écologiste soit par un botaniste.

*Remarque* : les tradithérapeutes et les phytothérapeutes ont toujours été informés de notre éventuel passage pour valider notre enquête ethnobotanique.



Fig. 17: une herboriste interrogé

Après les enquêtes ethnobotaniques, les plantes les plus citées ont été retenues pour notre étude. Les informations obtenues des personnes interviewées sont présentées en annexe (Annexe 2).

## 1.2 Présentation des sept plantes à usage fréquent selon le recensement

### 1.2.1 *Pavetta crassipes* K. SCHUM

Famille : Rubiaceae

Nom vernaculaire Mooré : « Mokbiisri »

#### - Description

C'est un arbuste ramifié près de la base, à branches robustes, à écorce très pâle et blanchâtre. Les feuilles sont groupées à l'extrémité des rameaux, oblongues, lancéolées, sessiles. Il a des corymbes terminaux, denses, glabres et des fleurs blanc-verdâtres. Ses baies sont sphériques et noires à maturité. La pollinisation se fait par les chauve-souris. La reproduction s'effectue par les graines (Figure 18).

#### - Habitat

*Pavetta crassipes* est une plante de la savane humide soudanienne de l'Afrique tropicale.

- Chimie : Il s'agit des substances connues de la plante selon des études précédentes

Tableau III : quelques substances connues de *Pavetta crassipes*

Parties de la plante	substances	références
Feuilles	- glucides (61%)	
	- protéines (15%)	
	- acide aspartique	Kerharo et Adam, 1974,
	- acide glutamique	Nacoulma, 1996,
	- leucine	Walker et Sillans, 1961
	- acide citrique	Amos <i>et al.</i> , 1998
	- acide ascorbique	
	- alcaloïdes	
	- stérols	
	- flavonoïdes	
	- tanins	
- anthraquinones		

## **- Usage thérapeutique**

### **Usage interne**

**Tiges** : elles sont utilisées pour traiter le goitre et la fièvre. Elles sont des stimulants de la thyroïde

**Feuilles** : elles traitent l'accès pernicieux du paludisme, la fièvre, les myalgies, les soins post-partum, le syphilis, les soins aux accouchées, les courbatures, la splénomégalie. Elles sont toniques, antibactériennes, diurétiques, spasmolytiques, fébrifuges, et anti-inflammatoires.

**Racines** : Elles sont utilisées contre les morsures de serpent, alexitère vulnéraire.

### **Usage externe**

Seules, les feuilles sont exclusivement utilisées. Elles luttent contre les chancres syphilitiques, la diphtérie, l'angine, la glossite, les abcès ou les plaies à la gorge, le pian, les affections buccales, les aphtes, les stomatites, les courbatures, les soins post-partum, gencives saignantes. Elles sont antiseptiques, vulnéraires, hémostatiques, astringentes, toniques et antibactériennes (Walker et Sillans, 1961 ; Kerharo et Adam, 1974, Nacoulma, 1996)

## **1.2.2 *Terminalia macroptera* GUILL. et PERR. (Figure X2)**

Famille : Combretaceae

Nom vulgaire français : Badamier du Sénégal

Nom vernaculaire Mooré « Koond-poko »

## **- Description**

C'est un arbre à fût trapu, court, rarement droit, à la cime étalée, dense et ovoïde. L'écorce noirâtre est profondément striée et fissurée. Les feuilles sont alternes, brillantes, glabres, obovales, allongées, vert clair à limbe sessile. Les nervures sont latérales proéminentes roses sur les deux faces. C'est une plante à bourgeons terminaux avec de jeunes rameaux, des feuilles, inflorescences et des fruits glabres. On y trouve des épis axillaires densément couverts de fleurs blanches à jaune crème, légèrement velues, à parfum peu agréable. Les fruits sont ailés, allongés, glabres, elliptiques et vert clair.

Beaucoup de galles existent sur les feuilles et les fruits. La reproduction s'effectue par les graines (Figure 19).

**- Habitat**

*Terminalia macroptera* existe dans les bas-fonds soudano-sahéliens et soudaniens de l'Afrique tropicale

**- Chimie** : Les substances chimiques connues déjà connues de la plante sont consignées dans le tableau IV.

**Tableau IV : quelques substances connues de *T. macroptera***

Parties de la plante	Substances	Références
Feuilles	- stéroïdes	
	- acide chlorogénique	
	- flavone	
	- saponosides	
Ecorces	- glucoside de la quercétine	
	- caroténoïde	
	- stéroïdes	Kerharo et Adam, 1974,
	- palmitate de $\beta$ -sistostéryle	Nacoulma, 1996.
	- acide triméthyl-ellagique	
Bois	- tanins	
	- Acide terminolique	
	- acide ellagique	
	- acide tri ou tétra methyl-éthyl-ellagique	
Racines	- Laxiflorine (polyhydroxylactone)	
	- flavonoïdes	Jurgen et al., 1998, 2001
	- tanins pyrogalliques et catéchiques,	Maydell et al., 1990
	- caroténoïdes	Nongonierma et al., 1987, 1988
	- triterpènes	Higuchi et al., 1982
	- arjungenine	Anjaneyulu et al., 1982

---

- acide séricique	Sabu et <i>al.</i> , 1989
- acide arjunique	
- acide terminolique	
- arjunglucoside	
- séricoside	

---

**- Usages thérapeutiques traditionnels**

Les parties utilisées sont les feuilles, les racines, les graines, les écorces, les galles.

**Usage interne**

**Ecorces** : elles sont utilisées contre l'alcoolisme. Elles constituent un dépuratif.

**Feuilles** : elles traitent les entéralgies, les maux de cœur, la tuberculose, les fatigues, l'ictère, l'hépatite, les dépressions nerveuses, la fièvre, la syphilis, la fatigue sexuelle, l'épilepsie, la dysenterie, l'anorexie, les ankylostomes, les diarrhées et les dermatoses. Elles sont astringentes, analgésiques, fébrifuges. Elles constituent un reconstituant général et ont un effet anti-bactérien (Gram+), orexigène, vermifuge, diurétique, aphrodisiaque, antidépresseur, anti-fatigue.

**Racines** : elles sont utilisées contre les blennorrhagies, l'albuminurie, la stérilité, les hémorroïdes, la constipation, les maladies cutanées et l'anorexie. Ce sont des agents diurétiques, laxatifs, anti-inflammatoires, détersifs, anti-bactériens, orexigènes

**Graines** : astringentes, elles sont utilisées contre la dysenterie.

**Fruits galleux** : médicament contre la diarrhée.

**Usage externe** :

**Feuilles et écorces** : constituent un médicament contre les maladies de la peau, les plaies, l'hémorragie dentaire, les plaies ulcéreuses, les ulcères syphilitiques, les furonculoses généralisées, les hémorroïdes, les mycoses et le darte rouge. Elles ont un effet antiseptique, hémostatique, cicatrisant, antiphlogistique, anti-bactérien (Gram +) topique.

**Galles** : entrent dans le traitement des maladies cutanées. Elles constituent un antiseptique et un astringent.

**Racines** : elles soignent les blessures, les plaies, les conjonctivites. Toniques, elles sont antiseptiques (Walker et Sillans, 1961 ; Kerbaro et Adam, 1974, Nacoulma, 1996)

### 1.2.3 *Cassia siamea* LAM.

Famille : Caesalpiniaceae

Nom français : Casse de Siam, Bois-perdrix

#### - Description

C'est un arbre à port buissonnant, aux feuilles glabres, paripennées, alternes, oblongues, elliptiques, vert foncé, luisantes dessus à poils courts dessous. Les fleurs sont jaune-vifs en grappes dressées, denses, terminales et axillaires. Les fruits sont de longues gousses, lisses, brunâtres, renferment une quinzaine de graines brunes, brillantes, aplaties et ondulées. La pollinisation de l'espèce se fait par les abeilles et la reproduction par les graines (Walker et Sillans, 1961 ; Nacoulma, 1996) (Figure 20).

#### - Habitat

*Cassia siamea* est une plante originaire du sud-est d'Asie, d'Inde orientale, de Birmanie, de Malaisie, de Thaïlande, de Ceylan.

- **Chimie** : L'étude chimique portée sur cette plante a révélé la présence des substances (tableau V).

**Tableau V : Quelques substances connues de *C. siamea***

Parties de la plante	Substances	Références
Feuilles	- Siaminine C (alcaloïde isoquinolone),	
	- 6,8-dihydroxyisoquinoline-1-one	Vigya et al., 1991 Tiwari et al., 1978 Kerharo et Adam, 1974
	- Barakol	Nacoulma, 1996.
	- polysaccharides	Gupta et al., 1978
	- flavonoïdes	Singh et al., 1978
	- dimères de flavonoïdes	Thongsaard et al., 1996, 1997
	- isoflavone C-glycoside	Fiorino et al., 1998
	- stérols	Shafiullah et al., 1995, 1996

	- terpènes	
	- anthraquinones	
	- anthocyanidines	
	- proanthocyanidines	
	- tanins	
	- HCN	
Fruits	- tanins	
	- tanins	
amandes	- sitostérol	Kerharo et Adam, 1974,
	- lupénone	Samia et al., 1984
	- pigments bis-anthraquinones	
Racines et écorces	- cassiamines A, B et C	
	alcaloïdes	
	- HCN	

#### - Usages thérapeutiques

Les parties utilisées de la plante sont les tiges feuillées, les feuilles, les fruits.

**Usage interne :** les parties citées ci-dessus sont utilisées pour traiter l'angine, le paludisme, l'abcès du foie, la constipation et la jaunisse. Ce sont des agents cholagogues, dépuratifs, laxatifs, fébrifuges et antitumoraux.

**Usage externe :** L'abcès du foie, l'urticaire, la rhinite et l'herpès circiné, sont soignés avec les feuilles et les fruits. Ces derniers constituent des agents antiseptiques, antitumoraux, cicatrisants.

#### 1.2.4 *Acanthospermum hispidum* DC

Synonyme : *Acanthospermum humile* var *hispidum* (DC.) Kuntze

Famille : Asteraceae

Nom vernaculaire mooré : Guéma taabo

#### - Description

Elle représente une herbe suffrutescente annuelle à tige poilue, parfois vivace formant des petits buissons très ramifiés à cime en boule étalée. Les feuilles obovales,

pubescentes sur les 2 faces, sont vert-brun. Les inflorescences axillaires sont formées de plusieurs fleurs jaune- pâle. Les fruits composés de 5 akènes rayonnants sont terminés par un crochet épineux. La reproduction se fait par graines (Figure 21).

**- Habitat**

Cette espèce est originaire d'Amérique tropicale. C'est une plante rudérale des sols sableux. Elle envahit les lieux habités et cultivés, les bas-côtés des routes et des pistes.

**- Chimie :**

Des études ont révélé déjà la présence de certains groupes chimiques dans la plante (tableau VI)

**Tableau VI : Quelques substances connues d'*A. hispidum***

<b>Parties de la plante</b>	<b>Substances</b>	<b>Références</b>
Feuilles	- alcaloïdes	
	- HCN sous forme de traces	Summerfield et <i>al.</i> , 1997
	- chlorophylle	Hussain et <i>al.</i> , 1990
	- stéroïdes	Cartegena et <i>al.</i> , 2000
	- flavones	Kerharo et <i>al.</i> , 1974
	- saccharides	Nacoulma et <i>al.</i> , 1996
	- polyols	BEP Oliver-Bever, 1986
	- germacranolides	
	- guaïanolides	

**- Usages thérapeutiques**

Les parties utilisées sont les tiges feuillées qui sont des analgésiques, antibactériens, dépuratifs, cholagogues, diurétiques, laxatifs légers et émoullients.

**Usage interne :**

Ces tiges feuillées sont utilisées pour traiter les convulsions, les syncopes, l'angine, l'épilepsie, les affections hépato-biliaires (jaunisse, ictère du nourrisson), les maux de ventre (shigellose, typhoïde), la diphtérie, les migraines, les céphalées rebelles,

la dysenterie, les coliques, les parasitoses intestinales, les névralgies, les intercostales, les vomissements, l'urétrite, les menaces d'avortement. Elles sont utilisées contre les infections virales (Summerfield et al., 1997).

**Usage externe :** Elles sont utilisées contre les hémorroïdes, plaies, rhumatismes, lèpre, ictère du nourrisson, céphalées rebelles, névralgies intercostales, piquûre de scorpion. (BEP Oliver-Bever, 1986 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Nacoulma, 1996)

### 1.2.5 *Crossopteryx febrifuga* (AFZ. EX G. DON) BENTH.

Famille : Rubiaceae

Nom vernaculaire Mooré : « Kumbrwaga, Kansdem-tooré »

#### - Description

Cet arbuste possède des branches tortueuses à cime irrégulière. Les écorces lisses, grisâtres sont finement écailleuses. Elles sont cassantes, possédant des rhytidomes à tranches brunes. Les feuilles ovales, jaunissent avant de tomber au début de la saison sèche. Il a des corymbes terminaux très fleuris. Les fleurs blanches, très parfumées sont pubescentes avec de petites bractées à la base des pédicelles. Ces les fruits sont des capsules noirâtres à maturité, sphériques avec la cicatrice circulaire de sépales au sommet. Elles s'ouvrent en 2, laissant échapper deux graines plates, ailées. La pollinisation se fait par les abeilles et la reproduction par les graines (Figure 22).

#### - Habitat

Cette plante pousse dans les savanes soudano-sahéliennes.

#### - Chimie :

Grâce à certaines études précédentes, des substances chimiques contenues dans le tableau VII, sont connues.

**Tableau VII : quelques substances connues de *C. febrifuga***

<b>Parties de la plante</b>	<b>Substances</b>	<b>références</b>
Feuilles	- glycoside	
	-β-quinovine	
	- tanins	Kerharo et Adam, 1974
	- flavonoides	Erdelmeier et al., 1987
	- triterpènes	Thomas-Barberan et al., 1988
	- stéroïdes	
Ecorces	- alcaloides	
	- crossoptine A et B	
	- phytostérol	Kerharo et Adam, 1974
	- les tanins	Foresta et al., 1988
	- les terpénoïdes	
Racines	- les stérols	
	- saponosides	Kerharo et Adam, 1974
	- stérols	Babady-Bila et al., 1991

**- Usages thérapeutiques**

Les parties utilisées de cette plante sont les tiges feuillées, les écorces, les racines, les fruits.

**Usage interne :**

**Tiges feuillées et fruits :** ils constituent des agents antibactériens, dépuratifs, antispasmodiques intestinaux, antalgiques, galactogogues, hypotenseurs légers, ocytociques, diurétiques, fortifiants, stimulants, antivomitifs. Les maladies qu'ils traitent sont : jaunisse, ictère, paludisme avec douleurs gastro-entéralgiques, fièvres, toux, diarrhée, empoisonnement, maux de poitrine, agalactie, fatigue générale, orchite, gonococcie, coliques, gastralgies, entéralgies, asthme, vomissement, vertiges, accouchement dystocique, rhumatismes, parasites intestinaux, névralgies.

**Ecorces :** elles sont utilisées contre les fièvres, les entéralgies, l'orchite, la blennorragie, la diarrhée, la toux, les gastro-entérites, les maux de poitrine, la tuberculose, l'asthme et la stérilité (femme). Elles sont douées d'un effet antiseptique, anesthésique local, protozoïcide, astringent, vasoconstricteur léger, diurétique, hypotenseur, spasmolytique.

**Racines :** elles sont utilisées contre les vertiges, les névralgies, le ténia, les palpitations cardiaques, les toux coliques, les crises convulsives, les rhumatismes, les coliques. Elles possèdent une action anti-arythmique, spasmolytique, anti-inflammatoire, ténifuge.

### **Usage externe**

**Ecorces :** Ces parties soignent les gingivites, les plaies, le chancre syphilitique et l'ulcère phagédénique. Ce sont des antiseptiques, des cicatrisantes et des astringentes.

**Feuilles :** Préparées en pâte en application locale, elles sont conseillées contre les douleurs rhumatismales. Ce sont des anti-inflammatoires et antalgiques (BEP Oliver-Bever, 1986 ; Kerharo et Adam, 1974, Nacoulma, 1996)

### **1.2.6 *Fadogia agrestis* SCHWEINF. Ex HIERN**

Famille : Rubiaceae

Nom vernaculaire Mooré : « Bit-koon-bré »

#### **- Description**

Plante herbacée vivace, *F. agrestis* possède des tiges caduques et des feuilles verticillées très tomenteuses dessous. La floraison se fait en début de saison des pluies. Les fleurs groupées, jaunes verdâtres ont de longs pétales. Les fruits sont des drupes sphériques avec les vestiges des sépales. La pollinisation est réalisée par les chauve-souris et les abeilles. La reproduction se fait par les graines (Figure 23).

#### **- Habitat**

Elle est originaire d'Afrique dans les savanes soudaniennes

#### **- Chimie :**

Le tableau VIII montre les composés chimiques déjà connus de la plante

**Tableau VIII : quelques substances connues de *F. agrestis***

Parties de la plante	Substances	Références
Tige feuillée	- saponosides stéroïdiques	
	- stéroïdes	Kerharo et Adam, 1974
	- flavonoïdes	Nacoulma, 1996
	- alcaloïdes	
	-amines	

**- Usages thérapeutiques**

Les parties retenues pour les usages thérapeutiques sont les tiges feuillées et les racines.

**Usage interne :**

**Tiges feuillées :** Les maladies soignées sont les fièvres, les frissons, le paludisme avec douleurs gastro-intestinales, rachitisme, dysentérie, MST, maux de reins, crises convulsives et anorexie. Ce sont des fébrifuges, dépuratifs, antipyrétiques, fortifiants, diurétiques, spasmolytiques et anti-protozoaires.

**Racines :** Le traitement avec les racines de *F. agrestis* concerne les entéralgies, constipation avec douleurs intestinales, la blennorragie, les maux de reins, l'accouchement difficile, la dyspnée et les fractures. Ces racines constituent un agent antalgique, purgatif, émollient, antibactérien, diurétique, anti-inflammatoire, reminéralisant et spasmolytique.

**1.2.7 *Ficus sycomorus* L.**

Synonyme : *Ficus gnaphalocarpa* (Miq.) Steud ex A. Rich.

Famille : Moraceae

Nom français : Sycomore

Nom vernaculaire Mooré : « Kankanga

**- Description**

C'est un grand arbre à cime épaisse et très étalée. Ses écorces sont grises ou jaunâtres, lisses, écailleuses à tranche rose pâle avec un écoulement abondant de latex. Il possède de grandes feuilles ovales, dentées et feutrées. Les fleurs mâles possèdent deux étamines. Les figes grandes et rouges ou oranges sont rondes, poilues, pédonculées et

comestibles. La pollinisation se fait par les chauve-souris et les insectes. La reproduction s'effectue par les graines (Figure 24).

**- Habitat**

Cet arbre est originaire d'Afrique des régions sèches à bas-fonds sableux

**- Chimie :**

Dans la plante, des substances chimiques ont été déjà révélées. Elles sont consignées dans le tableau IX.

**Tableau IX : quelques substances connues de *F. sycomorus***

Parties de la plante	Substances	références
Feuilles	- glucides	
	- vitamines C	
	- saponosides	
	- stéroïdes	
	- triterpénoïdes	
	- tanins	
Ecorces	- flavonoïdes	
	- stérols	Kerharo et Adam, 1974
	- tanins	Abu-Mustafa et al., 1964
	- alcaloïdes	
	- saponosides ( $\beta$ -amyrine, lupeol)	
	- $\beta$ -sitostérol	
Fruits	- glucides	
	- protéines	
	- sels minéraux	

**- Usages thérapeutiques**

Les parties utilisées sont les feuilles, les fruits, les écorces, le latex et les racines

### **Usage interne :**

**Feuilles :** Elles sont utilisées contre la jaunisse, l'ictère, la morsure de serpent, la piqûre de scorpion, l'insolation, les maux de tête, l'asthme et la dysenterie. Elles sont cholagogues, cholérétiques, alexitères, calmantes et antalgiques.

**Ecorces :** préparées en décocté, elles luttent contre la toux, les inflammations de la gorge, les douleurs thoraciques, les intoxications, les venins, l'hydropisie, l'agalactie, les maux de ventre, la stérilité de la femme, l'accouchement dystocique et l'albuminurie de grossesse. Elles constituent un agent émollient, anti-inflammatoire, antalgique, alexitère, antivenimeux, diurétique, galactogène, antispasmodique, ocytocique, myorelaxant et émétique.

**Racines :** Elles sont purgatives, laxatives, galactagogues et vermifuges. Elles sont utilisées dans les embarras gastriques, l'hydropisie, l'agalactie et contre les vers intestinaux.

**Latex :** cette substance est employée pour le traitement de la dysenterie et la diarrhée. Elle est astringente et antibactérienne.

### **1.3 Récolte du matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué des parties des plantes utilisées dans les recettes de la pharmacopée traditionnelle. Ces parties sont récoltées juste après la fin du recensement. La récolte est faite soit à la main des branches quand il s'agit des feuilles ou des tiges feuillées, soit par la machette quand il s'agit des écorces de tronc. Les écorces de tronc ont été récoltées par déterrement avec la pioche et les écorces sont enlevées au couteau. Le matériel végétal est mis dans des sacs différents de polystyrène et transporté dans une salle. Il est étalé à l'air libre sur un endroit sec à l'abri du soleil. Il est remué de temps en temps pour permettre l'aération et le séchage. Le temps minimum de séchage est de 4 jours.

Le matériel bien sec, est broyé à l'aide d'un broyeur électrique qui est soigneusement nettoyé quand on passe d'une plante à l'autre. La poudre est conditionnée dans des sachets et hermétiquement collés pour éviter l'humidité. Ce conditionnement permet de conserver la poudre pendant longtemps. C'est cette poudre qui sert de matière première pour les tests phytochimiques.

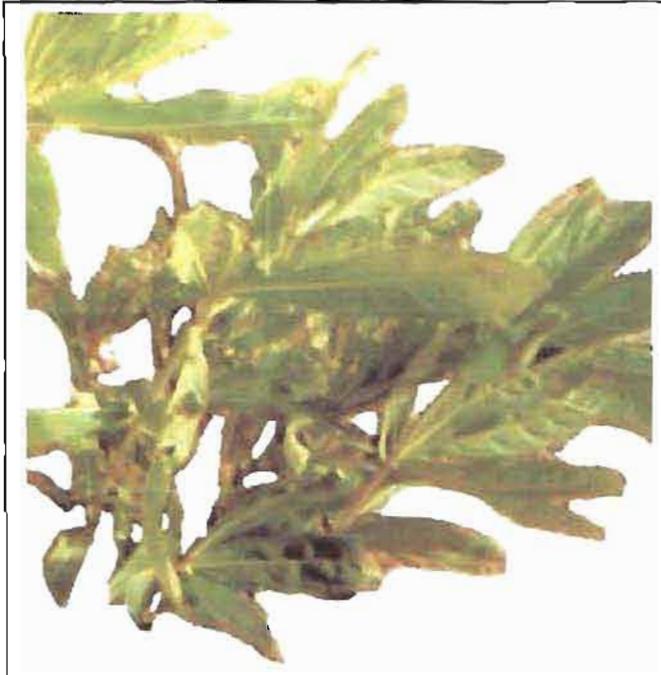


Figure 18 : *Pavetta crassipes*



Figure 19 : *Terminalia macroptera*



Figure 20 : Portrait de *Cassia siamea*



Figure 21 : *Acanthospermum hispidum*

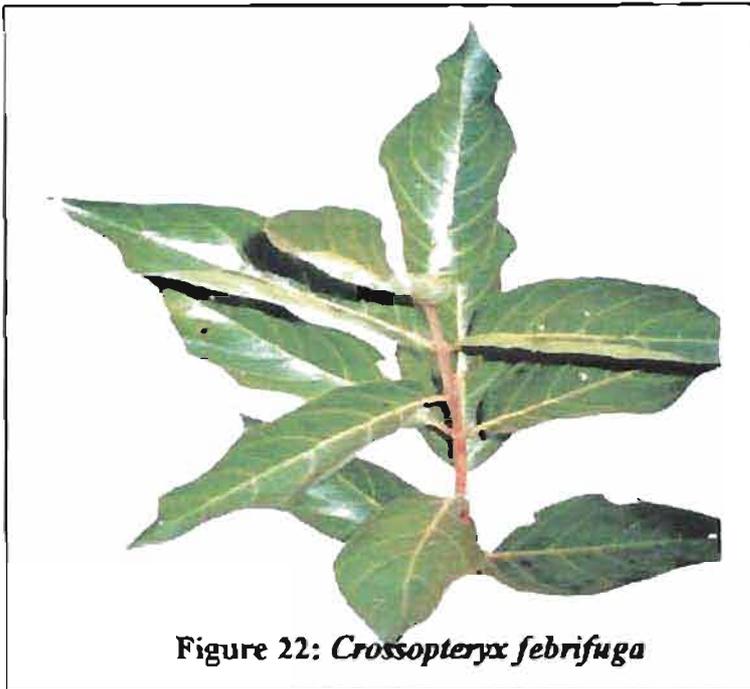


Figure 22: *Crossopteryx febrifuga*

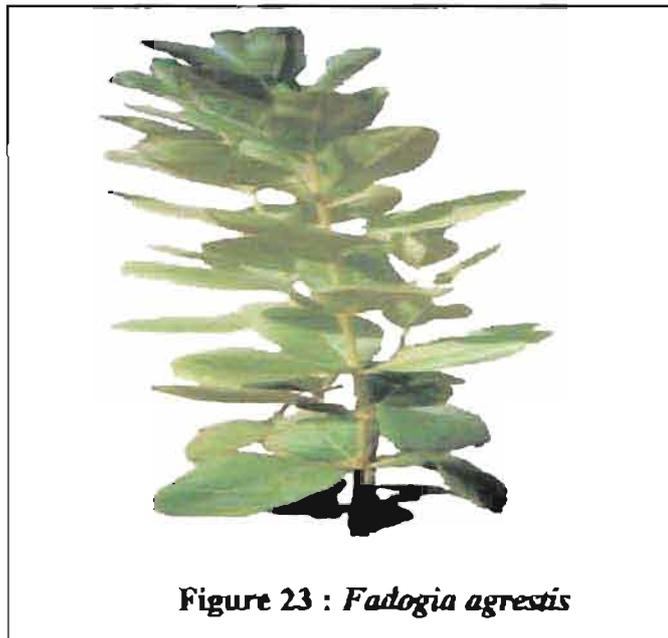


Figure 23 : *Fadogia agrestis*

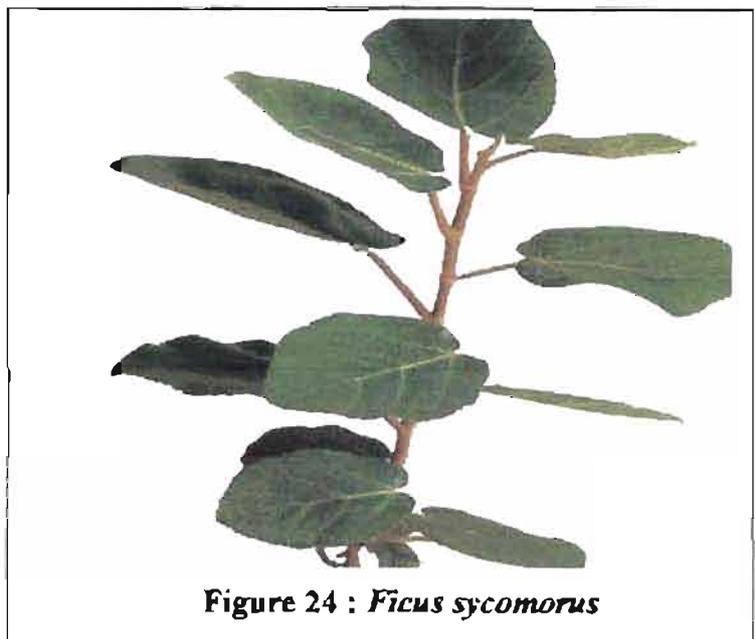


Figure 24 : *Ficus sycomorus*

**2.**

**ETUDE PRELIMINAIRE**

## **2.1 Extractions et analyses chromatographiques**

Les tests préliminaires ont été réalisés avec des solvants de polarité différente afin d'obtenir des extraits contenant des molécules de polarité différente. Nous avons préparé des extraits aqueux (décoctés), chloroformiques, méthanoliques et hydrométhanoliques. Outre ces préparations, la présence des alcaloïdes dans les plantes a été mise en évidence à partir d'une extraction spécifique sur une petite quantité de poudre.

### **2.1.1 Extractions**

#### **❖ Recherche des alcaloïdes**

L'extraction des alcaloïdes est faite suivant le protocole classique mais sur une petite quantité de poudre végétale (voir extraction des alcaloïdes totaux). La poudre est préalablement humectée avec de l'ammoniaque 30%. Cette alcalinisation permet de libérer les alcaloïdes présents sous forme de sels dans la plante. Ils passent alors sous forme de base et sont donc extractibles par un solvant chloré comme le chloroforme. Ainsi sur 20 g de drogue, on réalise une macération pendant 16 heures dans du chloroforme. Après percolation, la solution chloroformique est acidifiée avec de l'acide sulfurique (3%). La phase aqueuse est ensuite alcalinisée avec de l'ammoniaque (30%) puis extraite par le chloroforme. La solution chloroformique finale est concentrée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir des alcaloïdes bruts totaux.

#### **❖ Extraits chloroformique, méthanolique et hydrométhanolique**

Le même procédé extractif est suivi pour ces trois solvants ( $\text{CHCl}_3$ , MeOH, MeOH 50%), utilisés de manière successive à partir de la même quantité de poudre de drogue. La méthode consiste à mettre la poudre à macérer avec le solvant pendant 16 heures puis la drogue est lixiviée avec un volume de solvant extractif correspondant à 10 fois le poids de la poudre de départ (Figure 25). La quantité de poudre utilisée est de 20 g pour 200 ml de lixiviat ont été collectés pour chaque solvant.

#### **❖ Extraits aqueux (décoctés)**

La décoction a été utilisée dans le souci de nous rapprocher le plus possible de la préparation traditionnelle concernant ces plantes. Elle consiste à maintenir la poudre de

plante dans de l'eau bouillante pendant 30 minutes. Après refroidissement, la solution est filtrée. Le filtrat est lyophilisé afin d'obtenir un extrait sec (Figure 26). Pour chaque plante, 20 g de poudre ont été utilisés dans 400 ml d'eau distillée.

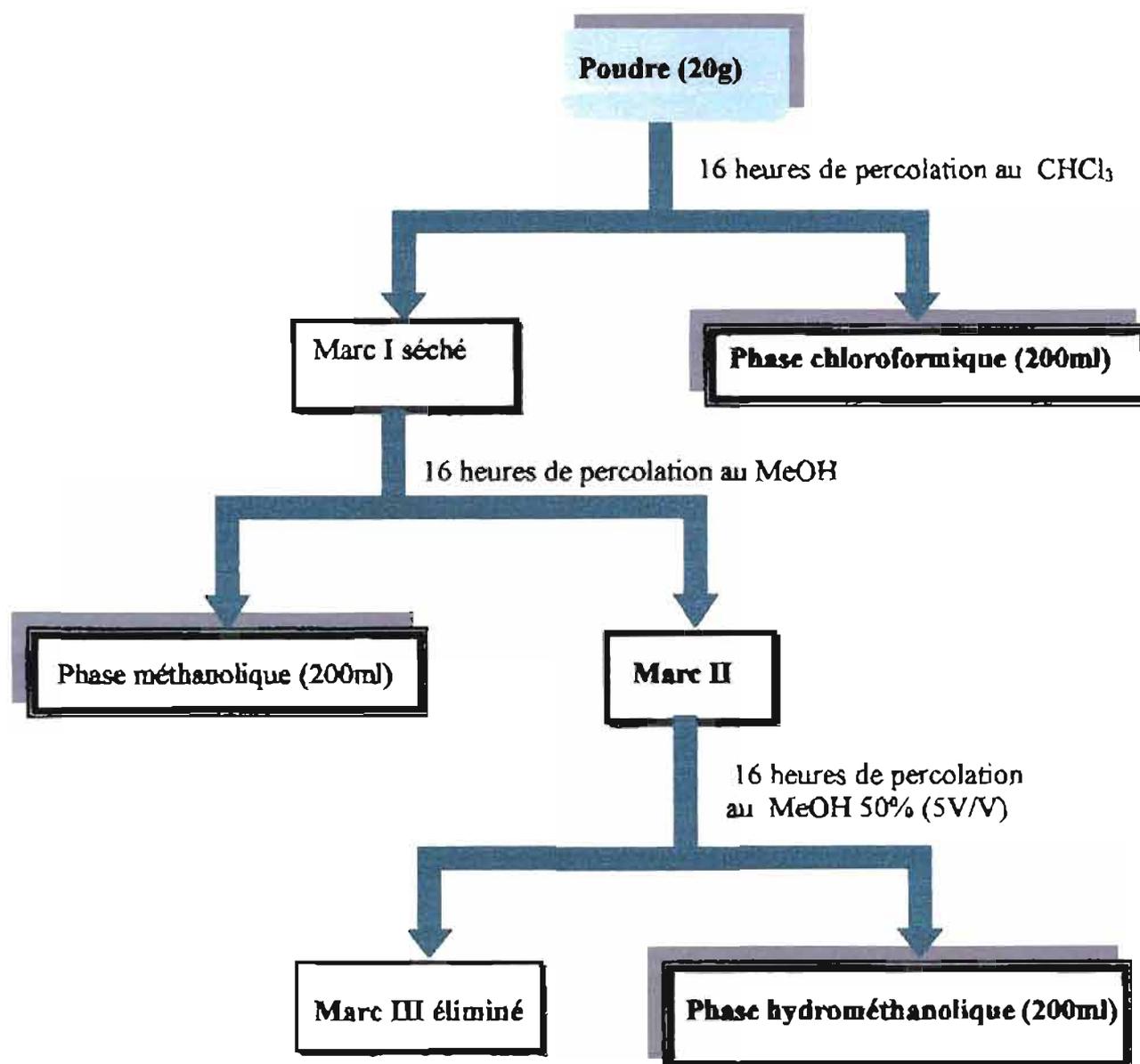


Figure 25: protocole d'obtention des extraits bruts chloroformique, méthanolique et hydrométhanolique

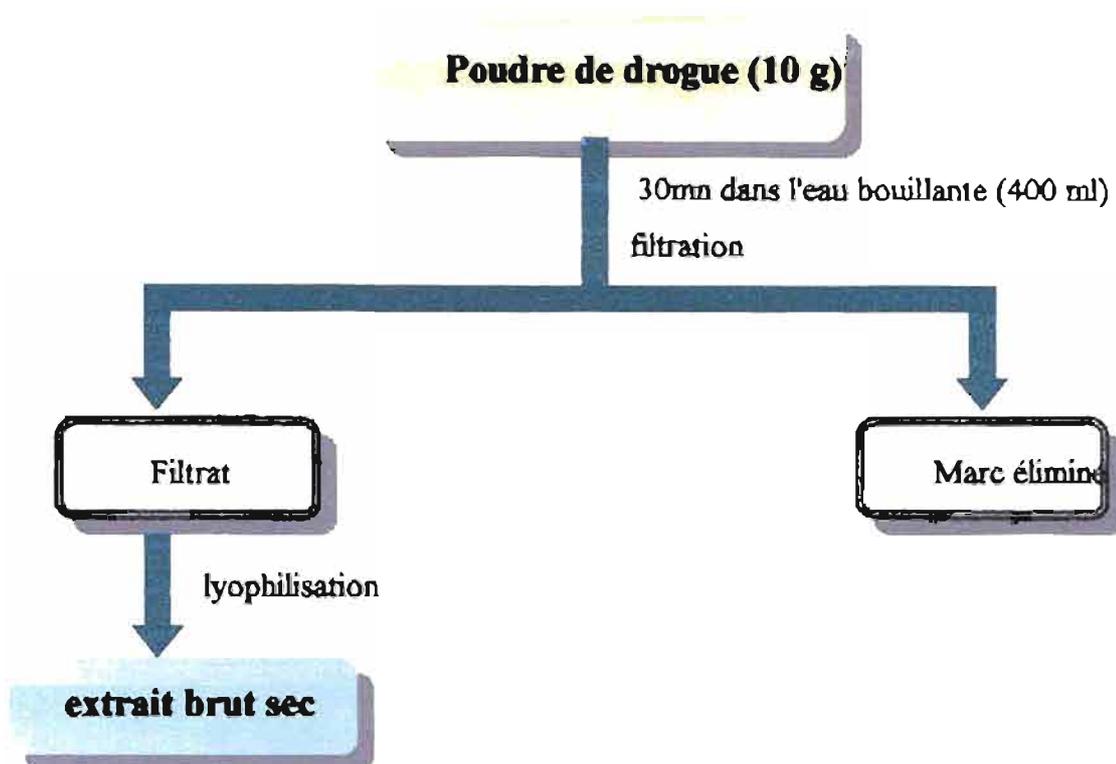


Fig.26 : méthode de préparation d'un décocté

### 2.1.2 Analyses Chromatographiques

La chromatographie sur couche mince a été utilisée. Cette technique nous a permis de visualiser à partir des plaques chromatographiques les composés chimiques contenus dans les extraits. Ainsi, selon le principe de migration dans un mélange de solvants, les composés sont observés sous forme de tache sur le support qui est la silice.

- support: plaque de gel de silice 60F<sub>254</sub>, (40-63 μm) Merck
- solvant: de qualité pour analyse (RPE)
- Solvant de migration<sup>1</sup>: Partridge : phase supérieure du mélange *n*-butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5)
- Révélateurs:
  - o UV<sup>2</sup> (254 nm et 365 nm) : ce sont des rayonnements ultra-violet qui permettent de visualiser les différents groupes chimiques quand ceux-ci absorbent ou pas à une longueur d'onde donnée.

<sup>1</sup> Solvant de migration: solvants servant de liquide de migration. On l'appelle encore milieu de migration

<sup>2</sup> UV: lampe au rayons lumineux ultra violet

○ **Réactif de Dragendorff** : révélateur des alcaloïdes apparaissant en jaune orangée. Il est composé de deux solutions : Solution A + Solution B (Munier R. et al., 1951 ; Jatzkewitz H. et al., 1953).

**Solution A** : Nitrate de Bismuth (0,85g)  
Acide acétique cristallisable (10ml)  
Eau distillée (40ml)

**Solution B** : Iodure de potassium (8g)  
Eau distillée (20ml)

○ **Diphénylborate d'amino-éthanol** : révélateur des flavonoïdes par la coloration jaune. Encore appelé réactif de NEU, il est composé de :

**Solution A** : solution de 2-aminoéthyl diphénylborinate à 1% (m/v) dans du méthanol

**Solution B** : solution de polyéthylène glycol (PEG) 400 à 5% (m/v) dans de l'éthanol

Les solutions sont préparées séparément et se pulvérisent l'une après l'autre (environ 10 ml de la solution A d'abord et ensuite 8ml de la solution B)

○ **Vanilline sulfurique** : révélateur des composés terpéniques en particulier les saponosides par la coloration bleue ou mauve (selon le type de saponoside). Il est composé :

- Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) concentré (2ml)
- Vanilline (1g)
- Ethanol pur (100ml)

○ **Acide sulfurique** : Révélateur universel. Tous les groupes chimiques apparaissent normalement après pulvérisation à l'acide sulfurique suivie d'un chauffage à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes. Il est composé de :

- Acide sulfurique concentré (20ml)
- Méthanol pur (80ml)

## **2.2 Tests antiparasitaires**

Dans la logique de ces travaux, il est nécessaire de procéder sur les extraits bruts à des tests préliminaires d'inhibition de la croissance de *Plasmodium falciparum*. Ce travail a pour but de valider d'une part l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans le traitement du paludisme et d'autre part de donner des informations sur le type d'extrait

responsable de l'activité antiparasitaire. Les extraits bruts ont été testés aux concentrations comprises entre 4 et 25 µg/ml sauf les décoctés où les concentrations étaient de 50, 100, 250 et 500 µg/ml. La souche chloroquino-résistante (W2) a été utilisée pour ces tests. Les détails de cette manipulation sont donnés dans la partie pharmacologie.

**3.**

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE**

## **3.1 Extractions**

### **3.1.1 Extraction des alcaloïdes totaux**

L'extraction des alcaloïdes est fondée, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité c'est-à-dire une solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part. Le fait que le matériel végétal soit souvent riche en graisses, en cires, en terpènes, en pigments et autres substances lipophiles pouvant perturber le protocole extractif, alors la poudre de drogue est au préalable épuisée avec de l'éther de pétrole permettant ainsi de les éliminer. Le marc séché est alcalinisé en l'humectant avec de l'ammoniaque 30 % puis mis à macérer pendant 16 heures dans du  $\text{CHCl}_3$ . La phase chloroformique obtenue après lixiviation est concentrée puis acidifiée avec de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3% jusqu'à pH3. La phase aqueuse acide est alcalinisée à nouveau avec de  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% (quelques gouttes) jusqu'à pH8. Cette phase basique est extraite à nouveau avec du chloroforme. La phase chloroformique est concentrée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. On obtient un résidu sec d'alcaloïdes totaux (Figure 27).

### **3.1.2 Extraction des composés terpéniques**

On réalise 16 heures de macération puis une lixiviation avec du  $\text{CHCl}_3$  en vue de débarrasser la poudre de drogue de tout composé lipophile. Le marc séché est ensuite mis à macérer dans du MeOH 50% ou du MeOH 80% pendant 16 heures de macération. La phase hydrométhanolique est concentrée sous pression réduite afin d'éliminer le méthanol, la phase aqueuse est lyophilisée. L'extrait sec obtenu après lyophilisation contient les saponosides totaux et d'autres composés terpéniques.

## **3.2 Etude analytique**

Cette étude nous a permis de visualiser à partir des plaques chromatographiques les composés chimiques contenus dans les extraits. Ainsi, selon le principe de migration dans un mélange de solvants, les composés sont observés sous forme de tache sur le support qui est la silice. C'est une technique qui a permis d'une part de concevoir un solvant de migration permettant une bonne séparation des composés contenus dans les extraits et d'autre part de mettre au point un milieu transposable à la chromatographie préparative. Elle nous a permis également de vérifier la pureté de nos produits isolés.

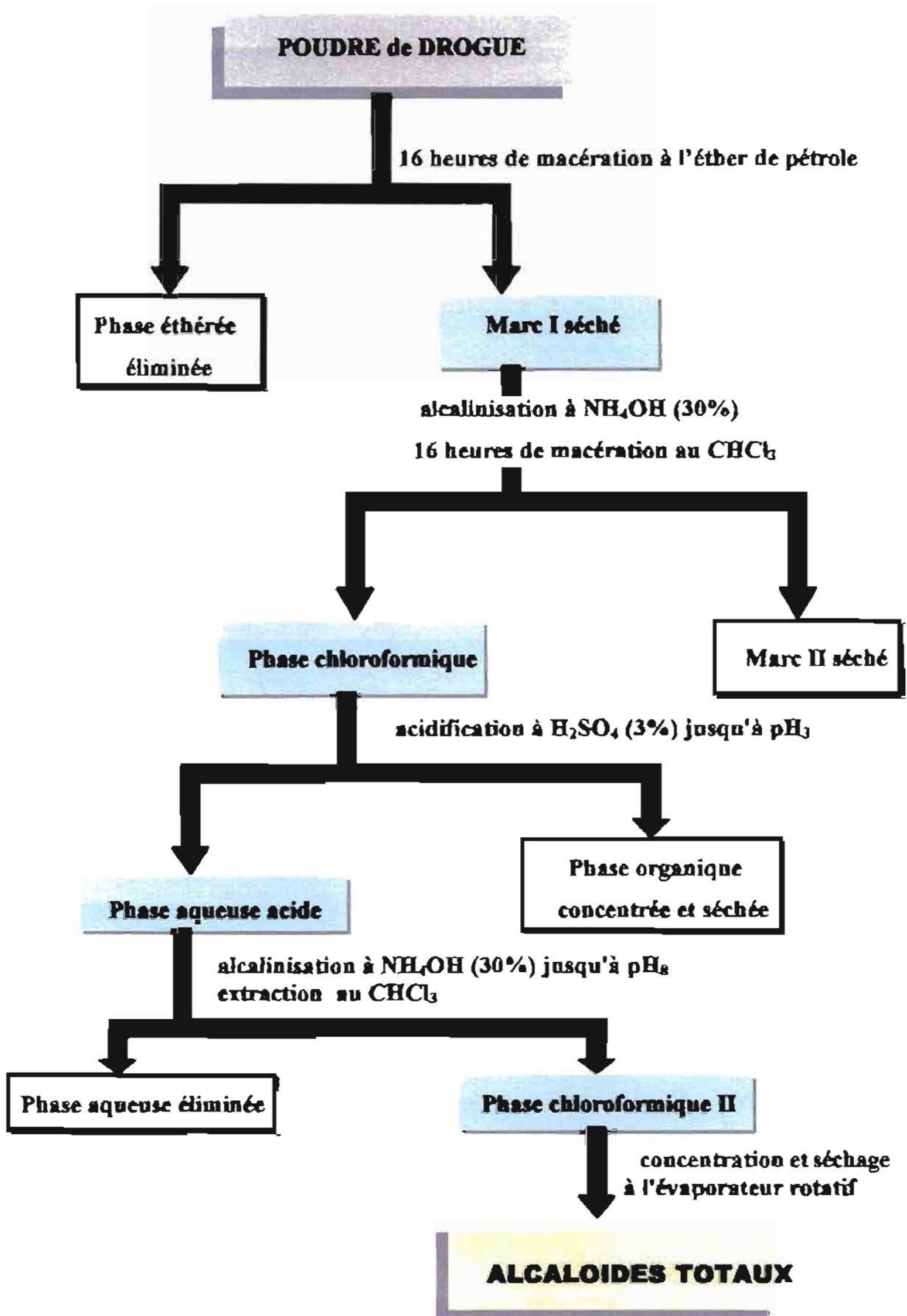


Fig. 27 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux

La réalisation de cette technique nécessite la présence d'un support, des solvants de migration de type pour analyse (RPE) et des révélateurs spécifiques. L'échantillon est dissout dans 1ml de solvant d'extraction. A l'aide d'une micro-seringue, on dispose 20ul de la solution sur le support (plaque de gel de silice) au niveau inférieur. Après séchage des dépôts, la plaque est placée dans une cuve contenant le solvant de migration. La migration est arrêtée lorsque le solvant atteint la ligne frontale. La plaque est séchée et révélée sous UV ou après pulvérisation de réactifs universels ou spécifiques (Tableau X).

**Tableau X : Systèmes chromatographiques utilisés au cours de l'étude pour la chromatographie analytique**

Support (Plaque)	Milieu de migration (solvant)
- Gel de silice 60F <sub>254</sub> (40-63 µm) Merck	- CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1) + 0,25 ml NH <sub>4</sub> OH - CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)
- Gel de silice greffée RP-18 F <sub>254</sub>	- MeOH -H <sub>2</sub> O (50 :50) - CHCl <sub>3</sub> - MeOH -H <sub>2</sub> O (40:15:5) - CHCl <sub>3</sub> -MeOH (95:5) - CHCl <sub>3</sub> - MeOH -H <sub>2</sub> O (80:20:2)

### 3.3 Isolement des molécules

La technique de chromatographie préparative est utilisée pour fractionner et isoler les molécules. Nous avons utilisé et adapté les techniques décrites par Rosset *et al.*, (1991) à nos échantillons.

#### 3.3.1 Chromatographie liquide préparative basse pression

- Appareil : Prepamatic chromatospac 10, Jobin-Yvon à pression axiale
- Colonne intégrée de longueur 50 cm et de diamètre 4 cm
- Pression de tassement du gel : 6 bars
- Pression d'élution de l'échantillon : 4 à 6 bars
- Phase stationnaire : gel de silice greffée Lichroprep RP-18 (25 à 40 µm) Merck

- Phase mobile d'élution en gradient par palier

### 3.3.2 Chromatographie préparative sur cartouche Sep-pak

- Colonne de diamètre 1 cm et de longueur 2 cm
- Pression manuelle à l'aide d'une seringue
- Phase stationnaire : gel de silice greffée RP-18
- Phase mobile en gradient par palier

### 3.3.3 Chromatographie préparative sur colonne ouverte (Tableau XI)

- colonne ouverte de diamètre 2,5 cm et de longueur variable
- Pression atmosphérique

**Tableau XI : Systèmes chromatographiques utilisés au cours de l'étude pour la chromatographie préparative**

Phase stationnaire	Eluant en mode isocratique
- Gel de silice 60F <sub>254</sub> (40-63 µm) Merck	- CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2) - MeOH pur
- Gel de sephadex LH-20	- CHCl <sub>3</sub> - MeOH -H <sub>2</sub> O (40:16:2) - CHCl <sub>3</sub> - MeOH -H <sub>2</sub> O (80:20:2) - AcOEt- MeOH -H <sub>2</sub> O (40:15:5)

Après le montage de la colonne, la phase stationnaire est lavée avec le solvant d'élution. L'échantillon à purifier est déposé en tête de colonne et élué avec la phase mobile au fur et à mesure tout en veillant à ne pas laisser sécher la phase stationnaire. Les fractions sont récupérées dans des tubes à hémolyse à raison de 1 à 4 ml par tube, l'élution est suivie par CCM. Les fractions identiques sont regroupées et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif, les phases aqueuses sont lyophilisées.

### 3.4 Elucidation structurale

L'élucidation structurale des molécules pures actives a été basée sur l'étude spectroscopique par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par Spectrométrie de Masse (SM).

#### 3.4.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

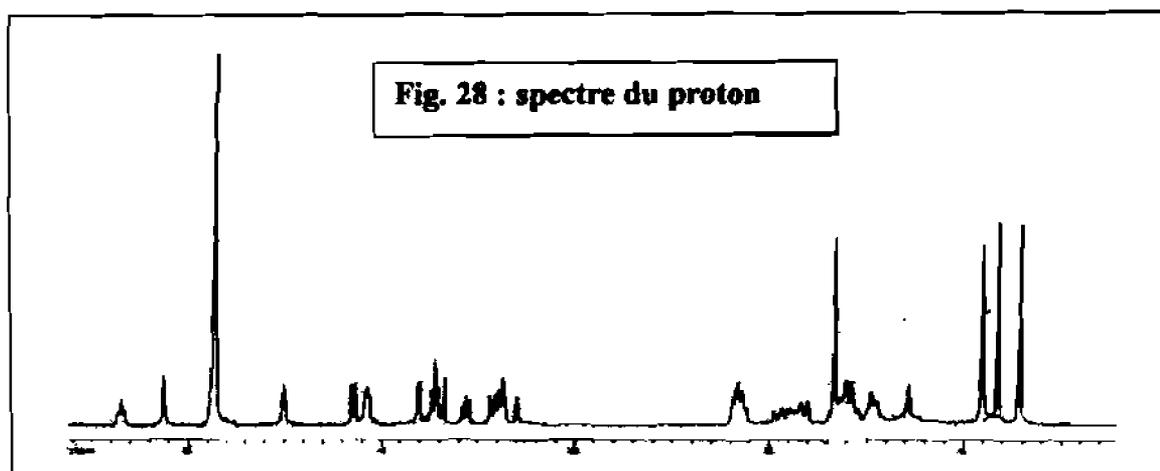
Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire ont été réalisés au Centre de RMN de la Faculté des Sciences de St Jérôme de Marseille sur un spectromètre Bruker AMX 400 (400,13 MHz, RMN  $H^1$  et 100,62 MHz, RMN  $C^{13}$ ) et Bruker DRX 500 (500,13 MHz, RMN  $H^1$  et 125,75 MHz, RMN  $C^{13}$ ). Les spectres ont été enregistrés dans  $CD_3OD$ . Les déplacements chimiques exprimés en  $\delta$  (ppm) ont été mesurés par rapport au signal du solvant pris comme référence et rapportés au signal du TMS (tétraméthylsilane), les constantes de couplage ( $J$ ) sont données en Hertz. Deux types de RMN sont utilisés : La RMN mono-dimensionnelle et la RMN bi-dimensionnelle

##### 3.4.1.1 RMN mono-dimensionnelle

Les spectres qui en résultent sont présentés sur un axe de repère.

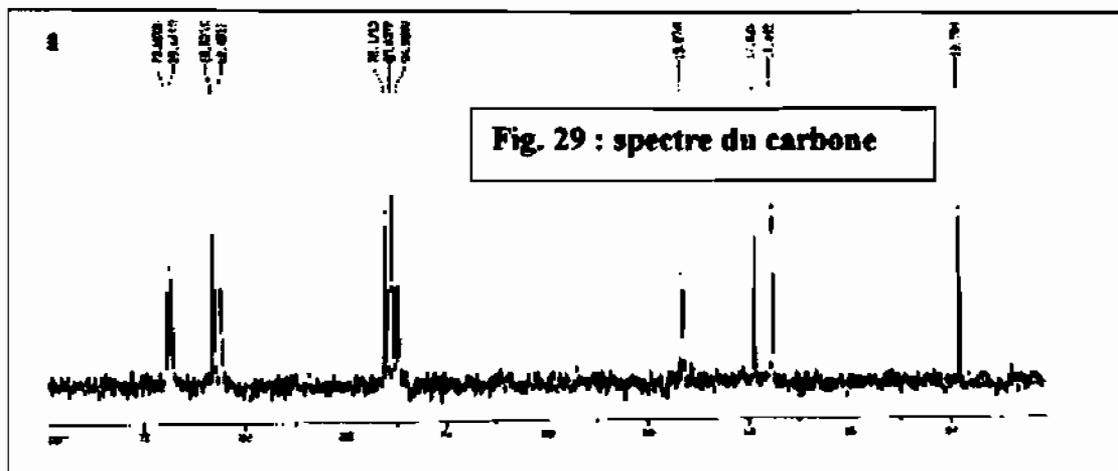
- Spectres du proton ( $^1H$ )

Les spectres réalisés dans ce cas permettent de déterminer les déplacements chimiques des protons exprimés en *ppm*, leurs multiplicités et leurs constantes de couplage (figure 28).



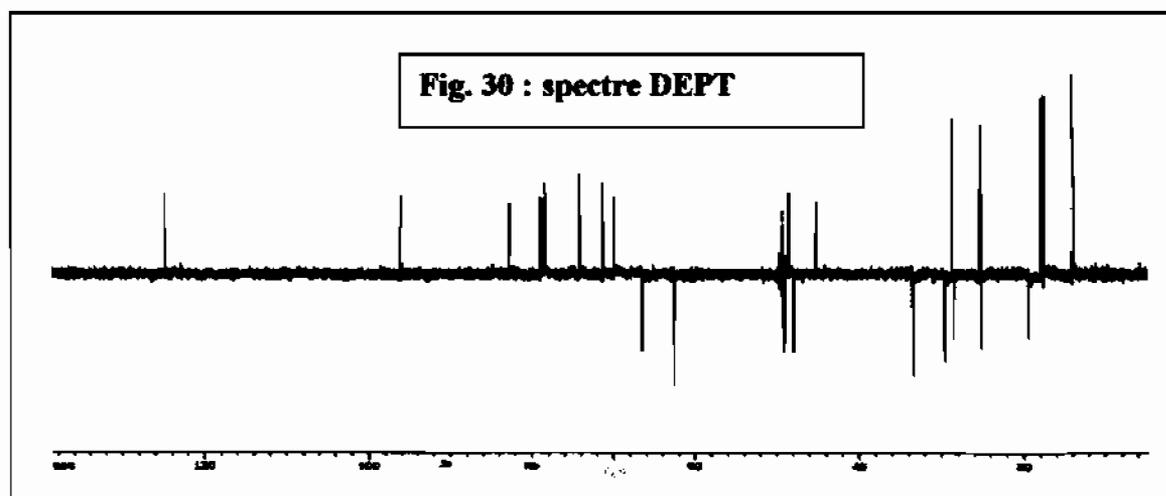
- Spectres du carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ )

Les spectres du  $^{13}\text{C}$  enregistrés dans le solvant  $\text{CD}_3\text{OD}$  permettent de déterminer le nombre total de carbones symbolisés par des pics en fonction de leurs déplacements chimiques. Ces déplacements chimiques sont exprimés en *ppm* permettant d'attribuer aux carbones des signaux caractéristiques (figure 29).



- Spectres DEPT

Les spectres DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) permettent de déterminer la nature de chaque carbone. On distinguera des carbones primaires, secondaires et tertiaires. Les carbones quaternaires ne figurent pas sur ces spectres du fait qu'ils ne portent pas de protons. Les spectres réalisés dans ce cas sont ceux de la DEPT-135 qui montrent des groupements  $\text{CH}_2$  qui sont inversés par rapport aux signaux des groupements  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_3$  (Droddrell et *al.*, 1982) (figure 30).



### 3.4.1.2 RMN bidimensionnelle

Les spectres résultant de cette technique, contrairement à ceux de la RMN monodimensionnelle, permettent de déterminer les structures moléculaires nouvelles. Trois types de RMN bidimensionnelle ont été réalisés.

- Spectres HMQC

Cette technique HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) permet d'établir la corrélation entre carbone-proton en mettant en évidence le couplage direct  $^1J_{C-H}$ . Les spectres permettent de connaître les carbones et les protons directement liés (Hurd et *al.*, 1991) (figure 31).

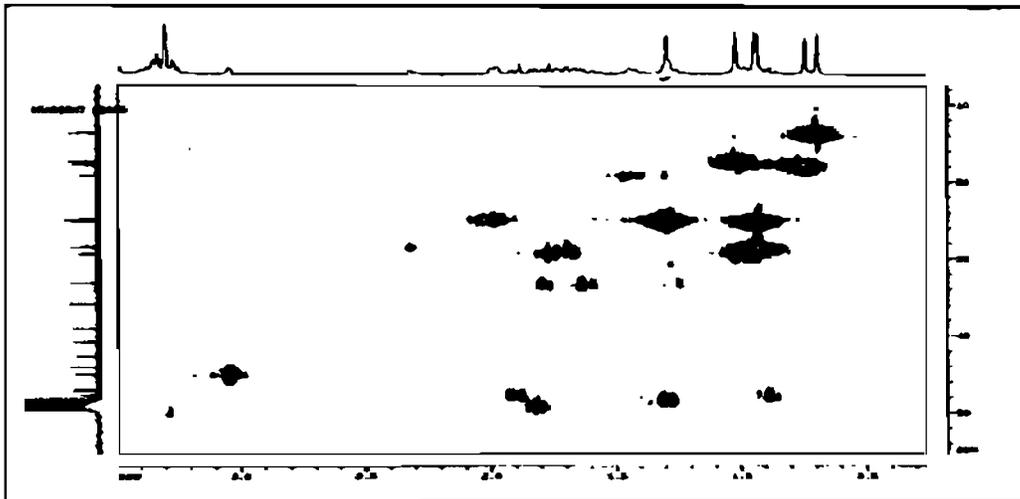


Fig. 31 : spectre HMQC

- Spectres HMBC

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) est la RMN qui donne les spectres permettant d'apprécier la corrélation carbone-proton longue distance. Dans ce cas, il s'agit des couplages entre le proton du carbone 1 et le carbone 2 ou 3 d'une molécule : on parle de couplages  $^2J$  ou  $^3J$  (Wilker et *al.*, 1993) (figure 32)

H - C - C correspond au couplage  $^2J$

H - C - C - C correspond au couplage  $^3J$

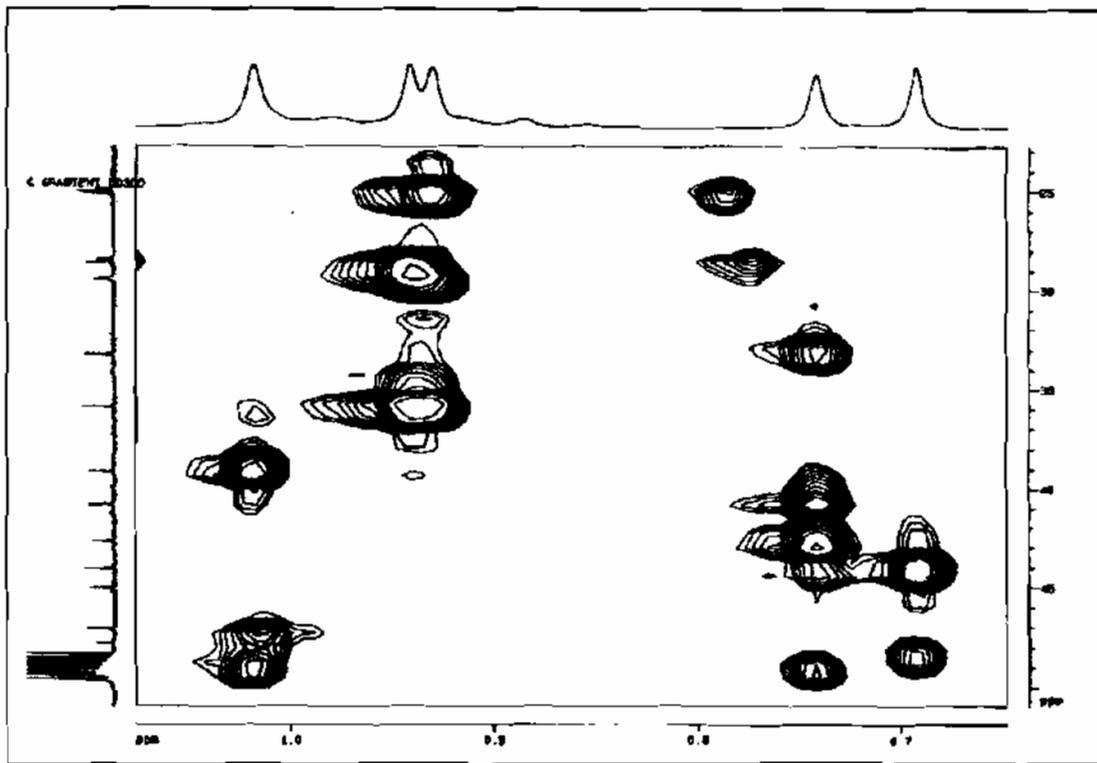


Fig. 32 : spectre HMBC

- Spectres COSY homonucléaire

L'expérience COSY (Correlation Spectroscopy) donne des spectres nous permettant de déterminer la corrélation proton-proton. On détermine ainsi la proximité entre protons le long d'une chaîne carbonée (Hurd et *al.*, 1990) (figure 33).

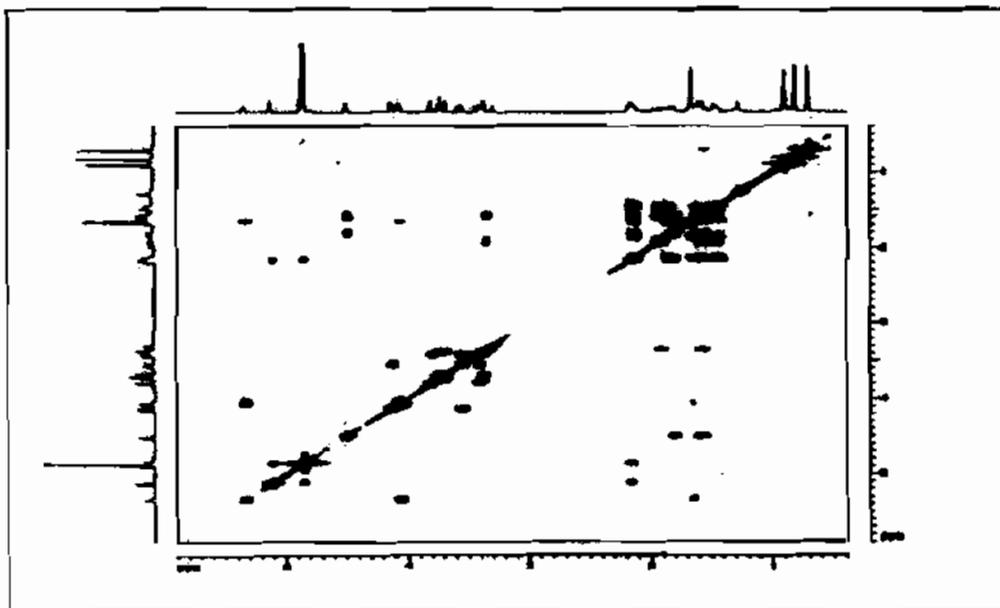


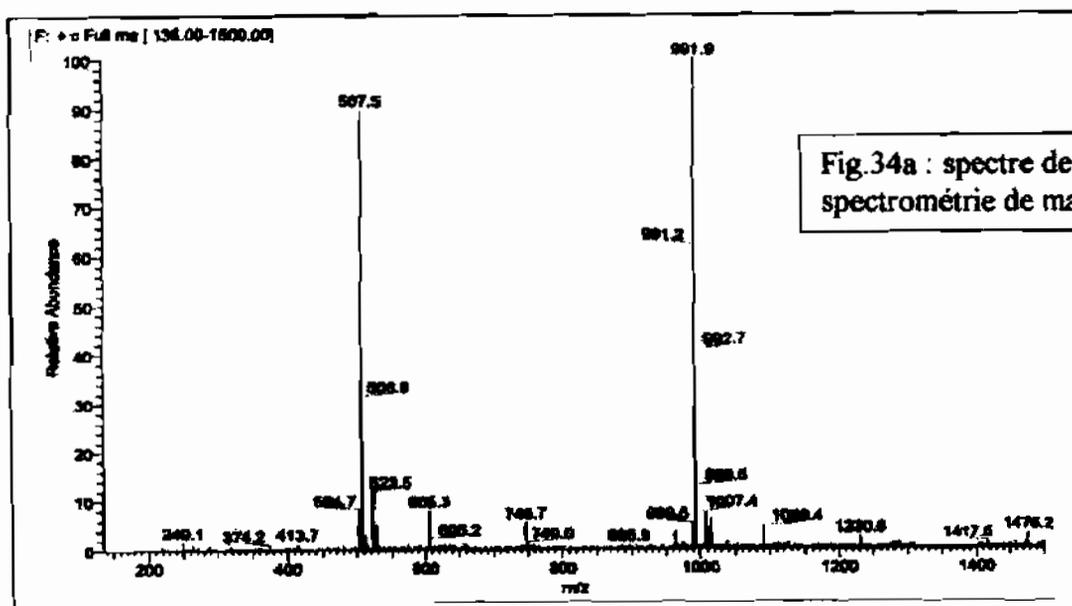
Fig. 33 : spectre Cosy homonucléaire

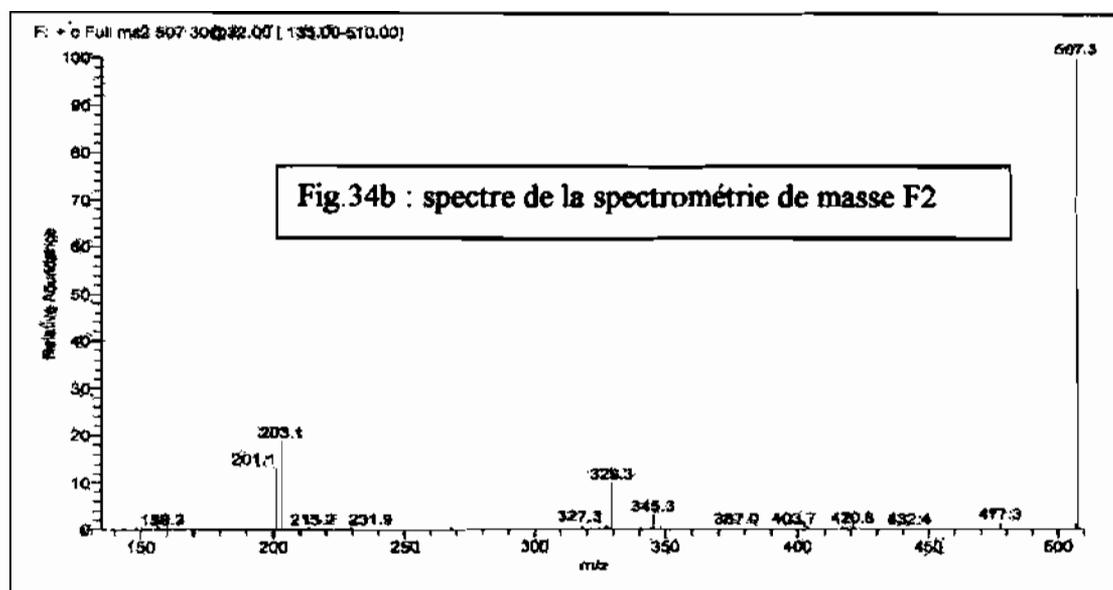
### 3.4.2 Spectrométrie de Masse (SM)

Les spectres de masse en électrospray ont été enregistrés en mode positif ou négatif (ESI+, ESI-) au laboratoire des Xénobiotiques (biochimie, Métabolisme, Toxicologie) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse en France. L'appareil utilisé est un spectromètre Ion Trap Finigan (Thermo Quest). Les échantillons ont été dilués dans un mélange eau/MeOH (1/1) et sont introduits dans l'appareil au débit de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Les voltages sont de 5 KV pour l'aiguille et 47 V pour la chaleur de transfert. Dans les expériences de MS/MS l'hélium a été utilisé comme gaz amortisseur de collision.

La HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) a été réalisée au laboratoire de spectrométrie de masse de l'Institut des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) sur un spectromètre de masse type MALDI-TOF (Voyager-DE STR; perSeptive Biosystems), la matrice est de l'acide gentisique.

La spectrométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne une accumulation d'énergie qui peut provoquer la rupture des liaisons chimiques de la molécule et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport de leur charge à leur masse,  $m/z$ . Les différents fragments chargés, ainsi produits, sont séparés dans un champ magnétique en fonction du rapport  $m/z$ . Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre de masse (figures 34a, 34b).





D'autres paramètres spectrométriques ont été mesurés pour confirmer les structures des molécules isolées. Il s'agit de :

→ **UV** : Les spectres UV ont été réalisés sur un spectrophotomètre Beckman DU 520.

→ **IR** : Les spectres IR ont été réalisés sur un spectromètre Nicolet 205XB FTIR (résolution  $4\text{ cm}^{-1}$ , 64 accumulations).

→ **Point de fusion** : Les points de fusion ont été réalisés sur un appareil Büchi Melting Point B-540.

→ **Pouvoir rotatoire** : Les pouvoirs rotatoires ont été réalisés sur un polarimètre Perkin Elmer 341 OROT.

**4.**

**ETUDE BIOLOGIQUE**

## **4.1 Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro***

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale correspond à la mise en contact *in vitro* ou *in vivo* des extraits végétaux (bruts ou purs) avec le *Plasmodium* afin de mesurer le degré de létalité ou d'inhibition de la croissance de ceux-ci (Trager *et al.*, 1997). Ce travail exige la présence du parasite, du milieu de culture et des extraits végétaux.

### **4.1.1 Matériel biologique**

#### **4.1.1.1 Souches de parasites**

Les souches de parasites sont les espèces *Plasmodium falciparum*, espèces responsable de la majorité des cas de paludisme en Afrique (Esposito *et al.*, 1988 ; Snow *et al.*, 1997). Elles sont isolées et maintenues en culture continue selon la technique de Trager (1976). Elles peuvent être obtenues d'un prélèvement de sang sur des patients ou des porteurs sains. Les premières cultures *in vitro* de *P. falciparum* ont été l'œuvre de Bass en 1912. Muclens en 1924, s'est inspiré de la méthodologie de Bass pour décrire l'action de la quinine sur la croissance des parasites. C'est ainsi que de 1945 à 1976, de nombreux travaux ont permis la connaissance du métabolisme du parasite (Trager *et al.*, 1950 ; Geiman *et al.*, 1996 ; Homewood *et al.*, 1997).

En 1976, Haynes améliore le milieu de culture milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Media 1640). Cette mise au point du milieu RPMI a permis à Trager d'améliorer les conditions de culture des parasites.

##### **4.1.1.1.1 Technique de culture de Trager et Jensen**

Les travaux précédents ont permis à Trager et Jensen de réaliser en 1976 la prolifération de *Plasmodium falciparum* dans un milieu semi-synthétique (Trager *et al.*, 1976, 1987, 1997). La première lignée de *P. falciparum* ayant proliférée de façon continue, a été établie avec le système de flux continu. Il consistait à mettre les globules rouges en sédimentation dans un récipient à fond plat. Le flux de mélange gazeux est constitué de 5% de CO<sub>2</sub>, 3% de O<sub>2</sub>. Le renouvellement du milieu se faisait par flux sans interruption à faible débit pour éviter la résuspension des hématies. Les globules rouges neufs sont apportés tous les trois jours environ.

Cette technique a été améliorée par Jensen en 1978 avec la technique de la « boîte de Pétri » en cloche à bougie. Les cultures sont placées dans une jarre à anaérobiose dans laquelle la

combustion d'une bougie assure l'élimination de O<sub>2</sub> et l'instauration du CO<sub>2</sub>. Le renouvellement du milieu se faisait manuellement.

#### 4.1.1.1.2 Conditions de culture

Plusieurs paramètres interviennent dans le maintien des parasites en culture continue.

- **Le pH** : le pH du milieu de culture doit être maintenu à une valeur physiologique (autour de 7). Cela est rendu possible par la combinaison du système CO<sub>2</sub>-bicarbonate et du tampon Hepes en Tes ou Bes (Geiman et *al.*, 1966). Ce complexe permet d'une part de diminuer l'acidose due au métabolisme du parasite et d'autre part de réduire l'alcalinisation initiale qui survient dans les premières heures par dégagement de CO<sub>2</sub>.
- **Le mélange gazeux** : c'est Scherbel et collaborateurs, en 1979 qui ont démontré la nécessité de réduire le taux d'O<sub>2</sub> présent dans l'incubateur en fonction des seuils 0,5-10% d'O<sub>2</sub> permettant la prolifération des parasites, qui s'arrêterait en anaérobiose stricte.
- **Les hématies** : les hématies humaines sont celles indispensables à la croissance de *P. falciparum*. Elles doivent cependant provenir des individus des groupes sanguins A+ ou O+. Ces derniers ne doivent pas être sous traitements antipaludiques et non porteurs d'une hémoglobinopathie S, C ou E.
- **Le sérum** : au milieu de culture, il est nécessaire d'ajouter du sérum humain compatible avec les globules rouges utilisés (Trager et *al.*, 1994). Il est préférable d'utiliser un pool de sérums humains compatibles. D'autres sérums d'origine animale (caprin, porcin, ovin, bovin) ont fait l'objet de tests mais se sont avérés moins efficaces (Butcher et *al.*, 1979 ; Chen et *al.*, 1981 ; Siddiqui et *al.*, 1977, 1980, Ofula et *al.*, 1993). Des produits synthétiques comme Nutridoma SR et la sérum-albumine bovine enrichie de lipides sont utilisés. Ils sont connus sous le nom d'albumax I (Flores et *al.*, 1997 ; Ringwald et *al.*, 1999).
- **Milieu de culture** : le milieu RPMI-1640 est classique pour les cultures cellulaires. La composition est la suivante selon Moore et collaborateurs (1967) (annexe 3). A ce milieu on ajoute le Bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) et du tampon Hepes. L'addition d'antibiotique (néomycine ou gentamycine) limite le risque de contamination de la culture.

#### 4.1.1.2 Synchronisation des parasites

La prolifération du parasite *in vitro* est asynchrone, si bien que tous les stades érythrocytaires peuvent être présents simultanément. On retrouve donc des formes trophozoïtes jeunes et âgés, des schizontes, des corps en rosace et parfois des gamétocytes. Pour l'évaluation de l'activité antiplasmodiale, il est souvent nécessaire de disposer de parasites au même stade évolutif (culture synchrone). Les différentes méthodes décrites sont basées soit sur la purification des schizontes, soit sur la destruction des éléments mûrs.

- La purification est basée sur la différence de masse existant entre les hématies saines ou parasitées par les trophozoïtes jeunes et celles contenant les schizontes. En ajoutant de la gélatine au milieu de culture, les schizontes mûrs passent dans le surnageant (Jensen *et al.*, 1979 ; Pasvol *et al.*, 1978 ; Reese *et al.*, 1979).

- La destruction des éléments mûrs : Sous l'action du sorbitol isotonique ou du mannitol sur les cultures, toutes les hématies parasitées par des formes âgées sont lysées en raison de la grande perméabilité de leur membrane. Celles renfermant les formes jeunes et dont la membrane est moins perméable seront conservées.

#### 4.1.1.3 Conservation des parasites

La conservation du parasite se fait par congélation. Plusieurs mélanges cryoprotecteurs peuvent être utilisés. Ils sont le plus souvent à base de glycérol ou de diméthylsulfoxyde (DMSO). Nous avons utilisé un liquide de congélation composé de 27% de glycérol, 10ml de PBS 10x, 1,6g de lactate de sodium, 30mg de chlorure de potassium, QSP 100ml d'EUP stérile. % de sorbitol et 0,65% de NaCl. Après centrifugation, le culot globulaire parasité est repris dans le liquide cryoprotecteur stérile à raison de 3 volumes globulaires et 5 volumes de cryoprotecteur et réparti dans les cryotubes. La conservation se fait dans l'azote liquide à (-196°C) après un refroidissement par paliers.

La décongélation doit être rapide. Les hématies sont rincées successivement avec une solution stérile de NaCl à 3,5% puis avec du milieu de culture. Elles sont par la suite incubées dans un milieu neuf en présence de globules rouges fraîchement lavés.

#### 4.1.2 Techniques de mesure de l'inhibition de la croissance des parasites

Plusieurs techniques sont mises au point pour mesurer l'inhibition de la croissance des parasites.

#### **4.1.2.1 Mesure de l'inhibition de la maturation**

Cette technique de microtest permet de mesurer l'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes (Rieckman et *al.*, 1978). Elle consiste à mettre les parasites jeunes d'une culture synchrone en contact le produit à tester. Après 24 heures d'incubation, il suffit d'évaluer le nombre de schizontes sur une goutte épaisse. Cette technique a permis de rechercher les souches pharmaco-résistantes grâce à l'utilisation des plaques prétraitées distribuées par l'OMS.

#### **4.1.2.2 Mesure de l'inhibition de la prolifération**

Cette technique permet de mettre en évidence non seulement l'action du produit à tester sur la maturation des trophozoïtes en schizontes, mais également sur la pénétration des mérozoïtes dans les hématies neuves et leur transformation en trophozoïtes dans les hématies neuves et leur transformation en trophozoïtes. Le produit à tester est mis en contact, aux concentrations choisies, avec la suspension d'hématies parasitées (Polonsky et *al.*, 1994 ; Druilhe et *al.*, 1981 ; Trager et *al.*, 1997). Après 48 heures d'incubation, le pourcentage de la parasitémie est évalué par rapport à une culture témoin effectuée dans les mêmes conditions sans produit à tester. Pour notre étude c'est cette technique qui a été utilisée.

### **4.2 Tests antiparasitaires sur les souches de laboratoire**

Ces tests ont été réalisés dans le laboratoire de parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Marseille (Université de la Méditerranée, France)

#### **4.2.1 Les souches de *Plasmodium falciparum***

Les souches de laboratoire, utilisées pour les tests parasitologiques ont été obtenues de l'unité de parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (Parc du Pharo à Marseille). Il s'agit des souches chloroquino-sensibles 3D7 et des souches chloroquino-résistantes W2. Au laboratoire, elles sont maintenues en culture selon la technique de Trager et collaborateurs (1976).

#### **4.2.2 Culture continue de *Plasmodium falciparum***

Les souches obtenues aux stade érythrocytaires sont cultivées dans un milieu à composants d'origine humaine (sérum et globules rouges). La culture s'effectue dans des

conditions rigoureusement stériles : matériel (flacons pour culture cellulaire, pipettes, cônes etc.) et atmosphère stérile (hotte à flux laminaire vertical recyclé, cytair Flufrance). Pour maintenir les parasites en croissance un certain nombre de préparations préalables sont nécessaires.

#### **4.2.2.1 Préparation du sérum**

Le sérum est un élément indispensable à la croissance des parasites. Le sérum du groupe A+ est obtenu à partir d'un pool de plasma A+ fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Marseille. Pour trois poches de 500ml de plasma, on ajoute 5ml de CaCl<sub>2</sub> molaire stérile. Le mélange est fait dans un flacon stérile et mis à congélation pendant 24 heures dans une étuve à 37°C. Le caillot obtenu après incubation est découpé en plusieurs morceaux qu'on laisse exsuder à +4°C pendant 24 heures. L'exsudat est centrifugé à 2000 tours/minute pendant 10 minutes, permettant ainsi de récupérer le sérum comme surnageant. Ce dernier est reparti dans des tubes stériles de 10 ml puis congelé à -20°C. Le sérum congelé peut se conserver pendant plusieurs mois.

#### **4.2.2.2 Préparation du milieu de culture RPS10**

Ce milieu est celui qui contient tous les facteurs de croissance nécessaires aux parasites. Il est préparé avec du RPMI-1640 commercialisé sous forme lyophilisée stérile (Eurobio). Pour un flacon, le lyophilisat est de 10,4g.

Cette quantité de lyophilisat est dissout dans 1 litre d'eau distillée stérile. A ce milieu on ajoute 10% de sérum. Lorsqu'il s'agit des souches nouvellement décongelées, on peut ajouter 15% de sérum. Le milieu est ensuite filtré sur un filtre millipore 0,22µm, reparti dans les flacons de 250ml pour culture cellulaire. Il est conservé soit au congélateur à (-20°C) soit une semaine dans une chambre froide à +4°C.

#### **4.2.2.3 Préparation du sang non parasité (SNP)**

Le sang fourni par l'EFS de Marseille est prélevé chez des personnes du groupe sanguin A+, dans des tubes stériles contenant de l'anticoagulant. Après homogénéisation, le contenu est mis en décantation pendant 24 heures à +4°C. Les hématies décantées sont récupérées et centrifugées à 1800 tours/minute pendant 7 à 10 minutes. Le plasma et la couche leucocytaire blanchâtre sont éliminés. Les hématies sont par la suite soumises à une série de lavages avec la solution RPMI-1640 sans sérum. Après le dernier lavage, le culot est repris dans un égal volume du milieu RPS10.

#### **4.2.2.4 Préparation du sang parasité (SP)**

Le maintien des parasites en culture nécessite un renouvellement du milieu toutes les 24 heures. Le surnageant du contenu des flacons est éliminé, un frottis est réalisé sur le culot globulaire homogénéisé permettant d'évaluer la parasitémie après fixation au méthanol et coloration au Giemsa. Dans le cas où la parasitémie est <5%, le surnageant est remplacé par un volume égal du milieu de culture complet (RPS10). Si la parasitémie est >5%, une dilution est réalisée avec du sang non parasité de manière à ramener celle-ci à 2 ou 3%. Le sang parasité est gardé dans des flasques de culture à bouchon ventilé et placé à 37°C dans une étuve humide à 90% d'humidité, 6% de CO<sub>2</sub> et 10% de N<sub>2</sub> (Water-Jacketed Incubator Automatic CO<sub>2</sub>-model 1600).

Pour nos essais la parasitémie est ajustée à 2% avec des hématies fraîchement lavées.

#### **4.2.3 Evaluation de l'activité antiplasmodiale des produits végétaux**

Elle a été faite selon le schéma général suivant (figure 35)

##### **4.2.3.1 Préparation des produits végétaux**

Les produits à tester sont solubilisés dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO). Les solutions mères sont préparées à la concentration de 2mg/ml dans du DMSO sauf dans le cas des extraits aqueux où la solution mère a été préparée à 4mg/ml. Elles sont filtrées avant toute autre utilisation sur des filtres millipores (0,2 µm). Des dilutions sont ensuite réalisées dans le milieu de culture des parasites afin d'obtenir les concentrations choisies. Ces concentrations sont exprimées en µg/ml. Pour les extraits bruts chloroformiques, méthanoliques et hydrométhanoliques, les concentrations testées ont été de 4 et 10µg/ml. Les concentrations de l'extrait aqueux ont été de 50-100-250 et 500µg/ml. Les produits purs isolés ont été testés à des concentrations 0,2 - 0,4 - 1 - 2- 4 et 10µg/ml.

##### **4.2.3.2 Culture des parasites**

La quantité nécessaire de sang parasité est prélevée et mélangée au milieu de culture contenant l'extrait végétal de façon à obtenir un hématoците de 2% (14µl de sang parasité pour 700µl de milieu ). Un témoin positif est préparé dans les mêmes conditions.

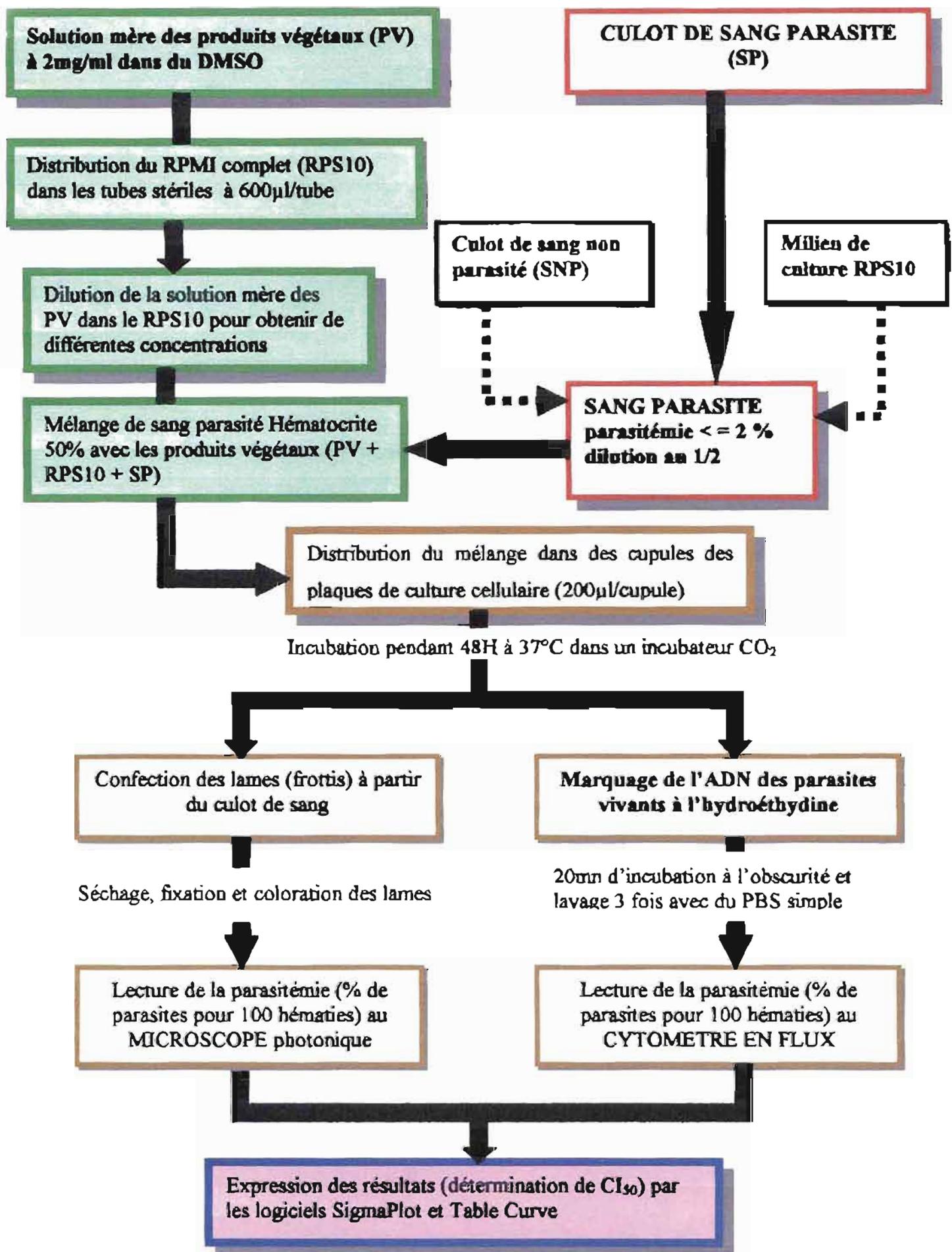


Fig. 35 : schéma général des tests antiparasitaires

Ce témoin permet d'apprécier la croissance des parasites puisqu'il ne contient pas de produit à tester. Le degré de cette croissance permet d'évaluer par la suite la capacité des produits testés à inhiber la croissance des parasites. Un témoin négatif (sang non parasité) est nécessaire pour la lecture en cytométrie de flux. La culture est effectuée dans des plaques de cultures cellulaires en polystyrène à 96 cupules (Plaque Nunc). Pour chaque concentration, deux cupules sont utilisées à raison de 200µl/cupule. Les deux cupules serviront à la lecture au cytomètre. La plaque est ensuite placée dans un incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 48 heures sans renouvellement de milieu.

#### **4.2.3.3 Lecture de la parasitémie**

L'évaluation de la parasitémie a été faite par la technique de cytométrie en flux (Reinders *et al.*, 1995 ; Van der Heyde *et al.*, 1995).

Après 48 heures d'incubation, le surnageant est aspiré et remplacé par du PBS contenant 1% d'hydroéthidine qui est métabolisé par les parasites vivants en bromure d'éthidine, sonde fluorescente de l'ADN (Wyatt *et al.*, 1991). Une nouvelle incubation de 20 minutes à 37°C est effectuée. Le contenu des cupules est transféré dans des tubes correspondants puis est lavé trois fois avec du PBS simple. Le culot est repris ensuite dans 1ml de PBS simple et homogénéisé. 40µl de cette solution sont mélangés dans 1ml de PBS simple contenu dans un tube Falcon et amené à la lecture au cytomètre.

Cette lecture est basée sur la détection de la fluorescence du marqueur fixé à l'ADN du parasite. Un cytogramme prenant en compte la fluorescence et la taille, permet de différencier les hématies parasitées des hématies saines. Le système informatique couplé à l'appareil (Cytomètre de flux de type FacSort (Becton Dickinson)), permet d'obtenir le pourcentage d'hématies parasitées sur une lecture de 10 000 cellules.

#### **4.2.3.4 Expression des résultats**

Cette étape consiste à déterminer la CI<sub>50</sub> (Concentration Inhibitrice de 50% de la prolifération des parasites). Deux logiciels informatiques sont utilisés à cet égard.

- le logiciel SigmaPlot : Il est utilisé pour entrer les données, qui correspondent aux pourcentages de la parasitémie lus par le cytomètre après 48 heures d'incubation et pour chaque concentration donnée. Ces valeurs sont saisies après avoir soustrait celles du témoin négatif. La valeur du témoin positif correspond à 100% de la prolifération des parasites.

- Le logiciel Table Curve 2D Jandel Scientific version 3.0 est utilisé pour tracer la courbe de la concentration du produit en fonction de la parasitémie (figure 4). Une régression non linéaire établie entre le pourcentage d'hématies parasitées par rapport au témoin et les différentes concentrations des extraits permet de déterminer cette  $CI_{50}$ .

Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour chaque modèle. Le coefficient de corrélation a été calculé.

### **4.3 Tests antiparasitaires sur les souches sauvages**

Ces tests ont été réalisés dans le laboratoire d'immuno-parasitologie du centre National de Recherche et de Formation sur la Paludisme (CNRFP) à Ouagadougou (Burkina Faso) et au Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN). Pour la culture des parasites, nous avons utilisé le principe basé sur l'inhibition de la prolifération des parasites selon Trager et collaborateurs (Trager *et al.*, 1976, 1987).

#### **4.3.1 Préparation des concentrations des extraits végétaux**

Les plaques de culture cellulaire (Nunk) à 96 cupules ont été utilisées. Les extraits alcaloïdes totaux ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à raison de 1mg/ml. La solution a été filtrée au filtre millipore 0,22mm. A partir de cette solution, des dilutions ont été faites dans les cupules de la plaque de culture contenant la solution de RPMI 1640 (Sigma Chemical CO) à raison de 200µl par cupule. Cette séance de dilution faite sous une hotte à flux laminaire (Bioblock-scientific type S-2000 1-8) dans des conditions de manipulation stérile a permis d'obtenir des concentrations différentes des extraits à tester. Les plaques sont ensuite placées à l'étuve à 45 °C afin d'évaporer la solution de RPMI 1640 sans les extraits.

#### **4.3.2 Souches de parasites**

Il s'agit des souches de *Plasmodium falciparum* prélevés chez des individus vivants dans les milieux ruraux. Il s'agit des individus symptomatiques ou asymptomatiques du paludisme qui ne sont pas sous pression médicamenteuse contre le paludisme. Le prélèvement se fait le matin du jour des tests antiparasitaire. Les parasites ne sont donc pas maintenus en culture continue. Ces souches ont été obtenues par prélèvement veineux sanguins chez des individus de moins de 4 à 10 ans vivant dans un

village (Wavougé) situé à environ 40 Km au nord de Ouagadougou, la capitale du Burkina Faso. Ces enfants ont été choisis parce qu'ils font partie de la catégorie d'individus dont la prémunition au paludisme n'est pas trop développée. Par conséquent, il est facile d'avoir des individus qui hébergent les parasites du paludisme.

Pour notre étude 25 enfants ont été prélevés. Le sang a été récupéré dans un tube stérile (venoject) contenant de l'anticoagulant (Edta K3E). Les tubes sont gardés à la température ambiante et transportés au laboratoire pour la culture.

#### **4.3.3 Culture des parasites**

Sous une hotte stérile, le sang obtenu des prélèvements veineux est transvasé dans des tubes stériles de 15 ml (Falcon). Pour chaque sang, une goutte épaisse et un frottis sont élaborés. Le frottis est fixé avec du méthanol 96%. Les lames sont séchées et colorées au Giemsa 5% pendant 45 minutes. La lecture est faite au microscope photonique au grossissement x 100 (Olympus model Ch20 BIMF200). Les parasitémies supérieures à 0,5% ont été retenues pour les tests. Ainsi, 6 isolats ont été concernés par l'étude. Ces 6 isolats ont été centrifugés à 1600trs/minute pendant 5 minutes à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Sigma Laborzentrifugen 4 K15 Bioblock). La fine couche blanche entre le culot de sang et le sérum est éliminée. Le sérum est récupéré. Le culot est résuspendu dans du RPMI 1640 simple et centrifugé à 1600trs/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et remplacé dans la même quantité de RPMI 1640. Le processus est répété 3 fois pour chaque isolat. Le culot de chaque isolat est mis en suspension dans du RPS10 (RPMI 1640 + sérum 10%) pour obtenir un hématocrite de 2% (1ml de culot dans 50 ml de RPS10). La solution sanguine est distribuée dans les cupules de la plaque de culture préparée contenant les extraits à raison de 200µl/ml (Moreno, 2001). Des cupules ne contenant pas d'extrait ont servi de témoins positifs. Les plaques sont ensuite incubées dans un dessiccateur contenant de l'eau. Une bougie a été allumée au moment de l'incubation afin d'éliminer l'oxygène et créer un milieu à CO<sub>2</sub>. Le dessiccateur est placé à la température ambiante du laboratoire pendant 48 heures.

#### **4.3.4 Evaluation de la parasitémie**

Après 48 heures d'incubation, les plaques sont sorties, le surnageant est éliminé et le culot est utilisé pour faire des frottis. Les frottis sont fixés au méthanol 96% et séchés. La coloration est faite au Giemsa 5% pendant 45 minutes. Les lames sont ensuite lues au microscope à l'objectif x 100. En considérant le nombre estimatif de globules rouges par

champ, le nombre de champs et le nombre total de parasites observés, on a déterminé le pourcentage de la parasitémie.

#### **4.3.5 Expression des résultats**

L'expression des résultats basée sur la détermination de la  $CI_{50}$ , a été faite selon le même procédé que celui appliqué pour les souches de laboratoire (voir 4.2.3.4).

## **Chapitre. III**

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## 1. Enquête ethnobotanique et choix des plantes

Lors de l'enquête réalisée dans la province de Kadiogo en 1999, particulièrement dans la ville de Ouagadougou, 44 plantes ont été recensées. Parmi les 44 plantes, *Cassia siamea*, *Fadogia agrestis* et *Terminalia macroptera* étaient les favorites parce qu'elles étaient les plus citées et les moins étudiées sur le plan chimique et pharmacologique. *Cassia siamea* (citée 11 fois), a été choisi sur la base des tests pharmacologiques faits sur les extraits bruts en 1989 et qui avaient donné une inhibition de 100% de la croissance des parasites à 30µg/ml. Le choix de *Terminalia macroptera* (citée 7 fois) a été basé sur le fait qu'elle est beaucoup utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies infectieuses (Baba-moussa, 1999). *Fadogia agrestis* (citée 8) est une plante qui n'a jamais fait l'objet d'étude, ce qui a motivé son choix.

Au cours de la deuxième enquête effectuée en 2000, 141 plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso particulièrement dans la zone de Bobo Dioulasso, ont été recensées. L'inventaire de ces plantes révèle que 3 espèces sont très souvent utilisées car elles sont les plus citées. Il s'agit de *Pavetta crassipes* qui a été citée 14 fois, 12 fois pour *Acanthospermum hispidum* et pour *Crossopteryx febrifuga*. Par ailleurs une plante citée 4 fois a été retenue pour notre étude. Il s'agit de *Ficus sycomorus*. Son inclusion a été motivée par des informations données un forestier. Il a rapporté que les feuilles de la plante contenaient de la vitamine A et que les écorces de tronc contenaient de la vitamine C qui favorisait la fixation du calcium dans le cas du paludisme grave.

Le travail ethnobotanique a été effectué dans la ville de Ouagadougou, dans la ville de Bobo Dioulasso et dans 5 villages environnants de Bobo Dioulasso, auprès de tradithérapeutes, des herboristes, des phytothérapeutes. Le but du travail était d'identifier les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour soigner le paludisme. Il a consisté à poser des questions aux personnes rencontrées sur les plantes qu'ils connaissaient et qui traitaient le paludisme en milieu traditionnel. Certains nous citaient des plantes alors que d'autres nous renvoyaient fouiller dans des documents des centres de documentations qu'ils nous indiquaient.

Au total 185 informations ont été obtenues. Sur l'ensemble des informations recueillies lors des deux enquêtes ethnobotaniques et suite à une recherche bibliographique, nous avons retenu sept plantes appartenant à cinq familles

différentes (tableau XII). Elles ont été retenues selon les critères de sélection suivants: i) pas d'étude clinique ou pharmacologique approfondie sur la plante; ii) plantes les plus fréquemment citées par les personnes rencontrées lors de l'enquête ethnobotanique. Les plantes retenues à l'issue des deux enquêtes ont été récoltées en fonction des parties utilisées dans la pharmacopée et référencées

**Tableau XII : Plantes retenues pour les études phytochimiques et pharmacologiques préliminaires**

Nom de la plante	Famille	Partie utilisée	référence
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC	<i>Asteraceae</i>	Tiges feuillées	BM-ah00
<i>Cassia siamea</i> Lam	<i>Caesalpinaceae</i>	feuilles	BM-cs99
<i>Crossopteryx febrifuga</i> (AFZ. Ex G. Don) Benth	<i>Rubiaceae</i>	feuilles	BM-cf00
<i>Fadogia agrestis</i> Schweinf. Ex Hiern	<i>Rubiaceae</i>	feuilles	BM-fa99
<i>Ficus sycomorus</i> L.	<i>Moraceae</i>	feuilles/ écorces de tronc	BM-fs00
<i>Pavetta crassipes</i> K. Schum	<i>Rubiaceae</i>	feuilles	BM-pc00
<i>Terminalia macroptera</i> Guill. et Perr	<i>Combretaceae</i>	écorces de racines	BM-tm99

Les informations collectées lors des enquêtes ont montré que les préparations traditionnelles de ces 7 plantes sont des décoctés. Le matériel végétal est utilisé frais ou sec. La préparation dure 3 heures maximum. Le traitement consiste à boire le décocté 1 à 2 fois par jour pour les enfants et 3 à 4 fois par jour pour les adultes. Les doses sont fonction de l'âge. Ce traitement est accompagné de bain corporel. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison. En général, lorsque le traitement dépasse trois à sept jours sans amélioration, on peut avoir recours à un autre traitement utilisant une autre plante. Les résultats obtenus sur ces plantes sont consignés dans le tableau XIII.

**Tableau XIII : Plantes les plus utilisées dans la pharmacopée traditionnelle selon les deux enquêtes menées**

Nom de la plante	Nbre (%) de citation	groupes ethniques	Date de l'enquête	Date de récolte	État/ préparation	Mode d'administration
<i>Acanthospermum hipidum</i> DC	12 (8,51%)	M, B, Da	12/2000	12/2000	*F/S/D	Bain corporel, voie orale
<i>Cassia siamea</i> Lam	11 (7,80%)	M, B	11/1999	12/1999	*F/S/D	Bain corporel, voie orale
<i>Crossopteryx febrifuga</i> (AFZ. Ex G. Don) Benth	12 (8,51%)	B, Da, Di, M	12/2000	12/2000	*F/S/D	Bain corporel, voie orale, bain de vapeur
<i>Fadogia agrestis</i> Schweinf. Ex Hiern	8 (5,67%)	Di, B	11/1999	12/1999	*F/S/D	Bain corporel, voie orale
<i>Ficus sycomorus</i> L	5 (3,54%)	M, B	12/2000	12/2000	*F/S/D	Bain corporel, voie orale, bain de vapeur
<i>Pavetta crassipes</i> K. Schum	14 (9,92%)	B, Da, Di, M,	12/2000	12/2000	*F/S/D	Bain corporel, voie orale
<i>Terminalia macroptera</i> Guill. et Perr.	7 (4,96%)	M, B	11/1999	12/1999	*F/S/D	Bain corporel, voie orale

\*F/S/D: frais/sec/décoction, B: Bobo, M: Mossi, Da: Dafin, Di: Dioula

L'étude bibliographique rapporte des résultats ethnobotaniques similaires précédents ont montré l'usage traditionnel de certaines de ces plantes. C'est ainsi qu'une étude faite au Ghana a confirmé la large utilisation de *P. crassipes* en milieu traditionnel pour traiter la fièvre, les troubles respiratoires (Amos et al., 1998 ; Irvine et al., 1961, Gbeassor et al., 1989). *Terminalia macroptera* est une espèce de la famille des Combretaceae qui est beaucoup utilisée en médecine traditionnelle contre les affections antibactériennes (Baba-moussa et al., 1999 ; Jurgen et al., 2001 ; Silva et al., 1997).

## 2. Etudes phytochimiques

### 2.1 Extraits bruts

Le travail phytochimique préliminaire que nous avons effectué à partir des extraits bruts des sept plantes (*Cassia siamea*, *Fadogia agrestis*, *Terminalia macroptera*, *Pavetta crassipes*, *Acanthospermum hispidum*, *Ficus sycomorus*, *Crossopteryx febrifuga*) nous a permis de mettre en évidence les composés principaux présents dans chaque extrait. Nous remarquons que *Pavetta crassipes*, *Acanthospermum hispidum* sont les seules à contenir des alcaloïdes. Des composés terpéniques ont été également mis en évidence. Les composés majoritaires (Tableau XIV).

**Tableau XIV: Résultats des tests préliminaires phytochimiques des extraits bruts**

Plantes	composés chimiques
<i>Pavetta crassipes</i>	alcaloïdes, flavonoïdes
<i>Crossopteryx febrifuga</i>	saponosides, flavonoïdes, alcaloïdes
<i>Cassia siamea</i>	alcaloïdes, flavonoïdes
<i>Fadogia agrestis</i>	flavonoïdes, saponosides, alcaloïdes
<i>Terminalia macroptera</i>	saponosides
<i>Acanthospermum hispidum</i>	alcaloïdes
<i>Ficus sycomorus</i>	saponosides, flavonoïdes

*Remarque: les composés marqués dans le tableau sont ceux révélés par des révélateurs universels et confirmés par des révélateurs spécifiques.*

## **2.2 Extraits totaux et substances isolées**

Les travaux phytochimiques réalisés sur les différentes plantes (*P. crassipes*, *C. siamea*, *T. macroptera* et *Acanthospermum hispidum*) sont basés sur les extractions, le fractionnement et la purification par des méthodes chromatographiques préparatives. Pour apprécier la pureté des produits isolés, la méthode chromatographique analytique a été appliquée, ce qui a permis de déterminer le Rf de chaque produit.

### **2.2.1 Extractions et purifications**

#### **2.2.1.1 Etude phytochimique de *Pavetta crassipes***

L'étude phytochimique de *Pavetta crassipes* a conduit à obtenir des extraits alcaloïdes et méthanoliques totaux. Le schéma général regroupant les travaux phytochimiques réalisés sur cette plante organisé et présenté comme suit (figure 36).

##### **2.2.1.1.1 Les composés alcaloïdiques**

###### **□ Extraction**

Pour obtenir ces alcaloïdes la méthode classique d'extraction a été appliquée sur 900g de poudre. Le poids des alcaloïdes totaux obtenue a été de 562 mg soit un rendement de 0,062.

###### **□ Etude analytique**

L'analyse chromatographique sur couche mince des extraits bruts, a révélé la présence de deux alcaloïdes majoritaires et d'autres composés chimiques. Pour contrôler la présence de ces différents composés alcaloïdiques, la plaque de gel de silice 60F<sub>254</sub> est utilisée. Le milieu de migration est composé de CHCl<sub>3</sub> – MeOH (9 :1) + 0,25 ml de NH<sub>4</sub>OH. Les alcaloïdes, après migration sont observés l'UV et révélés au réactif de Dragendorff. La présence de l'alcaloïde est caractérisée par la couleur jaune orangée. Cette révélation des alcaloïdes dans l'extrait total, nous a conduit à une purification.

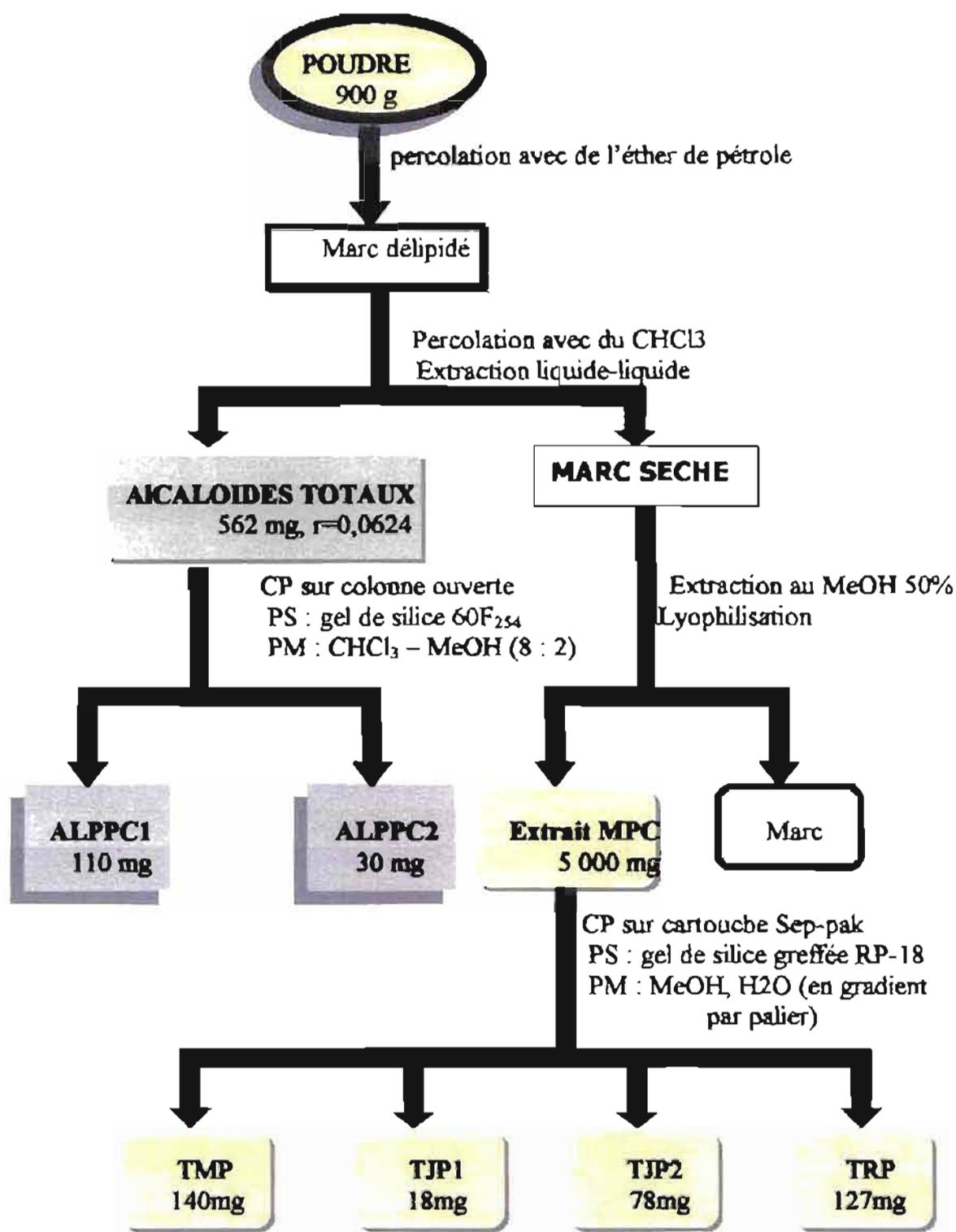


Figure 36 : Schéma général des travaux phytochimiques sur *P. crassipes*  
(CP : Chromatographie préparative, PS : Phase stationnaire, PM : Phase mobile)

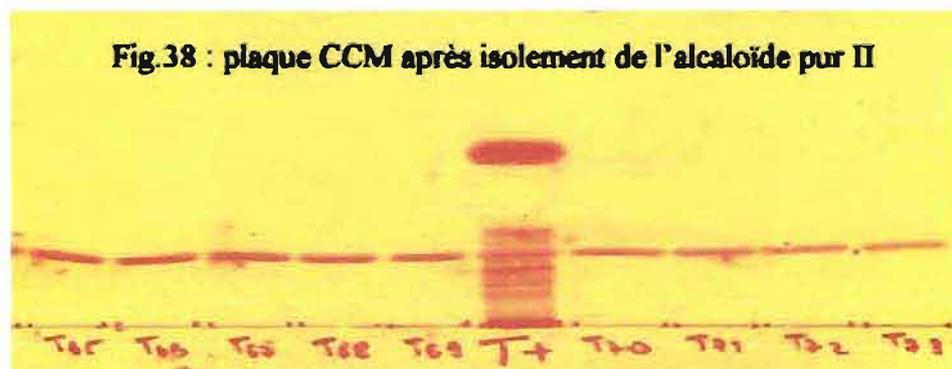
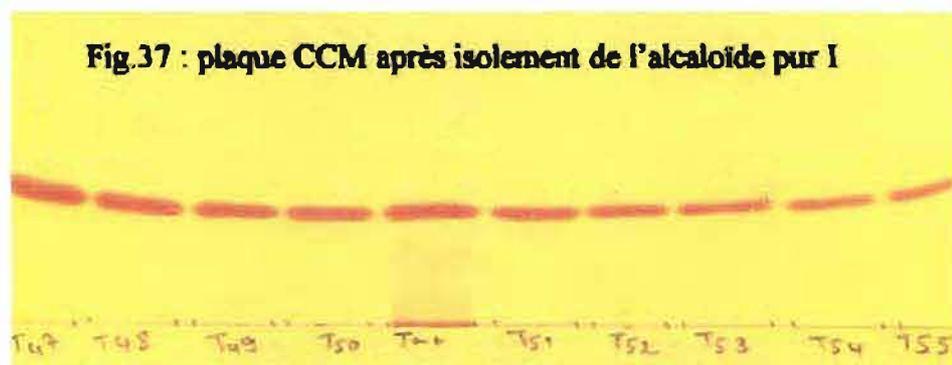
## □ Purification

La technique de chromatographie préparative sur colonne ouverte a été utilisée pour isoler les différents alcaloïdes contenus dans les extraits totaux. La phase stationnaire est le gel de silice 60F<sub>234</sub>. L'éluion est faite à la pression atmosphérique avec le mélange CHCl<sub>3</sub> – MeOH (8 :2) comme phase mobile. 300mg d'alcaloïdes totaux ont été purifiés. Les fractions sont récupérées à raison de 1ml par tube. Le contrôle CCM a été réalisé, selon la méthode analytique décrite dans matériel et méthodes. Il nous a permis de regrouper en 4 fractions:

- Fraction 1 : ne contient pas d'alcaloïdes
- Fraction 2 : est l'alcaloïde ALPPC1 majoritaire pur.
- Fraction 3 : est l'alcaloïde ALPPC2 minoritaire pur
- Fraction 4 : traces d'alcaloïde et d'autres composés.

Les produits ont migrés sur la plaque de gel de silice 60F<sub>234</sub> avec CHCl<sub>3</sub> – MeOH (9 :1) + 0,25 ml de NH<sub>4</sub>OH comme solvant de migration. Les alcaloïdes révélés n'absorbent pas à l'UV. Le réactif de Dragendorff pulvérisé sur les taches apparues sur la plaque CCM, a permis de confirmer ce groupe chimique par sa couleur spécifique jaune orangé (Figures 37 et 38). Les deux produits obtenus sont :

- l'alcaloïde 1 majoritaire pur (110 mg soit un rendement de 0,36) avec un Rf = 0,675, symbolisé par ALPPC1
- l'alcaloïde 2 minoritaire pur (30 mg soit un rendement de 0,1) avec un Rf = 0,1, symbolisé par ALPPC2



### 2.2.1.1.2 Les composés terpeniques (MPC)

#### ➤ **Extraction**

L'extraction des composés terpéniques de *P. crassipes*, a été faite selon la méthode d'extraction des composés méthanoliques décrite dans matériel et méthodes. Le système d'extraction par percolation à l'hydrométhanol a été appliqué. Dans notre cas le MeOH 50% a été utilisé. Elle a été faite sur la poudre déjà utilisée pour extraire les alcaloïdes. Après percolation, le méthanol est évaporé et la phase aqueuse résiduelle est lyophilisée. On obtient ainsi un extrait total MeOH 50% sec. Le poids que la masse des extraits méthanoliques est de 155 g soit un rendement de 0,175.

#### ➤ **Etude analytique**

Pour contrôler la présence des types de groupes chimiques dans l'extrait total MeOH50%, l'extrait a été analysé par CCM sur deux types de plaques :

**Plaque 1** : silice RP-18F<sub>254</sub> avec le MeOH -H<sub>2</sub>O (50 :50) comme solvant de migration.

**Plaque 2** : silice 60F<sub>254</sub> avec le CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (40 : 15 : 5 ) comme solvant de migration.

Les deux types de plaques ont été révélés avec le même révélateur. Quatre taches sont apparues après pulvérisation d'acide sulfurique 20% et 10 minutes de chauffage à l'étuve.

#### ➤ **Purification**

Pour isoler ces composés, deux purifications successives ont été adoptées:

a) La première a permis de faire un fractionnement en appliquant le système de chromatographie préparative phase liquide basse pression (voir 1.3.1). La phase stationnaire est le gel de silice greffée Lichroprep<sup>®</sup> RP-18. La pression d'élution de l'échantillon était de 5 bars. La composition de la phase mobile en gradient par palier est :

MeOH-H<sub>2</sub>O (20 : 80) : 2L

MeOH-H<sub>2</sub>O (30 : 70) : 1L

MeOH-H<sub>2</sub>O (40 : 60) : 1L

MeOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) : 1L

MeOH-H<sub>2</sub>O (60 : 20) : 1L

MeOH-H<sub>2</sub>O (70 : 30) : 1L

MeOH-H<sub>2</sub>O (80 : 20) : 1L

MeOH pur : 1L

Cinq (5) grammes d'extrait MeOH 50% sont solubilisés dans 30ml de MeOH 20%. L'échantillon solubilisé est chargé en tête de la colonne et élué par les différents solvants

sous une pression de 5 bars. Les fractions sont récupérées à raison de 100ml par flacon. Après contrôle CCM les fractions identiques sont regroupées. Le méthanol est évaporé et les phases aqueuses résiduelles sont lyophilisées (Figure 39).

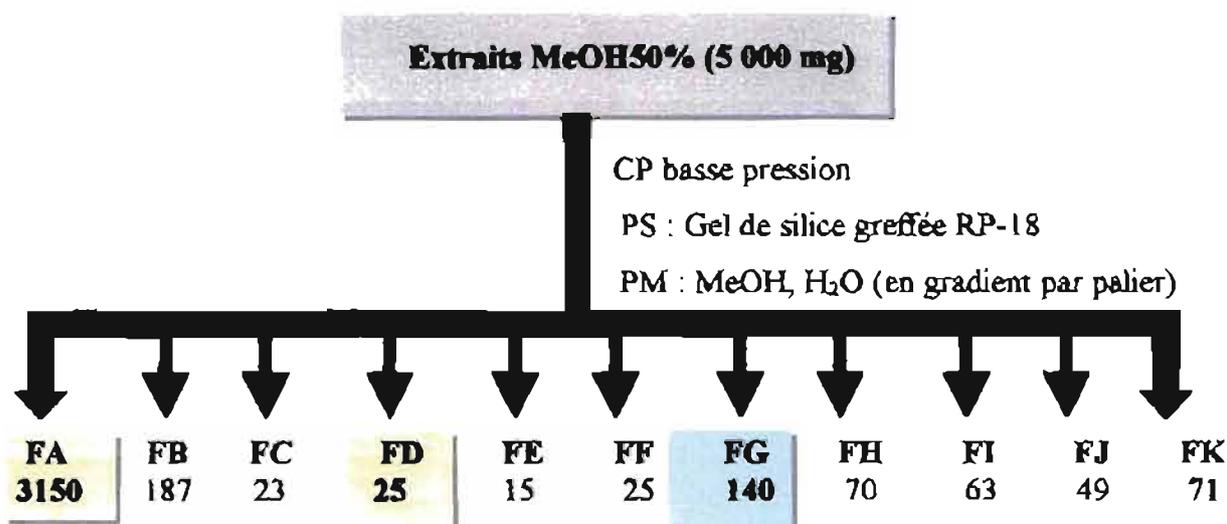


Figure 39 : Fractionnement de l'extrait sec de *Pavetta crassipes* par chromatographie préparative liquide basse pression (Chromatospac). Toutes les valeurs sont en mg.

De toutes ces fractions :

- FA contient trois produits identifiés par leur couleur : tache rose (TRP), première tache jaune (TJP1) et deuxième tache jaune (TJP2)
- FD contient TJP1 presque pur
- FG contenait une tache mauve (TMP) pur

b) Les fractions FA et FD contenant nos groupes chimiques révélés dans l'extrait total MeOH 50%, ont subi le deuxième type de purification. Elle a été faite en appliquant la chromatographie sur colonne ouverte sous pression atmosphérique. La phase stationnaire est le gel de silice 60F<sub>254</sub> et le mélange AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (40 : 15 : 5) en mode isocratique comme phase mobile (Figure 40).

Les fractions ont été récupérées à raison de 1ml par tube sur lesquelles les contrôles CCM ont été effectués. Les fractions identiques contenant nos produits purs, ont été regroupées, concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif et elles ont été lyophilisées.

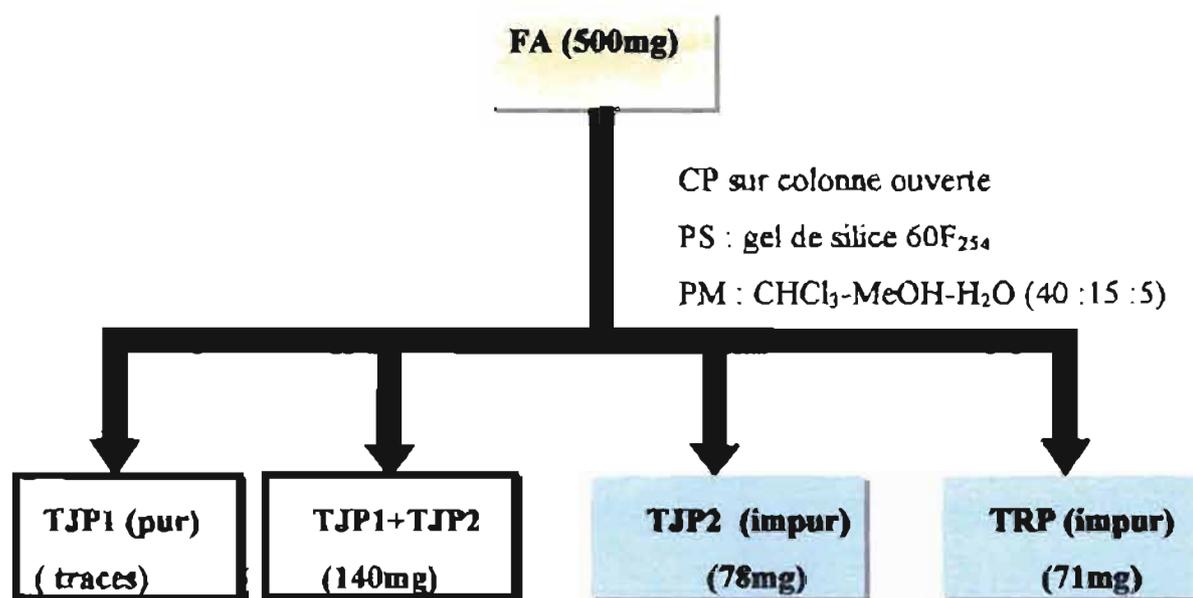


Figure 40 : Purification de la fraction FA de *Pavetta crassipes* par chromatographie sur colonne ouverte

Les produits purs isolés sont consignés dans le tableau. Le contrôle CCM fait sur les produits a mis en évidence le produit suivant (figure 41):

Tableau XVI : Produits isolés de l'extrait MeOH50 de *Pavetta crassipes*

Fraction	Produits résultants	Quantité (mg)	Rendement	Référence frontale (Rf)
EXTRAIT	TMP	140	0,28	0,275
MeOH50	TJP1	18	0,072	0,32



Fig. 41): Plaque CCM après isolement du produit TJP1

### 2.2.1.2 Etude phytochimique de *Cassia siamea*

Les travaux phytochimiques sur *C. siamea* ont été réalisés selon le schéma général suivant (figure 42).

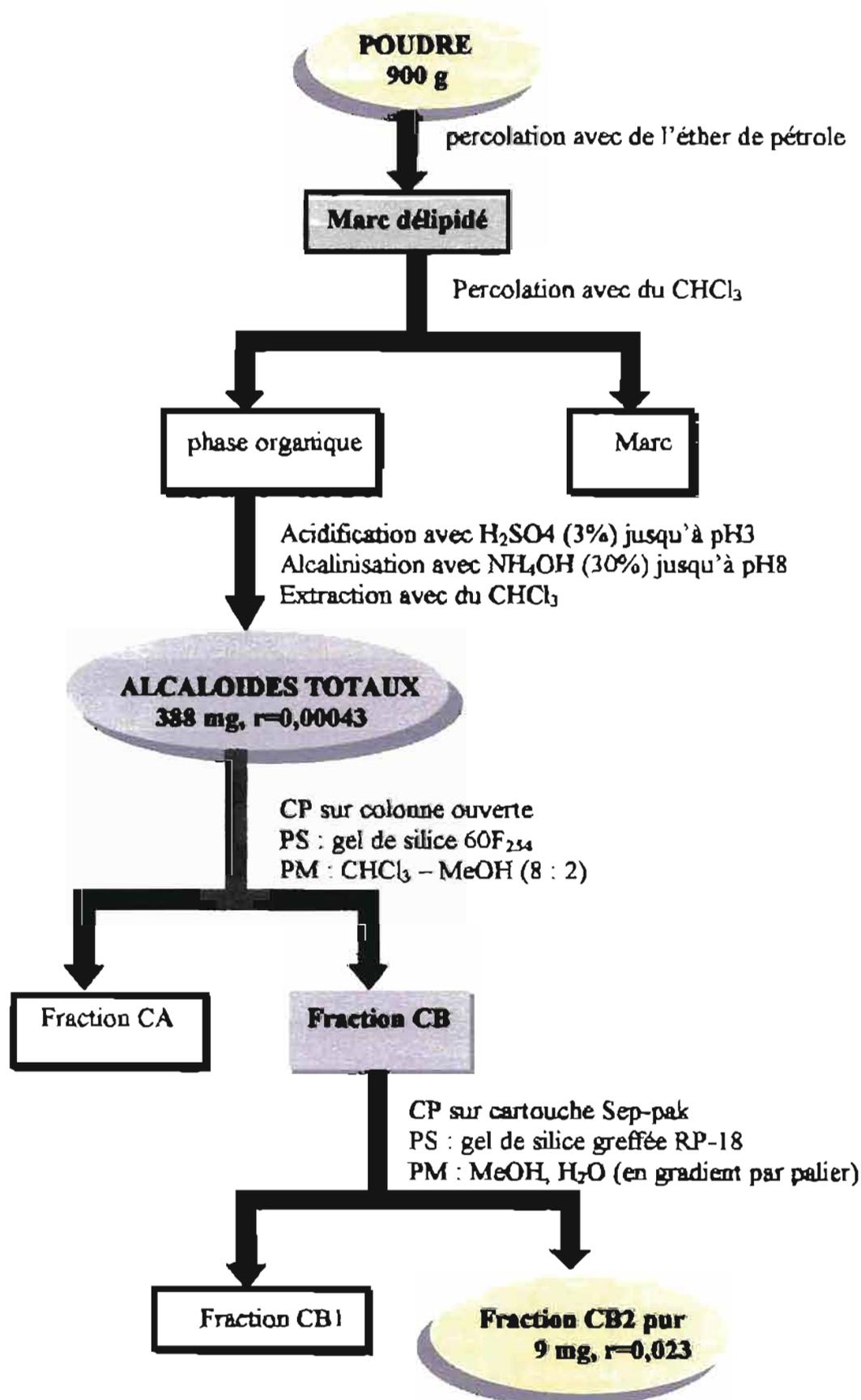


Figure 42 : Schéma général des travaux phytochimiques sur *Cassia siamea*

### **2.2.1.2.1 Extraction des alcaloïdes totaux**

Ces travaux ont porté essentiellement sur l'extraction et la purification d'un produit majoritaire qui se comporte comme un alcaloïde. L'extraction a été réalisée à partir de 900g de poudre. La méthode classique d'extraction des alcaloïdes totaux donnée précédemment, a été appliquée. La poudre délipidée est soumise à une percolation. Les alcaloïdes totaux ont été purifiés par partage liquide-liquide avec des solutions basique et acide. La masse des alcaloïdes totaux obtenus a été de 388 mg soit un rendement de 0,043. Ce rendement montre la faible teneur des alcaloïdes dans les feuilles de cette plante sans ignorer aussi certaines pertes probables lors de l'extraction.

### **2.2.1.2.2 Etude analytique**

Le contrôle CCM réalisé sur l'extrait alcaloïdique, a permis de trouver un milieu satisfaisant pour la séparation des produits. Cette séparation a été faite sur la plaque de gel de silice 60F<sub>254</sub>, avec le CHCl<sub>3</sub> - MeOH (8 : 2) comme milieu de migration. Après migration les produits ont été révélés par lecture sous UV avant pulvérisation Dragendorff. Le produit majoritaire recherché nommé CB2, présente une fluorescence bleu-violette aux rayonnements UV à 365 nm et une fluorescence bleu-clair à 254 nm. Il a donné la coloration jaune orangée avec le réactif de Dragendorff. Ce composé majoritaire se comportant comme un alcaloïde, a été soumis à une purification par chromatographie préparative.

### **2.2.1.2.3 Purification**

#### **❖ CP sur colonne ouverte**

Le produit a été purifié par chromatographie préparative sur colonne ouverte de gel de silice 60F<sub>254</sub>. La phase mobile est un mélange CHCl<sub>3</sub> - MeOH (8 : 2) l'élution est réalisée en mode isocratique. L'échantillon a été élué sous pression atmosphérique. Les fractions ont été récupérées à raison de 1ml par tube sur lesquelles les contrôles CCM sont effectués. Le solvant de migration sur plaque CCM était le même que celui de la chromatographie préparative. Le réactif de Dragendorff est utilisé comme révélateur. Ce contrôle permet d'apprécier la pureté du produit isolé. La purification a permis d'obtenir deux fractions:

- la fraction CA ne contient pas CB2 mais d'autres produits.

- la fraction CB contient majoritairement CB2. Le produit n'étant pas parfaitement pur, une autre méthode de purification a été adoptée

#### **❖ CP sur cartouche Sep-pak**

Cette technique est utilisée pour parfaire la purification de la fraction CB contenant la produit majoritaire obtenue après la purification sur colonne ouverte précédente. C'est une

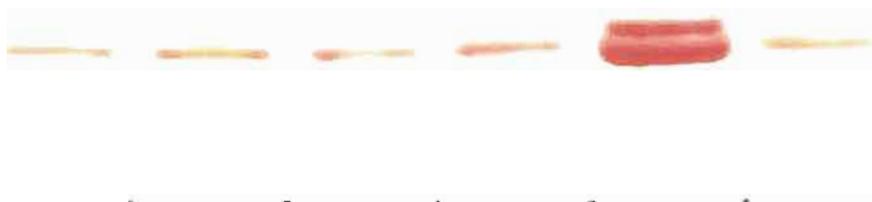
méthode de purification avec une phase stationnaire déjà prête contenue dans une colonne de 2 cm de taille. La particularité est qu'elle permet de passer l'échantillon en faible quantité. La phase stationnaire est Silice greffée RP-18. La pression est manuelle à l'aide d'une seringue et la phase mobile (en gradient par palier) est composée de:

H<sub>2</sub>O distillée : 20ml  
MeOH-H<sub>2</sub>O (10 : 90) : 20ml  
MeOH-H<sub>2</sub>O (20 : 80) : 20ml  
MeOH-H<sub>2</sub>O (30 : 70) : 20ml  
MeOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) : 20ml  
MeOH-H<sub>2</sub>O (70 : 30) : 20ml  
MeOH pur: 40ml

Après un lavage avec du MeOH pur puis du MeOH (10%), on charge l'échantillon solubilisé dans 0,5ml de MeOH (10%) à l'aide d'une seringue de 1ml. Les solvants ont été injectés dans la colonne et les fractions ont été récupérées à raison de 1ml par tube. Les contrôles CCM ont été réalisés sur chaque fraction et la fraction contenant le produit majoritaire pur a été concentrée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Le résultat de cette méthodologie a été isolement de d'un produit qui apparaît jaune orangé sur plaque CCM sous l'effet du réactif de Dragendorff (figure 43). On aurait pensé à un alcaloïde mais le test qualitatif d'identification aux réactifs de Mayer et de Boucharda montrent le contraire. Il s'agit de la fraction CB2 qui est le produit pur avec un R<sub>f</sub> = 0,4. Sur 300 mg de l'extrait total purifié, 9mg de CB2 pur ont été obtenus et analysés par RMN pour l'élucidation structurale.

Fig. 43: Plaque CCM après extraction et isolement de CB2



### 2.2.1.3 Etude phytochimique de *Terminalia macroptera*

Le travail phytochimique effectuée sur cette plante a été organisé selon le schéma général suivant (figure 44):

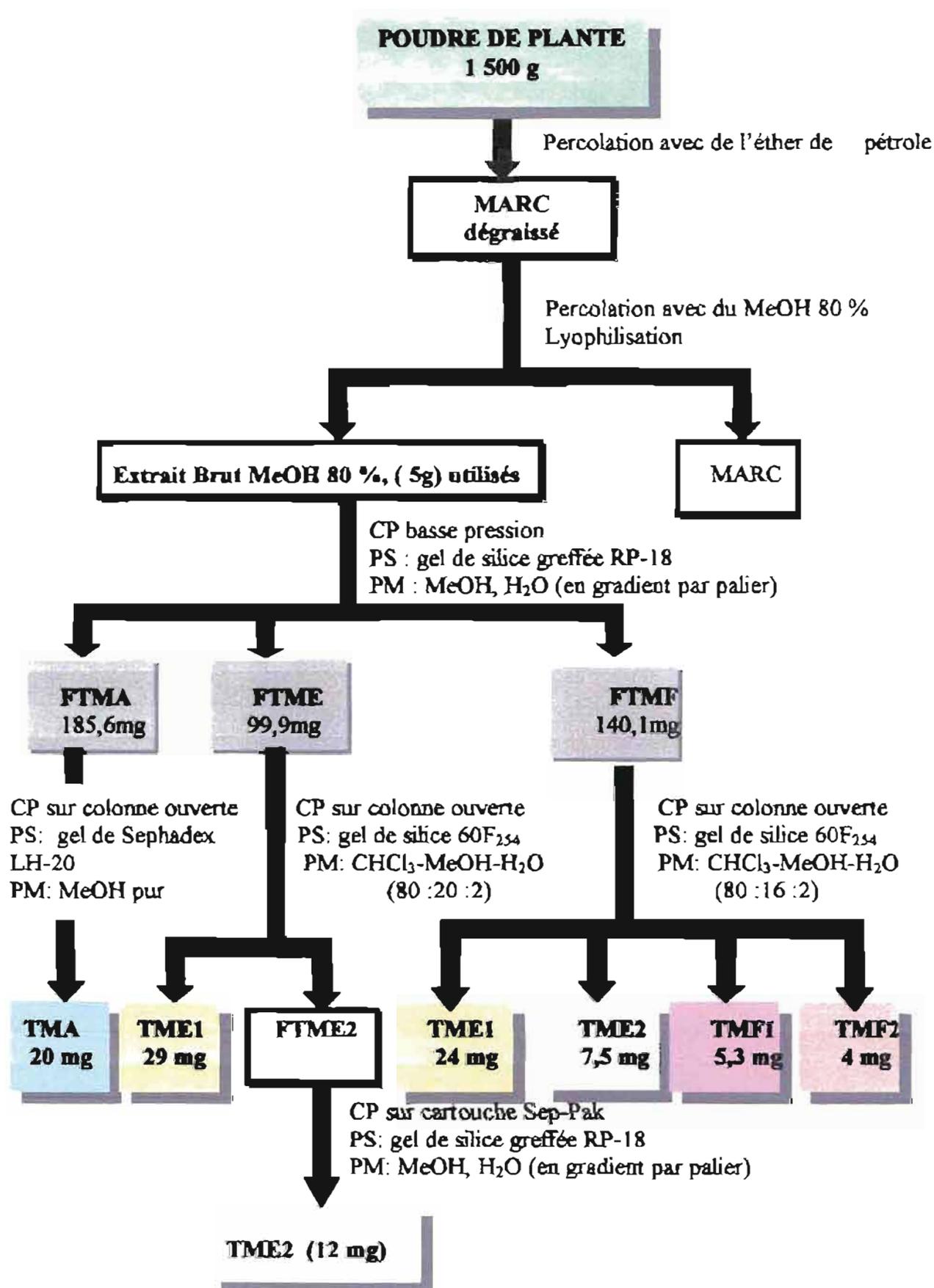


Figure 44 : Schéma général des travaux phytochimiques sur *Terminalia macroptera*

### **2.2.1.3.1 Extraction des composés terpéniques**

Cette plante a été étudiée spécialement pour ses composés saponosiques. Pour les obtenir une extraction au MeOH80% a été effectuée. La méthode d'extraction au MeOH 80% a été adoptée (voir 1.1.2, type II). Après percolation, la phase hydrométhanolique est concentrée et lyophilisée. Sur 1,5 Kg de poudre utilisée, plus de 100 g d'extraits MeOH80% ont été obtenus.

### **2.2.1.3.2 Etude analytique**

Cette technique nous a permis d'obtenir un milieu très résolutif pour séparer les différents composés de l'extrait MeOH80%. Ce contrôle a montré que l'extrait sec obtenu contenait les saponines majoritairement, et d'autres groupes chimiques minoritaires. La plaque de gel de silice 60F<sub>254</sub> a été utilisée. Le solvant de migration était le CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80 :20 :2). Après la migration, la plaque a été séchée et pulvérisée avec de la vanilline sulfurique et placée à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes. Les taches de 5 saponosides principaux ont été identifiées par leur couleur bleu-violet. Compte tenu, de la complexité de l'extrait plusieurs purifications successives ont été réalisées.

### **2.2.1.3.3 Purification**

Les extraits totaux MeOH80% ont subi un fractionnement au chromatospac (chromatographie préparative phase liquide basse pression). Les différentes fractions contenant les taches saponiques majoritaires ont fait l'objet d'une purification par la chromatographie préparative sur colonne ouverte ou sur cartouche (Sep-pak).

#### **□ CP phase liquide basse pression (Chromatospac)**

C'est la méthode de purification qui a permis de fractionner l'extrait MeOH 80% contenant les saponosides révélés par la CCM. La phase stationnaire a été le gel de silice greffée RP-18 et la phase mobile a été composé comme suit:

MeOH-H<sub>2</sub>O (20 : 80) : 2L

MeOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) : 2L

MeOH-H<sub>2</sub>O (80 : 20) : 2L

MeOH pur : 2L

L'élution est réalisée en gradient par palier. 5g d'extrait MeOH 80% ont été solubilisés dans 20ml de MeOH 20% à chaque séance. L'échantillon solubilisé a été chargé en tête de la colonne et élué par les différents solvants sous une pression de 5 bars. Les fractions ont été récupérées à raison de 100ml par flacon. Le contrôle CCM est réalisé sur les différentes fractions et les fractions identiques sont été regroupées. Le méthanol est évaporé et les phases aqueuses résiduelles sont lyophilisées. Les fractions riches en saponines ont été soumises à d'autres techniques de purification afin d'isoler les saponines. Ce fractionnement a permis d'obtenir 7 fractions, dont 4 présentent plus de 50 mg d'extraits saponiques. Il s'agit des fractions FTMA, FTMD, FTME et FTMF. On peut noter à partir de ces résultats, qu'il y a au moins deux saponosides différents dans l'extrait testé (Figure 45).

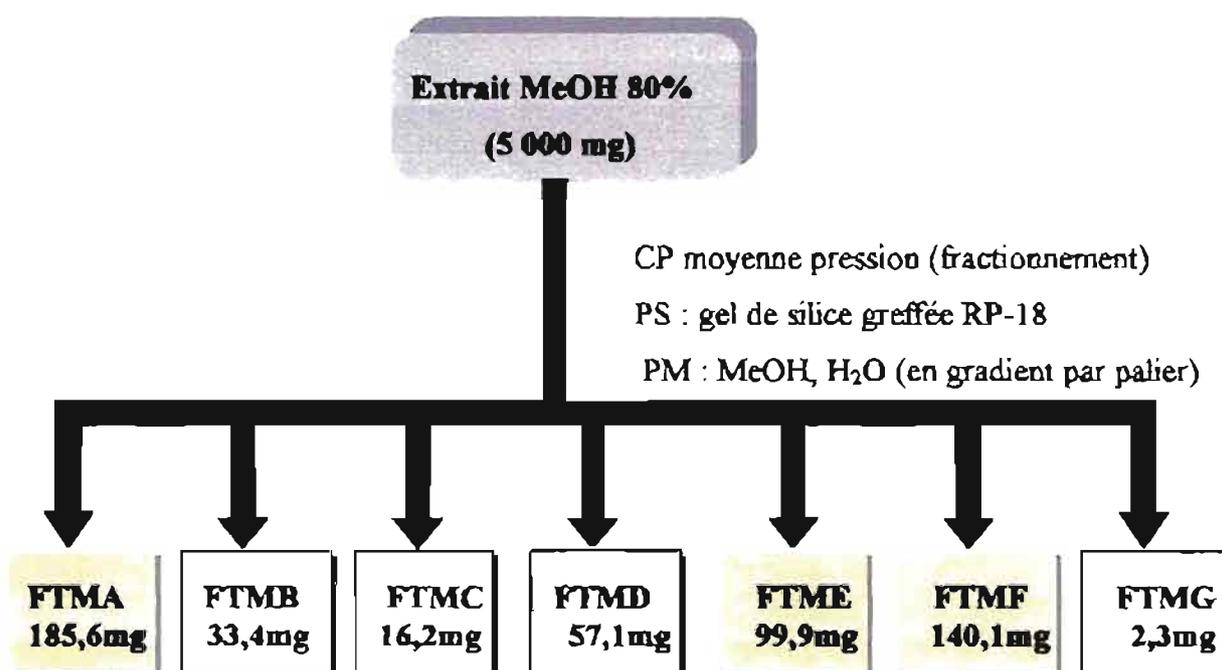


Figure 45: Fractionnement de l'extrait sec de *Terminalia macroptera* par chromatographie préparative liquide basse pression (Chromatospac)

Sur les 3 fractions obtenues et qui contenaient le plus de saponosides, nous avons testé 3 systèmes de chromatographie sur colonne ouverte.

#### □ CP sur colonne ouverte

Sur les trois fractions obtenues par chromatographie préparative liquide basse pression qui contenaient le plus de saponosides, nous avons testé 4 systèmes chromatographiques différents. Trois fractions ont été concernées pour la purification : FTMA (185,6 mg), FTME (99,9 mg), FTMAF (140,1 mg).

##### ➤ Fraction FTMA

La purification est réalisée sur une colonne de gel de Sephadex LH-20 avec le MeOH pur comme phase mobile. L'échantillon a été chargé dans la colonne et élué est effectuée à l'aide de MeOH pur. Les fractions sont récupérées à raison de 1ml par tube. Le contrôle CCM a été fait avec la plaque RP-18 et le MeOH pur comme solvant de migration. Après la révélation avec la vanilline sulfurique, les fractions identiques ont été regroupées et séchées à l'évaporateur rotatif.

##### ➤ Fraction FTME

Pour cet isolement, le gel de silice 60F<sub>254</sub>, a été utilisé comme phase stationnaire. La phase mobile a été le CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80 :20 :2) en mode isocratique. La méthode est identique à celle utilisée pour la purification de la fraction A à la différence que les fractions récupérées ici sont de 4ml par tube. Après le contrôle CCM avec le même solvant et la même plaque utilisée en CP, les fractions identiques ont été regroupées. Les solvants CHCl<sub>3</sub> et MeOH ont été évaporés à l'évaporateur rotatif et la fraction aqueuse résiduelle a été lyophilisée. Deux fractions saponiques ont été obtenues dont TME1 était une saponine pure et FTME2 qui contenait des impuretés. Cette dernière a été repurifiée par la méthode CP sur cartouche Sep-pak (voir 4.3.3).

##### ➤ Fraction FTMF

Avant la purification de cette fraction, un système chromatographie a été conçu en vue d'ajuster le R<sub>f</sub> à 0,4 environ pour obtenir une meilleure séparation des produits. Ainsi le système retenu est le CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80 :16 :2) en mode isocratique. 100mg de cette fraction ont été utilisés pour la purification. La phase stationnaire a été le gel de silice 60F<sub>254</sub>.

Les fractions récupérées ont été de l'ordre de 4 ml par tube. Après les contrôles CCM utilisant le même système chromatographique (solvant et gel) que l'isolement, les fractions identiques contenant le saponoside recherché, ont été regroupées. Les solvants

CHCl<sub>3</sub> et MeOH été évaporés à l'évaporateur rotatif et la solution aqueuse résiduelle des fractions MEOH a été lyophilisée.

□ **CP sur cartouche Sep-pak**

C'est la méthode chromatographie utilisée pour la purification la fraction FTME2 impure (voir fraction E).

La méthode est identique à celle utilisée pour la purification ultime de la fraction CB2 de *Cassia siamea* (voir 4.6.6.2). La phase mobile (en gradient par palier) a été composée comme suit:

MeOH-H<sub>2</sub>O (40 : 60) : 20 ml

MeOH-H<sub>2</sub>O (50 : 50) : 10 ml

MeOH-H<sub>2</sub>O (60 : 40) : 10 ml

MeOH-H<sub>2</sub>O (70 : 30) : 10 ml

MeOH-H<sub>2</sub>O (80 : 20) : 10 ml

MeOH-H<sub>2</sub>O (90 : 10) : 10 ml

MeOH pur : 20 ml

L'isolement a donné les produits purs suivants :

- la saponine pure isolée de FTMA (60 mg) est TMA (20 mg) a été obtenue soit un rendement de 0,33.

- sur 90 mg de FTME utilisés pour la purification, TME1 a été obtenu pur à raison de 29 mg soit un rendement de 0,32.

- sur 100 mg de FTMF utilisés, nous avons obtenu 4 saponines différentes sous cette condition de purification, avec des rendements assez faibles : TME1 (24mg), TME2 (7,5mg), TMF1 (5,3mg), et TMF2 (4mg).

La chromatographie analytique faite sur les 5 produits purs isolés donne des Rf différentes (figure 46). Les résultats de cette étude phytochimique sont portés dans le tableau suivant (tableau XVII).

**Tableau XVII: récapitulatifs des produits isolés de l'extrait MeOH80% de *Terminalia macroptera***

Fraction	Produits isolés	Quantité (mg)	Rendement	Référence frontale (Rf)
FTMA	TMA	20	0,30	0,34
FTME	TME1	29	0,32	0,45
	TME1	24	0,24	0,45
FTMF	TME2	7,5	0,075	0,76
	TMF1	5,3	0,053	0,80
	TMF2	4	0,04	0,53

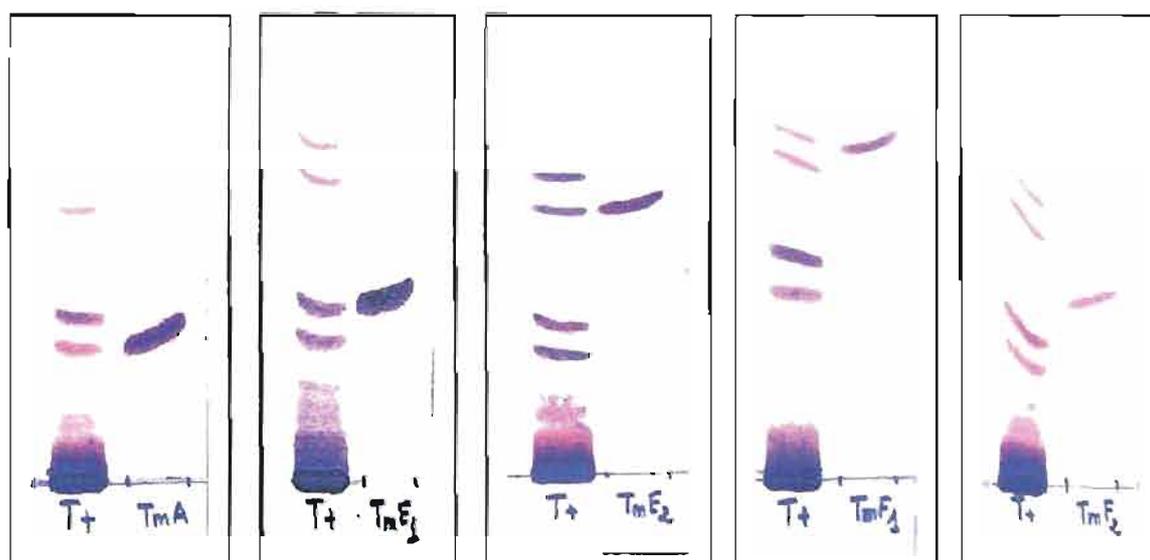


Fig. 46 : Plaque CCM après isolement des saponines

#### 2.2.1.4 Etude phytochimique d'*Acanthospermum hispidum*

Cette plante a connu un travail phytochimique basé essentiellement sur la recherche et l'isolement des alcaloïdes que les travaux préliminaires ont montrés.

##### 2.2.1.4.1 Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux de cette plante a suivi la même méthodologie que celle décrite dans matériel et méthodes et utilisée pour les deux plantes précédentes à savoir *Cassia siamea* et *Pavetta crassipes*. 900 g de poudre ont été utilisés pour

l'extraction. Sur ces 900 g de poudre utilisés les alcaloïdes totaux ont été obtenus à raison de 596 mg soit un rendement de 0,00066, montrant une faible teneur de la plante en alcaloïdes.

#### **2.2.1.4.2 Etude analytique**

La présence des alcaloïdes totaux dans *A. hispidum* a été révélée après une migration sur la plaque de gel de silice 60F<sub>254</sub> avec le CHCl<sub>3</sub> – MeOH (95 : 5) comme solvant de migration. Cette analyse a montré que les alcaloïdes n'absorbent pas aux rayonnements UV (365nm, 254nm). Par contre, ils présentent une tache jaune orangée au réactif de Dragendorff.

#### **2.2.1.4.3 Purification**

Plusieurs alcaloïdes ont été mis en évidence après le contrôle CCM. Cependant ces taches très fines indiquent que leur teneur dans la plante est très faible. Nous avons essayé de les isoler. La CP sur colonne ouverte a été utilisée avec le gel de silice 60F<sub>254</sub> comme phase stationnaire ; la phase mobile étant le CHCl<sub>3</sub> – MeOH (8 : 2) en mode isocratique. Les fractions ont été récupérées à raison de 1ml par tube sur lesquelles les contrôles CCM ont été effectués. Les fractions identiques ont été regroupées et concentrées à sec à l'évaporateur rotatif. A la fin, des traces de produits purs obtenus ne nous a pas permis de poursuivre l'étude c'est à dire d'élucider les structures et de faire les tests pharmacologiques. Une étude plus poussée n'a pu être faite pour cause d'insuffisance de matière de départ disponible.

## 2.2.2 Elucidation structurale

L'étude spectroscopique par la résonance magnétique Nucléaire et de la spectrométrie de masse réalisée sur les différents produits isolés, a donné des spectres dont l'analyse a permis de décrire les molécules correspondantes.

### 2.2.2.1 Les alcaloïdes de *Pavetta crassipes*

#### 2.2.2.1.1 Elaeocarpidine (ALPPC1)

- **Spectrométrie de masse:**

Electrospray positif (ESI+)  $m/z$  : 268 ( $MH^+$ ), 170, 169.

MS/MS sur fragment à 268  $m/z$  : 84.

**Formule brute :  $C_{17}H_{21}N_3$**

Le produit PC1 est un alcaloïde comme le montre la tache jaune orangée avec le réactif de Dragendorff spécifique des alcaloïdes.

Sa masse moléculaire est de 267 uma et correspond à la formule brute  $C_{17}H_{21}N_3$ .

- **Résonance Magnétique Nucléaire**

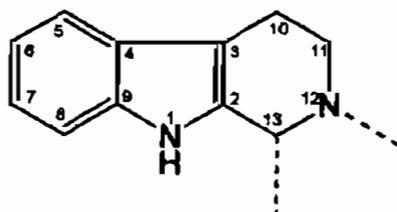
Le spectre de RMN du proton du composé PC1 montre la présence de 4 protons aromatiques et 16 protons aliphatiques. Les protons aromatiques résonnent sous forme de 2 doublets élargis et de 2 triplets élargis correspondant aux 4 protons d'un noyau aromatique substitué en ortho/méta.

Si on examine le spectre de RMN du carbone 13, on observe la présence de 8 carbones aromatiques : 4 CH et 4 C  $IV^{arom}$ , ainsi que 9 carbones aliphatiques : 2 CH et 7  $CH_2$ . Ces signaux sont caractéristiques d'un noyau indole, notamment les carbones C-2 (135,2 ppm) et C-9 (138,0 ppm). On remarque également des carbones déblindés par la proximité des azotes : C-11 (48,7), C-13 (61,4 ppm), C-15 (51,4 ppm), C-20 (52,9 ppm) et C-17 (85,1 ppm).

Ensuite, l'examen des spectres de RMN bidimensionnelles permet de construire le reste de la molécule.

Le proton aliphatique résonnant à 3,37 ppm (H-13) présente une corrélation sur le spectre HMBC avec le carbone C-2, ce qui permet de le relier au noyau indole. Sur le spectre de RMN  $C^{13}$ , le carbone C-13 apparaît à 61,3 ppm, nous pouvons donc situer un azote en  $\alpha$  (N-12). Le proton H-13 présente également une petite corrélation sur le spectre COSY

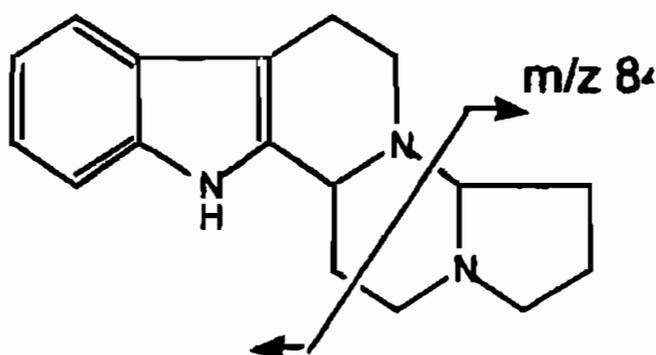
avec un CH<sub>2</sub> (H-10; 2,23 et 2,70 ppm), lui-même couplé à un CH<sub>2</sub> (H-11; 3,21 et 2,48 ppm). Les protons H-10 corrélient en  $J^3$  avec C-2 ce qui permet de construire le cycle :



D'autre part, le proton H-13 est couplé également à un CH<sub>2</sub> résonnant à 2,23 et 1,86 ppm (H-14), qui est couplé à un autre CH<sub>2</sub> (H-15, 3,21 et 2,38 ppm). Le déplacement chimique de ce dernier permet d'envisager la proximité d'un azote (N-16). Le carbone C-15 (51,4 ppm) corréle avec les protons d'un CH<sub>2</sub> (H-20; 3,06 et 2,31 ppm). Ensuite le spectre COSY permet de construire l'enchaînement correspondant à un cycle : le CH<sub>2</sub> en position 20 est couplé à un CH<sub>2</sub> résonnant à 1,87 et 1,75 ppm (H-19), lui-même couplé à un CH<sub>2</sub> résonnant à 2,07 et 1,75 (H-18), couplé à CH à 2,70 ppm (H-17). Ce dernier est porté, comme le montre le spectre HMQC, par un carbone caractéristique résonnant à 85,1 ppm (C-17), déblindée par la proximité des 2 azotes en positions 12 et 16. Ceci est confirmé notamment par les corrélations  $J^3$  observées entre le carbone C-17 et le proton H-15, ainsi qu'entre le proton H-17 et les carbones C-13, C-15 et C-19.

PC1 correspond donc à la structure de l'élaeocarpidine qui fut isolée pour la première fois de *Elaeocarpus archboldianus* par Johns (1968).

La structure est confirmée par le fragment caractéristique à m/z 84 observé sur le spectre de masse en MS/MS (figure 47) :



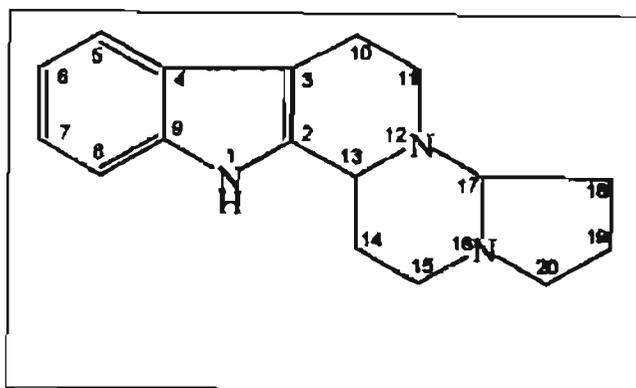


Fig. 47: structure de l'elaeocarpidine

Tableau XVIII : COSY et HMBC ( $CD_3OD$ ; 400,13 MHz) de L'elaeocarpidine (ALPPC1)

Position	$\delta^1H$ (J Hz)	$\delta^{13}C$	COSY	HMBC
2	-	135,4	-	-
3	-	108,0	-	-
4	-	128,4	-	-
5	7,37 br d (7,8)	118,6	H-6, H-7	C-3, C-4, C-7, C-9
6	6,96 br t (7,5)	119,8	H-5, H-7, H-8	C-4, C-5, C-7, C-8
7	7,03 dd (8; 7,5)	121,9	H-5, H-6, H-8	C-5, C-8, C-9
8	7,28 br d (8)	112,0	H-7, H-6	C-4, C-6, C-7
9	-	138,0	-	-
10	2,92 m	22,6	H-10 (2,70), H-11, H-13	C-2, C-3
	2,70 m		H-10 (2,92), H-11, H-13	C-2, C-11
11	3,21 m	48,7	H-10, H-11 (2,48)	C-3, C-10
	2,48 t d (11,0; 3,9)		H-10, H-11 (3,21)	C-3, C-10, C-13
13	3,37 br d (11,5)	61,3	H-10, H-14	C-2, C-11, C-15
14	2,23 br d (13,0)	29,6	H-13, H-14 (1,86), H-15	C-13, C-15
	1,86 m		H-13, H-14 (2,23), H-15	C-2, C-13, C-15
15	3,21 m	51,5	H-14, H-15 (2,38)	C-13, C-14, C-17
	2,38 br t (11,5)		H-14, H-15 (3,21)	C-14
17	2,70 m	85,1	H-18 (2,07), H-19 (1,75)	C-13, C-15, C-19
18	2,07 m	30,0	H-17, H-19	C-19
	1,75 m		H-17, H-19	C-19
19	1,87 m	20,6	H-18 (2,07), H-20	C-18
	1,75 m		H-18 (2,07), H-20	C-17
20	3,06 t (8,4)	52,9	H-19, H-20 (2,31)	C-15, C-17, C-18, C-19
	2,31 q (8,5)		H-19, H-20 (3,06)	-

### 2.2.2.1.2 Hydroxyélaéocarpidine (ALPPC2)

- **Spectrométrie de masse:**

Electrospray positif (ESI+)  $m/z$  : 284 ( $MH^+$ ),

MS/MS sur fragment à 284  $m/z$  : 199, 84.

HRMS :  $m/z$  (%) 284,17635 ( $M+H$ ) [calculé 284,17629], 177 (90), 84 (87)

Point de fusion : 220 °C (décomposition)

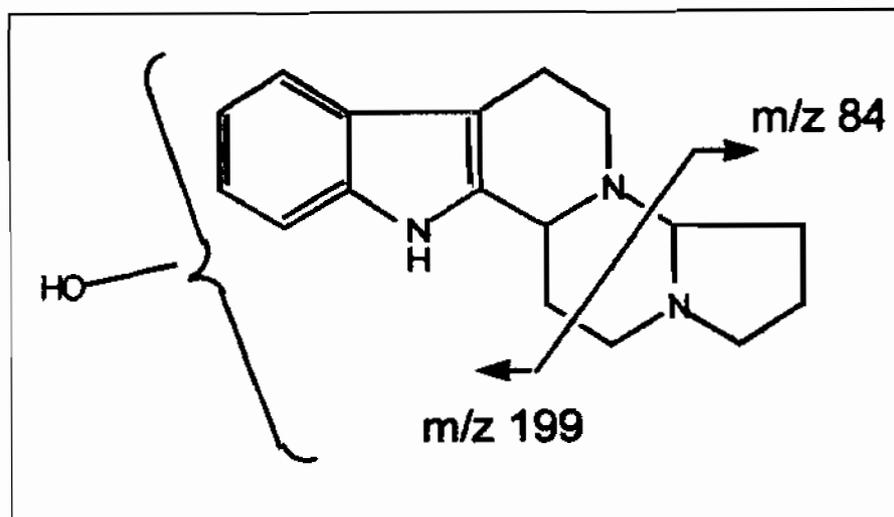
UV : :  $\nu_{max}$  (MeOH) nm 274

IR :  $\lambda_{max}$  (film)  $cm^{-1}$  3333, 2956, 2926, 2856, 1709, 1665, 1597, 1457, 1376, 1213, 1178, 1125, 1038.

$[\alpha]_D - 13$  (0,03 g/100 ml, MeOH)

**Formule brute** :  $C_{17}H_{21}N_3O$ , MM = 283

L'hydroxyélaéocarpidine (ALPPC2) qui présente une structure très proche de celle de l'élaéocarpidine (ALPPC1), avec une masse supérieure de 16 uma correspondant à la formule brute  $C_{17}H_{21}N_3O$ . Le spectre de masse MS/MS présente un fragment à  $m/z$  84 commun avec l'élaéocarpidine. Un second fragment à 199 permet de supposer la présence d'un groupement OH sur la partie gauche de la molécule (voir figure ci-dessous).





**Tableau XIX :  $^1\text{H}$ , COSY et HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 400,13 MHz) de l'hydroxyélaeocarpidine**

Position	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (J/Hz)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$	COSY	HMBC
	-	136,2	-	-
3	-	107,3	-	-
4	-	129,0	-	-
5	6,76 d (2,1)	103,1	H-7	C-3, C-6, C-7, C-9
6	-	151,2	-	-
7	6,59 dd (8,6; 2,1)	111,6	H-5, H-8	C-5, C-6, C-9
8	7,10 d (8,6)	112,3	H-5, H-7	C-4, C-6, C-7, C-9
9	-	132,9	-	-
10	2,87 m	22,6	H-10 (2,63), H-11 (2,49)	C-2, C-3, C-11
	2,63 d (15,0)		H-10 (2,87), H-11	C-2, C-3, C-11
11	3,22 m	48,7	H-11 (2,49), H-10 (2,63)	C-3, C-10, C-13
	2,49 td (11,1; 3,5)		H-11 (3,22), H-10	C-3, C-10, C-13
13	3,38 d (11,1)	61,4	H-14	-
14	2,22 d (12,9)	29,5	H-13, H-14 (1,85), H-15	C-13, C-15
	1,85 m		H-13, H-14 (2,22), H-15	-
15	3,22 m	51,4	H-14, H-15 (2,40)	C-14, C-17, C-20
	2,40 t (11,1)		H-14, H-15 (3,22)	-
17	2,75 t (6,5)	85,1	H-18, H-19 (1,76)	C-13, C-15, C-18
18	2,10 m	30,0	H-17, H-18 (1,76), H-19 (1,85)	-
	1,76 m		H-17, H-18 (2,10)	-
19	1,85 m	20,6	H-18 (2,10), H-20 (3,08)	C-18
	1,76 m		H-18 (2,10)	C-17
20	3,08 t (7,9)	52,9	H-19 (1,85), H-20 (2,33)	C-17, C-18
	2,33 q (8,5)		H-19 (1,76), H-20 (3,08)	C-15, C-19

Les molécules identifiées par RMN et SM sont décrites pour la première fois dans la plante à travers notre étude. La première molécule appelée Elaeocarpidine (ALPPC1) a été déjà décrite dans d'autres espèces de plantes comme *Pelargonium* (Geraniaceae) (Balchin et al., 1996 ; Diker et al., 1997), *Tarema vanprukii* (Takayama et al., 1992), *Elaeocarpus sphaericus*, *Elaeocarpus archboldianus* et *Elaeocarpus dilichostylis* (Johns et al., 1971, 1968) ou synthétisée (Harlet-masson et al., 1969 ; Gribble et al., 1970, 1987, 1988).

L'alcaloïde ALPPC2, à notre connaissance est nouvelle car elle n'a jamais été précédemment décrite dans la littérature. Il a été pour le moment nommé hydroxyélaeocarpidine parce qu'elle contient la structure de base d'élaeocarpidine et un groupement hydroxyl qui le diffère de celle-ci. Cette différence a été observée sur la plaque CCM où les Rf sont parfaitement différents. Les spectres de la RMN et de la SM ont confirmé la nouveauté du produit. Cependant des études complémentaires (point de fusion, pouvoir rotatoire) restent à faire pour caractériser la molécule afin qu'elle soit effective.

## 2.2.2.2 Les composés terpéniques de *Pavetta crassipes*

### 2.2.2.2.1 Acanthospermol $\beta$ -Galactosidopyranoside

- **Spectrométrie de masse :**

Electrospray positif (ESI+) m/z : 507 (MNa<sup>+</sup>), 991 (2M + Na)<sup>+</sup>,

-> MS/MS 507 m/z : 345 (MNa<sup>+</sup>-162; perte sucre)

Electrospray négatif (ESI-) m/z : 989 (2M- 2H+ Na)<sup>-</sup>, 967 (2M-H)<sup>-</sup>, 505 (M-2H+Na)<sup>-</sup>, 483 (MN-H)<sup>-</sup>.

-> MS/MS m/z : 465 (perte d'eau), 179, 161.

Formule brute : C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>; MM = 484.

Le spectre de masse de TM1 montre une masse moléculaire de 484 uma, correspondant à la formule brute C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>. La perte du fragment à m/z 162 (ESI+) indique que ce composé est un glycoside et que l'aglycone présente une masse de 322 uma.

- **Résonance Magnétique Nucléaire**

RMN du proton et COSY (400,13 MHz) :

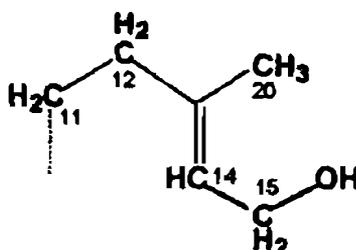
Le spectre de RMN du proton du produit TM1 est caractérisé par la présence d'un sucre et d'une génine. Les signaux du sucre apparaissent entre 3,40 et 4,14 ppm, le doublet à 4,14 ppm étant caractéristique du proton anomérique. Ces signaux correspondent au galactose, en effet la constante de couplage  $J_{H-3'-H-4'}$  = 3 Hz est caractéristique (pour Glc = 8 Hz).

D'autre part, on observe 4 singulets correspondant à 4 CH<sub>3</sub> : 3 sont blindés : 0,72; 0,83 et 0,91 ppm et un est plus déblindé : 1,66 ppm.

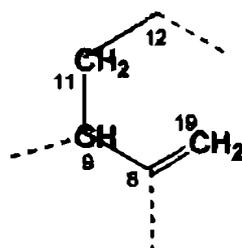
Dans la région des protons éthyléniques, on observe les signaux de deux protons. Le proton éthylénique résonnant à 5,35 ppm sous forme d'un triplet élargi (H-14), est couplé, comme le montre le spectre COSY, avec le CH<sub>3</sub> à 1,66 ppm, ainsi qu'à un CH<sub>2</sub> résonnant à 4,09 et 4,05

*ppm* (H-15; 2 dd;  $J = 12,8$  et  $6$  Hz), ce dernier est déblindé par la présence de la double liaison et d'un groupement hydroxyle porté par le même carbone. Le  $\text{CH}_3$  résonnant à  $1,66$  *ppm* est couplé également à un  $\text{CH}_2$  résonnant à  $2,17$  et  $1,85$  *ppm* (H-12), lui-même couplé à un autre  $\text{CH}_2$  résonnant à  $1,65$  et  $1,46$  *ppm*.

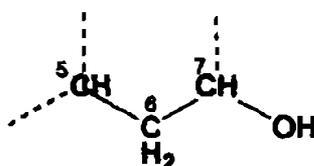
Cet enchaînement nous permet de construire le fragment suivant :



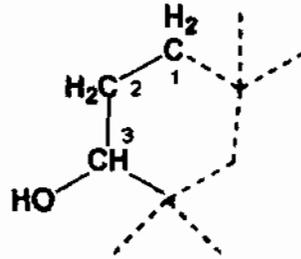
D'autre part, les protons éthyléniques résonnant à  $5,13$  et  $4,86$  *ppm* ( $\text{CH}_2$ -19) montrent une petite corrélation sur le spectre COSY avec un proton résonnant à  $2,17$  *ppm* (H-9). Ce proton est lui corrélé avec un  $\text{CH}_2$  (H-11). Nous avons donc le fragment suivant relié au précédent par le carbone 12 :



Le proton résonnant à  $4,51$  sous forme d'un singulet élargi (H-7) est couplé aux protons résonnant à  $1,82$  et  $1,59$  *ppm* (H-6). Ces derniers sont couplés à un proton apparaissant à  $2,15$  *ppm* (H-5). On a donc le fragment suivant :



D'autre part, le proton à 3,37 *ppm* (H-3) caractéristique d'un groupement CHOH est couplé à un méthylène résonnant à 1,93 et 1,59 *ppm* (H-2). Le spectre COSY montre une corrélation de ce CH<sub>2</sub> avec un autre CH<sub>2</sub> (H-1). Le fragment suivant est donc envisageable :



RMN du carbone 13 :

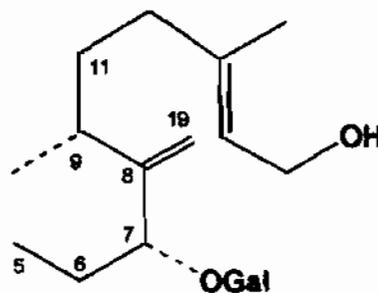
Le spectre de RMN du carbone 13 montre la présence de 26 carbones, dont 4 éthyléniques. Les carbones du Galactose apparaissent à 100,3 *ppm* pour le carbone anomérique et entre 62,6 et 76,6 *ppm*.

HMOC, HMBC :

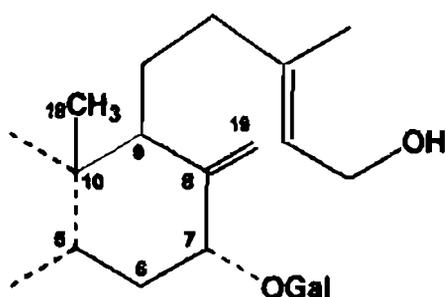
Ensuite, l'examen des spectres de corrélation HMQC et HMBC permettent de relier les différents fragments.

On peut observer par exemple que le proton anomérique (H-1') présente une corrélation avec le carbone résonnant à 78,3 *ppm* (C-7). Le galactose est donc lié à la génine en position 7.

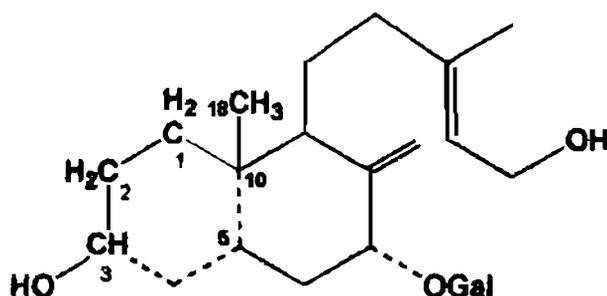
Le proton H-7 corrèle avec les carbones C-5 et C-9, ce qui permet de relier C-7 et C-8 :



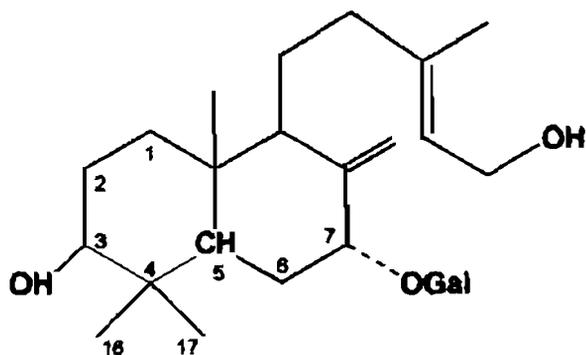
Le carbone C-9, porte le proton H-9 corrélé avec le CH<sub>2</sub>= en position 19, ainsi qu'avec le CH<sub>3</sub> en position 18.



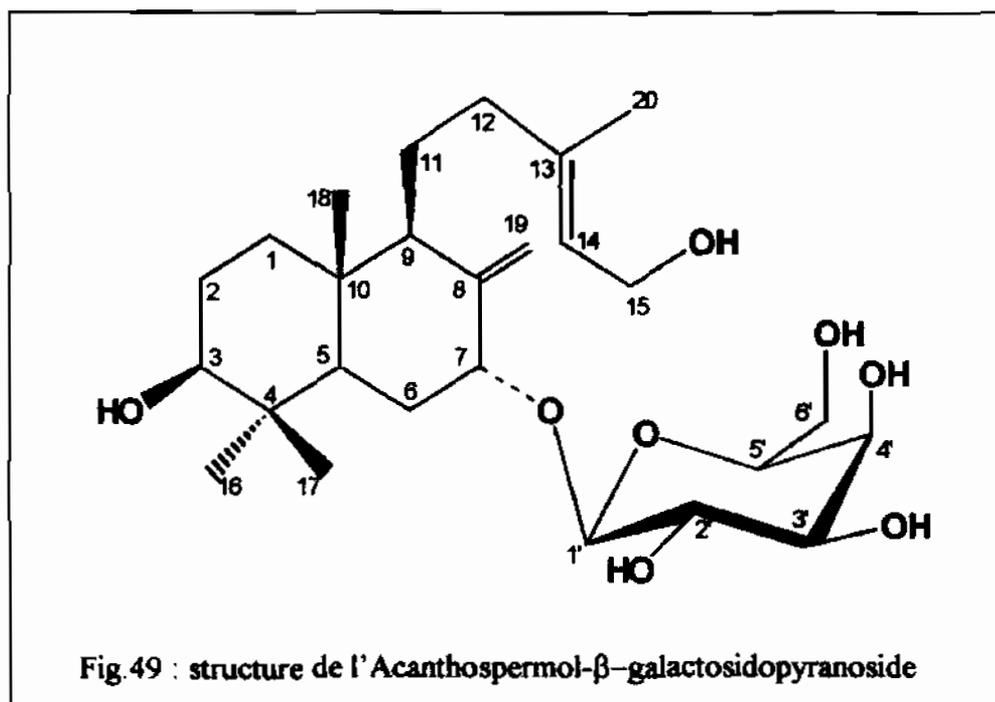
Or, les protons du CH<sub>3</sub> en position 18 peuvent être corrélés au carbone C-1 :



D'autre part, le carbone C-5 peut être relié en  $J^{\beta}$  au 2 méthyles en position 16 et 17. Or ces 2 CH<sub>3</sub> corrélient avec le carbone en position 3 permettant de relier les carbones 3 et 4.



Nous pouvons en conclure que la structure du composé TMP correspond donc à l'Acanthospermol  $\beta$ -Gal, "diterpène galactoside" (figure 49) isolé précédemment de *Acanthospermum hispidum* (Ramachandran et al., 1976). La comparaison des déplacements chimiques observée en RMN du proton avec les données publiées pour ce composé confirme la structure.



**Tableau XX: COSY et HMBC (CD<sub>3</sub>OD; 400,13 MHz) de l'Acanthospermol-β-galactosidopyranoside**

Position	δ <sup>1</sup> H (J Hz)	δ <sup>13</sup> C	COSY	HMBC
1	1,60 m	32,8	H-2	-
	1,46 m		H-2	-
2	1,93 m	27,1	H-1, H-3	-
	1,59 m		H-1, H-3	-
3	3,37 br s	77,0	H-2	-
4	-	38,3	-	-
5	2,15 m	41,8	H-6	C-4, C-10, C-9
6	1,82 m	30,5	-	-
	1,59 m		-	-
7	4,51 br s	78,3	H-6	C-5, C-9, C-1'
8	-	147,7	-	-
9	2,17 m	51,4	H-11, H-19	C-18, C-19
10	-	40,4	-	-
11	1,65 m	22,8	-	-
	1,46 m		-	-
12	2,17 m	39,1	-	C-20

	1,85 m		-	-
13	-	140,4	-	-
14	5,35 br t (6,4)	124,7	H-15, H-20	C-12, C-19, C-20
15	4,09 dd (12,8; 6,0)	59,5	H-14	C-13, C-14
	4,05 dd (12,8; 6,0)		H-14	C-13, C-14
16	0,91 s	29,1	-	C-3, C-4, C-5, C-17
17	0,83 s	22,6	-	C-3, C-4, C-5, C-16
18	0,72 s	14,2	H-1	C-1, C-9, C-10
19	5,13 br s	113,1	H-9, H-19 (4,86)	C-7, C-9
	4,86 br s		H-9, H-19 (5,13)	C-7, C-9
20	1,66 s	16,3	H-12, H-14	C-12, C-13, C-14
1'	4,14 d (7,7)	100,3	H-2'	C-7
2'	3,57 dd (9,6; 7,8)	72,5	H-1', H-3'	C-1', C-3', C-5'
3'	3,43 dd (9,6; 3,4)	74,9	H-2', H-4'	(C-1', C-2', C-4')
4'	3,80 d (3,0)	70,4	H-3', H-5'	C-2', C-3'
5'	3,40 t (7,6)	76,6	H-4', H-6'	(C-1', C-4')
6'	3,74 dd (11,3; 7,8)	62,6	H-5'	C-2', C-4', C-5'
	3,70 dd (11,3; 7,3)		H-5'	C-2', C-4', C-5

### 2.2.2.2.2 Rutine (TJP1)

- Spectrométrie de masse:

Electrospray négatif (ESI-) m/z : 609 (M-H)<sup>-</sup>.

MS/MS sur fragment à m/z 609 : 301 (perte 162 + 146) → aglycone de masse 302.

MS/MS/MS sur fragment à m/z 609 → m/z 301 : 273 (perte 28), 257 (perte 44), 179, 151.

MM = 610

**Formule brute : C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>**

Le composé TJP1 qui est la rutine, a été isolé sous forme d'une poudre amorphe jaune-orangé et apparaît en tache jaune par chromatographie analytique à l'acide sulfurique qui est le révélateur.

Le spectre de masse en électrospray négatif montre une masse de 610 uma, correspondant à la formule brute C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>. La perte du fragment à m/z 301 (MS/MS) correspond à la perte de 308 = 162 + 146, et indique la perte d'un pentose + un hexose. Ce composé est un glycoside et l'aglycone présente une masse de 302 uma.

### • Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre de RMN du proton de TJP1 est caractéristique d'un flavonoïde hétérosidique. Le doublet à 1,11 ppm (6 Hz) peut être attribué au méthyle du rhamnose. Le proton anomérique résonne à 5,10 ppm (d, 7,7 Hz). Les autres protons correspondant aux sucres apparaissent entre 3,89 et 3,24 ppm.

Les signaux de la génine apparaissent à haut champ : un système ABX (7,66 ppm, d, 2 Hz; 6,87 ppm, dd, 2 et 8,5 Hz; 6,87 ppm, d, 8,5 Hz) correspondant aux protons du cycle C trisubstitué et deux singulets à 6,40 et 6,21 ppm (H-8 et H-6) attribuables aux protons du cycle A.

Le spectre du carbone 13 montre la présence de 27 carbones et correspond au spectre d'un flavonoïde porteur de 2 sucres. A 17,9 ppm apparaît un pic caractéristique du méthyle du rhamnose, puis entre 104,7 et 68,6 ppm apparaissent les autres carbones des sucres, les carbones anomériques résonnant à 104,7 ppm pour le glucose et 102,4 ppm pour le rhamnose. Le carbone 6 du glucose apparaît à 68,6 ppm, ce déplacement chimique est caractéristique d'une liaison dans cette position.

Les carbones de la génine résonnent entre 94,9 ppm et 179,4 ppm (C=O). Cette structure correspond à la rutine (figure 50).

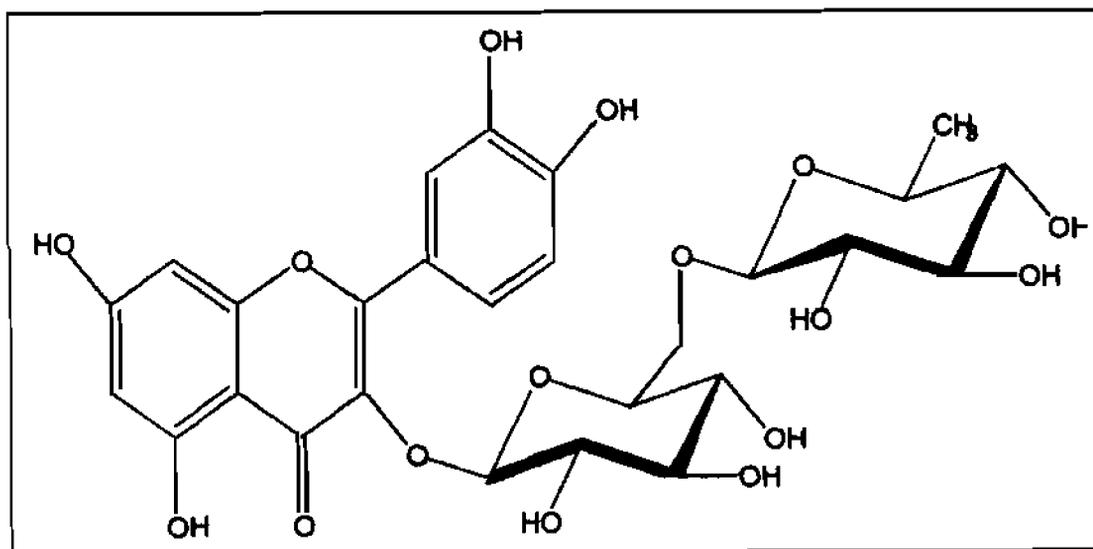


Fig. 50: structure chimique de la rutine

**Tableau XXI : RMN H<sup>1</sup> et C<sup>13</sup> (CD<sub>3</sub>OD; 500,13 MHz) de la rutine (TJP1)**

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (JHz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	Référence <sup>13</sup> C (DMSO, eau deutériés)
2	-	159,4 <sup>a</sup>	156,4
3	4,51 br s	135,6	133,6
4	-	179,4	177,4
5	-	163,0	161,2
6	6,21 d (2)	100,0	98,8
7	-	166,1	164,0
8	6,40 d (2)	94,9	93,6
9	-	158,5 <sup>a</sup>	156,6
10	-	105,6	105,2
1'	-	123,1	121,6
2'	7,66 d (2)	116,0	115,3
3'	-	145,9	144,6
4'	-	149,8	148,3
5'	6,87 d (8,5)	117,7	116,3
6'	7,63 dd (8,5)	123,5	121,6
1-glc	-	104,7	103,4
2-glc		75,7	75,3
3-glc		78,2	77,4
4-glc		71,4	71,1
5-glc		77,2	76,6
6-glc		68,6	68,7
1-rha		102,4	102,0
2-rha		72,1 <sup>b</sup>	71,5
3-rha		72,2 <sup>b</sup>	71,7
4-rha		73,9	73,2
5-rha		69,7	69,7
6-rha	1,11 d (6,2)	17,9	18,6

<sup>a, b</sup> : les déplacements peuvent être intervertis

### 2.2.2.3 Elucidation structurale du produit isolé de *C. siamea*

- Spectrométrie de masse

MM = 232

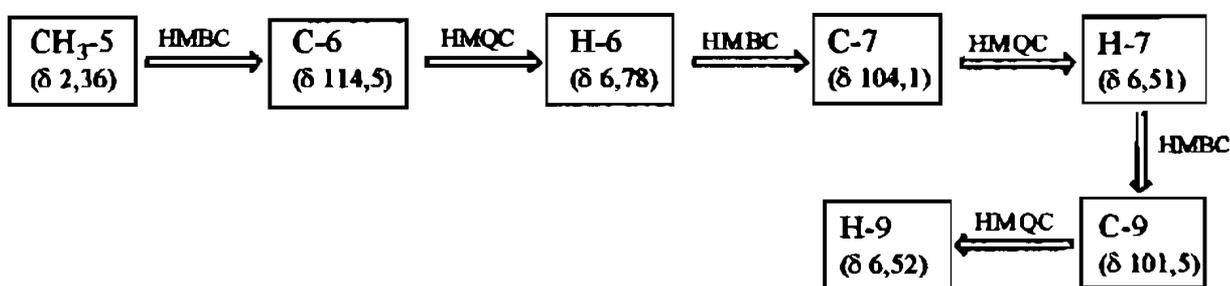
Formule brute :  $C_{13}H_{12}O_4$

- Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre de RMN du proton du produit CS1 montre, à champ fort, la présence de 2 singulets de 3 protons chacun (2,25 et 2,36 ppm) correspondant à 2 groupements méthyles. A champ faible, on observe la présence de 4 protons résonnant sous forme de 2 singulet à 6,78 et 6,13 ppm, et de 2 doublets à 6,51 et 6,52 ppm ( $J = 1,8$  Hz), ces derniers correspondant à 2 protons couplés en *méta*.

L'association des spectres du carbone 13 et HMQC montre la présence de 2  $CH_3$  à 21,9 et 20,1 ppm ainsi que des signaux très déblindés correspondant à 4 CH et 7 C, appartenant à une structure fortement conjuguée (pseudoaromatique).

La structure de CS1 correspond au barakol (figure 51) comme le montre l'analyse des spectres de corrélation associés aux spectres monodimensionnels. L'association des spectres HMQC et HMBC a permis d'attribuer les différents signaux. Par exemple, on peut relier les protons du  $CH_3$  en 5 au proton H-9 de la molécule par l'intermédiaire des protons H-6 et H-7 :



Les protons H-7 et H-9 sont corrélés au carbone C-8, résonnant à 166,1 ppm en raison de la présence d'un groupement OH en position 8.

Les protons H-3, H-6, H-7 et H-9 présentent une corrélation avec le carbone quaternaire résonnant à 111,6 ppm et qui peut être situé en 3b. Ce dernier, présente une corrélation  $J^3$  avec le proton H-3, lui-même relié au deuxième méthyle en position 2.



La présence des oxygènes en position 1 et 4 est déduite du déplacement chimique des carbones : C-2, C-9a sont déblindés par le présence d'un oxygène en position 1, alors que C-3a, C-5, C-9a sont déblindés par le présence d'un oxygène en position 4.

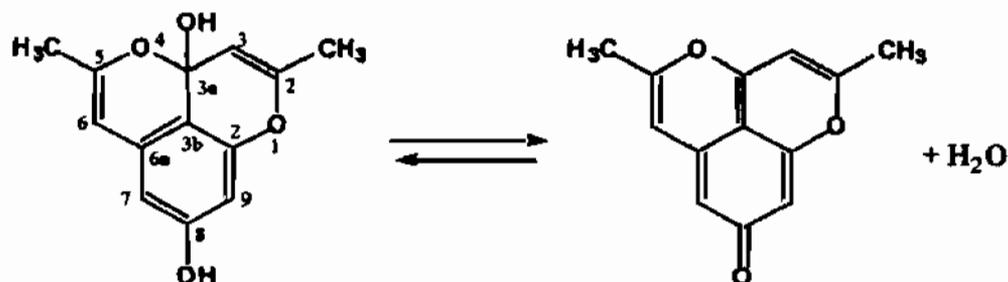


Fig. 51: structure chimique du barakol

Tableau XXII : HMBC (CD<sub>3</sub>OD; 500,13 MHz) du barakol

Position	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC
2	-	164,1	-
3	6,13 s	103,1	C-2, C-3a, C-3b, C-6a, CH <sub>3</sub> -2
3a	-	150,9	-
3b	-	111,6	-
5	-	148,6	-
6	6,78 s	114,5	C-5, C-3b, C-6a, C-7, C-9a, CH <sub>3</sub> -5
6a	-	139,7	-
7	6,51 d (1,8)	104,0	C-3a*, C-3b, C-6, C-6a, C-8, C-9
8	-	166,1	-
9	6,52 d (1,8)	101,5	C-3a*, C-3b, C-7, C-8, C-9a
9a	-	157,2	-
CH <sub>3</sub> -2	2,25 s	20,1	C-2, C-3
CH <sub>3</sub> -5	2,36 s	21,9	C-5, C-6

\* corrélation observée avec l'un des protons en position 7 ou 9.

Les travaux phytochimiques réalisés sur *C. siamea* ont permis d'isoler le Barakol qui était le produit majoritaire identifié. Cette molécule présente une structure de base d'un alcaloïde déjà isolé par Samia et collaborateurs (1984). Nous confirmons cette structure trouvée. Cependant nous avons mis en évidence pour la première fois son activité antiplasmodiale contrairement au autres études précédentes avaient mis en évidence son effet anxiolytique et sa la structure (Fiorino *et al.*, 1998 ; Thongsaard *et al.*, 1997, 1996).

#### 2.2.2.4 Produits isolés de *T. macroptera*

##### 2.2.2.4.1 Arjungénine (TmE2)

- **Spectrométrie de masse**

Electrospray négatif (ESI) : 503 (M-H)<sup>-</sup>, 485 (M-H<sub>2</sub>O-H, perte d'eau), 473 [(M-CH<sub>2</sub>=O-H)<sup>-</sup>, groupement CH<sub>2</sub>-OH], 441 [(M-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>)<sup>-</sup> ; perte de COOH].

Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> ; MM = 504.

Le produit TmE2 nommé arjungénine, est un triterpène comme le montre la tache bleu-violette avec la vanilline sulfurique qui est un révélateur des triterpènes.

Le spectre de masse (ESI -) montre un pic de masse à 503 (M-H)<sup>-</sup>, correspondant à la formule brute C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> (MM = 504). Les fragments à 473 et 441 indiquent la présence d'un groupement CH<sub>2</sub>-OH et d'un groupement COOH.

- **Résonance Magnétique Nucléaire**

##### RMN du proton (400,13 MHz) :

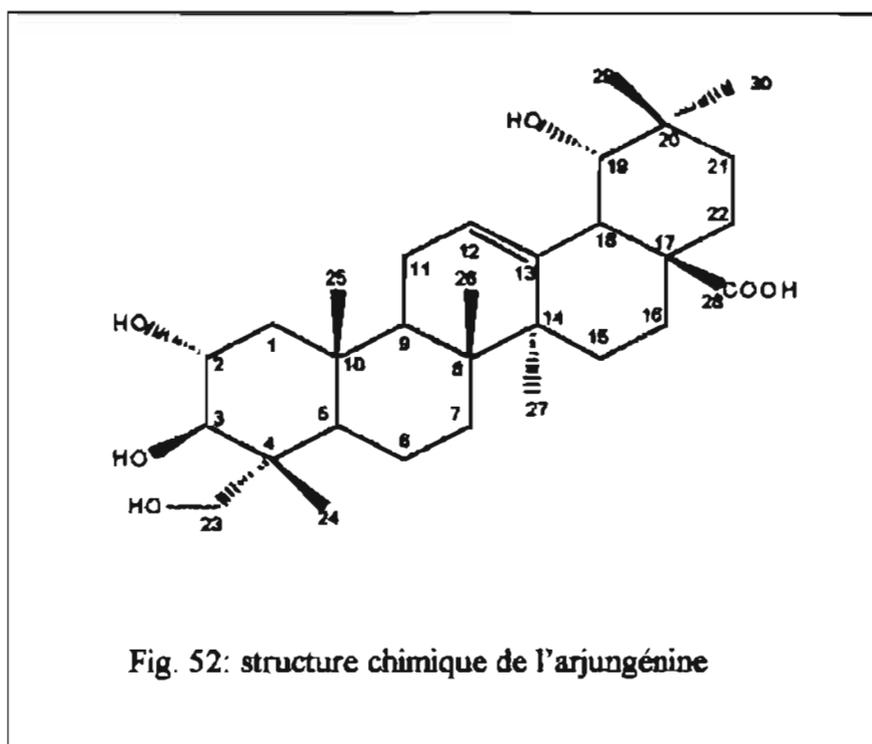
Le spectre de RMN du proton de TmE2 est caractéristique d'un triterpène oxygéné. Il montre les signaux correspondant à un proton oléfinique ( $\delta_H$  5,37 brs), à 5 groupements méthyles ( $\delta_H$  0,70 s; 0,78 s; 0,92 s; 0,96 s; 1,02 s; 1,30 s) ainsi qu'à des groupements hydroxyméthines ( $\delta_H$  3,25 d ; 3,35 d; 3,49 d; 3,68 ddd).

##### RMN du carbone 13:

Ceci est confirmé par le spectre de RMN du C<sup>13</sup> qui montre la présence de 30 carbones. Le déplacement chimique des carbones oléfiniques ( $\delta_c$  124,5 et 145,0) suggèrent une structure de type triterpénique pentacyclique avec un squelette oléanane présentant une double liaison en

C-12 (tableau XXIII). Les déplacements chimiques observés sont identiques à ceux décrits pour l'arjungénine (figure 52) (Mahato *et al.*, 1994).

L'arjungénine fut isolée précédemment des écorces de *Terminalia macroptera* en 1998 (Conrad *et al.*, 1998).



**Tableau XXIII : RMN  $H^1$  et  $C^{13}$  ( $CD_3OD$ ; 400,13 MHz) de l'arjungénine**

Position	$\delta H^1$ (J/Hz)	$\delta C^{13}$	Référence $C^{13}$
1	-	47,7	47,4
2	3,68 ddd (9,5; 4,8; 2,5)	69,7	68,9
3	3,35 d (9,5)	78,4	78,4
4	-	44,1	43,6
5	-	48,4	48,2
6	-	19,3	18,8
7	-	33,4	33,6
8	-	40,7	40,1
9	-	48,6	48,5
10	-	39,2	38,6
11	-	28,7	28,8
12	5,37 br s	124,5	123,5

13	-	145,0	144,9
14	-	42,7	42,2
15	-	29,5 <sup>b</sup>	29,2
16	2,23 m	24,9	24,3
17	-	46,9	46,0
18	3,08 br s	45,4	44,8
19	3,25 d (4)	82,7	81,3
20	-	36,0	35,7
21	-	29,6 <sup>b</sup>	28,4
22	-	34,2	33,1
23	3,49 d (11)	66,5	66,8
24	0,78 s <sup>a</sup>	13,8	14,2
25	1,02 s	17,9	17,7
26	0,70 s <sup>a</sup>	17,4	17,3
27	1,30 s	25,1 <sup>c</sup>	24,9
28	-	183,3	180,8
29	0,92 s	28,7	29,2
30	0,96 s	25,2 <sup>c</sup>	24,9

<sup>a, b, c</sup> : les déplacements peuvent être intervertis.

#### 2.2.2.4.2 Acide séricique (TmF2)

- Spectrométrie de Masse :

Electrospray négatif (ESI) : 503 (M-H)<sup>-</sup>, 485 (M-H<sub>2</sub>O-H, perte d'eau), 473 ((M-CH<sub>2</sub>=O-H)<sup>-</sup>, groupement CH<sub>2</sub>-OH), 441 (M-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>)<sup>-</sup> ; perte de COOH en C28).

**Formule brute :** C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub>; MM = 504.

Le spectre de masse ESI- du composé TmE2 est identique à celui de l'arjungénine.

- Résonance Magnétique Nucléaire

RMN du proton (400,13 MHz) :

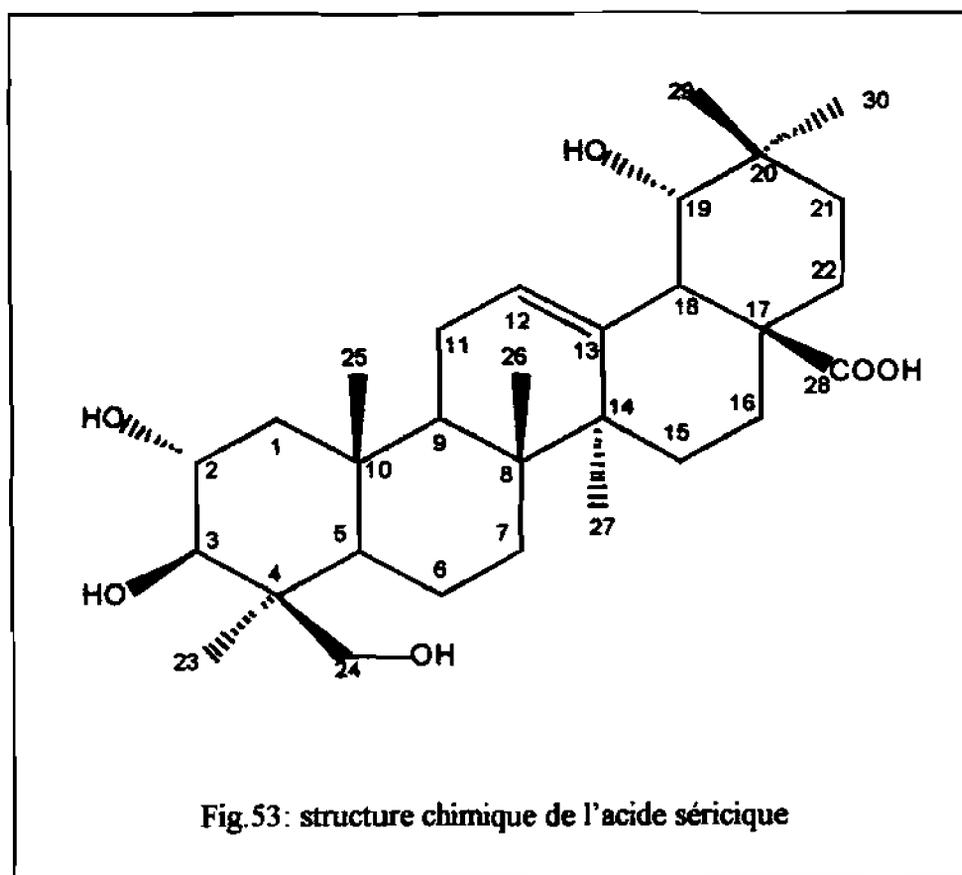
Le spectre de RMN du proton de TmF2 présente de grandes similitudes avec celui de TmE2 : un proton oléfinique ( $\delta_H$  5,31 brs), 5 groupements méthyles ( $\delta_H$  0,74 s; 0,92 s; 0,95 s; 0,97 s; 1,22 s; 1,28 s) et 4 groupements hydroxyméthines ( $\delta_H$  3,25 d ; 3,35 d; 3,49 d; 3,68 ddd).

### RMN du carbone 13:

L'acide séricique (TmF2) présente 30 carbones et une structure très proche de TmE2. En effet, la plupart des déplacements chimiques sont similaires à ceux de TmE2. Quelques déplacements sont modifiés en position 3, 5, 11, 16, 23 et 24. Le déplacement chimique des carbones 23 et 24 ( $\delta_c$  23,7 ; 66,2) indique que le groupement hydroxyméthylène est situé en position 24 (Hosup et al., 1998).

L'analyse des spectres de corrélation COSY, HMQC et HMBC ont permis les attributions précises des différents signaux (tableau XXIV). TmF2 correspond donc à un isomère de l'arjungénine, l'acide séricique (figure 53). la comparaison avec les données de la littérature a permis de confirmer la structure de TmF2 (Hosup et al., 1998).

L'acide séricique fut isolé précédemment des écorces de *Terminalia macroptera* en 1998 (Conrad et al., 1998).



**Tableau XXIV : RMN H<sup>1</sup> et C<sup>13</sup> (CD<sub>3</sub>OD; 400,13 MHz) TmF2**

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (J Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	COSY	HMBC
1	1,92 dd (4; 12,5) 0,89 m	47,7	H-1 (0,89), H-2, H-3 H-2	- -
2	3,77 ddd (9,8; 4,3; 2,9)	69,6	H-1, H-2	C-1, C-3
3	3,04 d (9,6)	86,0	H-1 (1,92), H-2	C-4, C-2, C-23, C-24
4	-	44,4	-	-
5	0,98 m	57,3	-	-
6	1,61 m 1,46 m (ou sext)	20,0	- -	- -
7	0,89 m 1,31-1,77 m	34,0	- -	- -
8	-	40,7	-	-
9	1,76 m ( ou q)	49,3	H-11	-
10	-	39,2	-	-
11	1,98 m 1,00 m	25,1	H-9 -	- -
12	5,30 br s	124,6	H-11 (1,98)	C-9, C-13, C-14, C-18
13	-	144,8	-	-
14	-	42,6	-	-
15	0,97-,095 m	29,5 <sup>a</sup>	-	-
16	2,28 m (td?) 1,61 m	28,6 <sup>b</sup>	H-15, H-16 (1,61) -	C-15, C-17, C-28 -
17	-	46,7	-	-
18	3,04 m	45,2	H-19	C-12, -13, -14, -16, -17, -28
19	3,24 d (3,4)	82,4	H-18	C-17, -18, -20, -21, -29, -30
20	-	36,0	-	-
21	1,00-1,76 m	29,4 <sup>a</sup>	-	-
22	1,31-1,76 m	34,2	-	-
23	1,22 s	23,7	H-24 (4,02)	C-2, C-3, C-4, C-23
24	4,02 d (11,1) 3,39 d (11,1)	66,2	H-24 (3,39), H-23 H-24 (4,02), H-3	C-3, C-4, C-5, C-23 C-3, C-4, C-5, C-23
25	0,97 s	17,4	-	C-1, C-4, C-9, C-10
26	0,74 s	17,6	-	C-7, C-8, C-9, C-14
27	1,28 s	25,1	-	C-8, C-14, C-15
28	-	182,5	-	-
29	0,92 s	28,7 <sup>b</sup>	-	C-19, C-20, C-21, C-30
30	0,95 s	25,1	-	C-19, C-20, C-21, C-29
OH	3,30 brs	-	-	-
OH	4,59 brs	-	-	-

<sup>a, b</sup> : les déplacements peuvent être intervertis

### 2.2.2.4.3 Séricoside (TmE1)

- **Spectrométrie de Masse:**

Electrospray positif (ESI) :  $m/z$  689 ( $MNa^+$ ),

MS/MS sur fragment à  $m/z$  689 : 527 ( $MNa^+ - 162$ , perte d'un hexose)

-> MS/MS/MS sur fragment à  $m/z$  527 -> 483 ( $MNa^+ - 44$ , perte  $CO_2$ )

**Formule brute :  $C_{36}H_{58}O_{11}$  ; MM = 666**

TmE1 présente une masse de 666 uma, correspondant à la formule brute  $C_{36}H_{58}O_{11}$ . On observe sur le spectre une perte de 162 par rapport au pic de masse, suivie d'une perte de 44, ce qui indique la présence d'un groupement COOH estérifié par un hexose. La génine présente une masse de 504, ce composé est donc probablement un hétéroside dérivé de l'arjungénine ou de l'acide séricique.

- **Résonance Magnétique Nucléaire**

RMN du proton (400,13 MHz) :

Le spectre de RMN du proton de TME1 est très semblable à celui de l'acide séricique. Les seules différences sont : un doublet à 5,36 ppm (8Hz) correspondant au proton anomérique d'un hétéroside et dans les zones de 3,26-3,32 ppm et 3,82-3,74 ppm des signaux supplémentaires correspondant aux autres protons du sucre.

RMN du carbone 13:

Le spectre de RMN du  $C^{13}$  qui montre la présence de 36 carbones. Les déplacements chimiques sont comparés à ceux de l'arjungénine et ceux de l'acide séricique. On remarque notamment que les déplacements chimiques des méthyles en position 23 et 24 permettent de positionner le groupement  $CH_2OH$  en position 24. Ceci confirme que la génine correspond donc à l'acide séricique. Les signaux correspondant au sucre peuvent être identifiés à ceux du glucose (tableau XXV).

Le composé TmE1 correspond donc au sérinoside (figure 54). Il fut isolé également des écorces de *Terminalia macroptera* en 1998 (Comad et al., 1998).

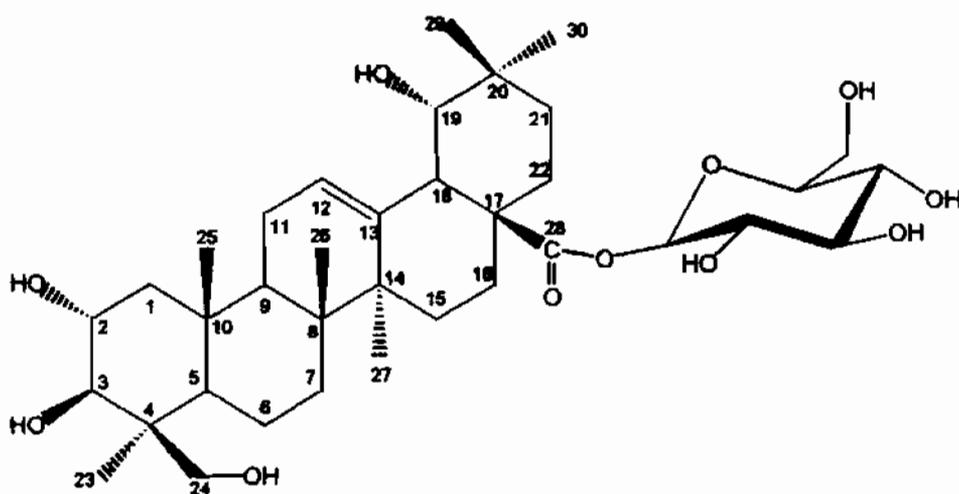


Fig.54 : structure chimique de la séricoside

Tableau XXV : RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 400,13 MHz) du séricoside (TmE1)

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (J Hz) TME1	$\delta$ $^{13}\text{C}$ TME1	$\delta$ $^{13}\text{C}$ TME2	$\delta$ $^{13}\text{C}$ arjungénine
1		47,7	47,7	47,7
2		69,6	69,6	69,7
3	3,03 d (9,6)	<u>86,0</u>	<u>86,0</u>	<u>78,4</u>
4		44,4	44,4	44,1
5		<u>57,3</u>	<u>57,3</u>	<u>48,4</u>
6	1,45 m	20,0	20,0	19,3
7		33,3	34,0	33,4
8		40,9	40,7	40,7
9		49,4	49,3	48,6
10		39,2	39,2	39,2
11		<u>25,11</u>	<u>25,1</u>	<u>28,7</u>
12	5,32 t (3,2)	124,7	124,6	124,5
13		144,4	144,8	145,0
14		42,6	42,6	42,7
15		29,5 <sup>b</sup>	29,5 <sup>a</sup>	29,5 <sup>b</sup>
16	2,32 m	<u>29,4<sup>b</sup></u>	<u>28,6<sup>b</sup></u>	<u>24,9</u>
17		47,1	46,7	46,9
18	3,03 m	45,1	45,2	45,4
19		82,4	82,4	82,7
20		36,0	36,0	36,0
21		28,4	29,4 <sup>a</sup>	29,6 <sup>b</sup>
22		34,1	34,2	34,2

23	1,22 s <sup>a</sup>	23,7	23,7	66,5
24	4,02 d (11,1) 3,39 d (11,1)	66,2	66,2	13,8
25	0,94 s <sup>a</sup>	17,7	17,4	17,9
26	0,72 s	17,4	17,6	17,4
27	1,28 s	25,2	25,1	25,1 <sup>c</sup>
28	-	178,5	182,5	183,3
29	0,93 s <sup>a</sup>	28,6	28,7 <sup>b</sup>	28,7
30	0,97 s <sup>a</sup>	24,9	25,1	25,2 <sup>c</sup>
1'	5,36 d (8)	95,8		
2'		73,9		
3'		78,3		
4'		71,1		
5'		78,7		
6'		62,4		

Les spectres de la RMN et de la SM ont permis d'identifier les molécules pures isolées de *Termanalia macroptera*. Il s'agit de TmA, la séricoside (TmE1), l'arjungénine (TmE2), l'acide séricique (TmF2), et la TmF1. Ces molécules ne sont pas nouvelles car elles ont été isolées dans la même plante lors des travaux précédents. Nous confirmons l'existence de ces molécules dans la plante qui sont conformes à celles trouvées par d'autres auteurs (Conrad et al., 2001, 1998 ; Nongomierua et al., 1990, 1988 ; Silva et al., 2000). Les mêmes types de molécules ont été isolées dans d'autres espèces de la plante comme *Terminalia bellerica* (Nandy et al., 1989 ; Mahato et al., 1990), *Terminalia chebula* (Puping et al., 1992), *Trachelospermum asiaticum* (Abe et al., 1987), *Terminalia arjuna* (Honda et al., 1976).

**Remarques :** Les spectres de la RMN ont montré que TmA avait la même configuration que le composé TmE1 mais on note la présence d'une molécule de glucose. C'est pour cela que le nom provisoire est intitulé arjunglucoside. En outre, le produit TmF1 avait la même configuration que celle de TmE2. La spectrométrie de masse a confirmé ces résultats par le fait que TmF1 a le même poids moléculaire que TmE2. Cette ressemblance structurale peut être due simplement à une interversion d'atome (H par exemple) ou de groupement d'atomes (OH, CH<sub>3</sub>) sur des carbones différents proches. Des tests de confirmation sont nécessaires pour donner la structure exacte de TmA et TmF1.

### 3. Tests biologiques

#### 3.1 Extraits bruts

Les résultats des tests de l'activité antiparasitaire réalisés sur les extraits alcaloïdiques bruts, aqueux (décoctés), chloroformiques, méthanoliques et hydrométhanoliques sont présentés dans le Tableau XV. Les valeurs présentées correspondent aux CI<sub>50</sub> relevées des extraits sur les souches de *Plasmodium falciparum* après 48h d'incubation.

**Tableau XV : Résultats des tests préliminaires antiparasitaires sur les extraits bruts**

Plante	Extraits bruts				
	alcaloïdes	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH(50%)	H <sub>2</sub> O
<i>P. crassipes</i>	<4	>10	>10	>10	> 500
<i>C. siamea</i>	4<CI <sub>50</sub> <10	>10	>10	>10	23,15
<i>T. macroptera</i>	>10	>10	>10	>10	1
<i>A. hispidum</i>	4< CI <sub>50</sub> <10	>10	>10	>10	64
<i>C. febrifuga</i>	4< CI <sub>50</sub> <10	>10	>10	>10	187
<i>F. agrestis</i>	4< CI <sub>50</sub> <10	>10	>10	>10	182
<i>F. sycomorus</i>	4< CI <sub>50</sub> <10	>10	>10	>10	430
(feuilles)					
<i>F. sycomorus</i>	>10	>10	>10	>10	63
(écorces)					

Suite à une recherche bibliographique, nous avons retenu 4 plantes en fonction des critères suivants: i) pas d'étude ou pas d'étude approfondie sur la plante; ii) plantes les plus fréquemment citées par les personnes rencontrées lors de l'enquête ethnobotanique ; iii) plantes dont les extraits bruts présentent une bonne activité antiplasmodiale. Les quatre plantes sélectionnées ont été soumises à des études phytochimiques approfondies afin d'isoler les molécules et évaluer leur activité antiparasitaire sur le *Plasmodium falciparum*.

## **3.2 Extraits totaux et substances isolées**

### **3.2.1 Tests parasitologiques sur les souches de référence**

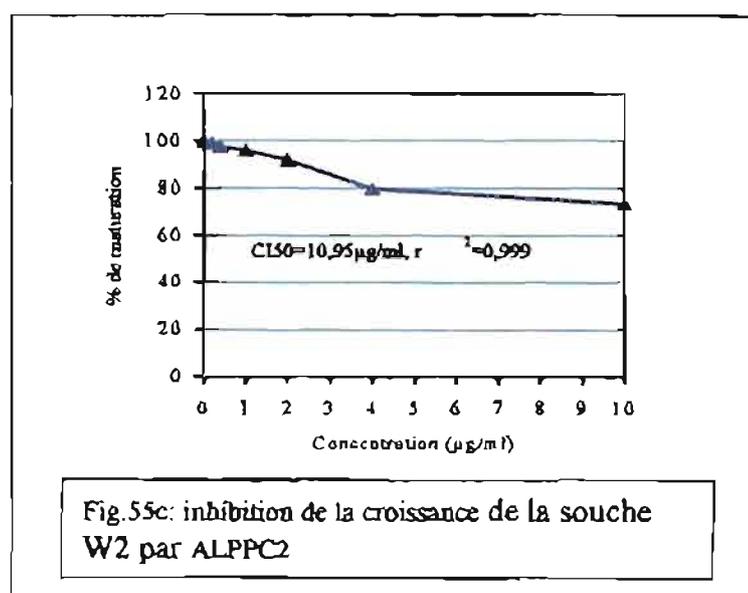
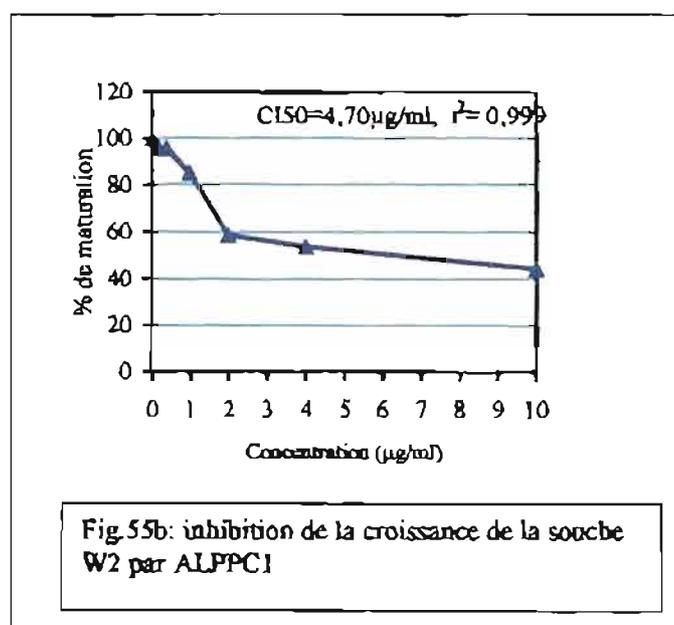
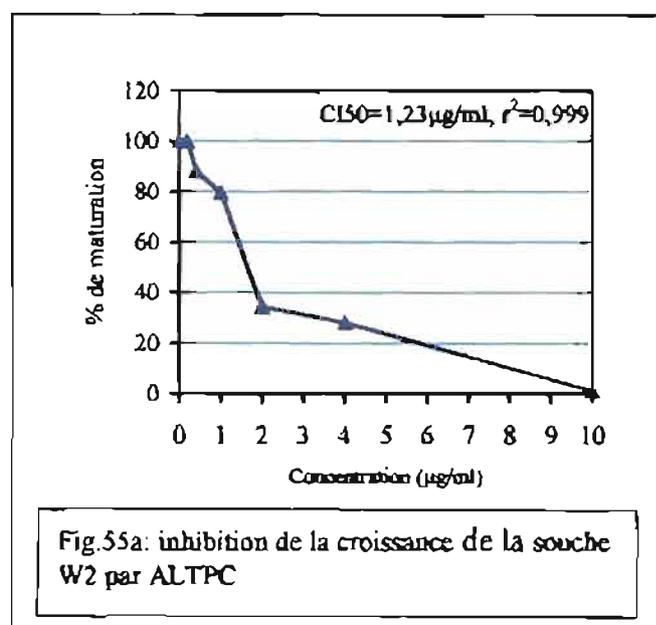
Les tests antiparasitaires réalisés avec les extraits totaux et les produits pur ont donné des résultats présentés sous deux formes. Les valeurs des parasitémies sont consignées dans les tableaux en fonction des concentrations des produits testés. A partir des ces valeurs et pour la clarté du document, les pourcentages de croissance ont été calculés ; ce qui a permis de tracer des courbes (% de croissance en fonction de la concentration des produits purs ou des extraits totaux). L'allure de ces courbes exprime ici le pouvoir inhibiteur des produits végétaux testés. La décroissance de la courbe de la concentration nulle (témoin positif) à la forte concentration signifie l'inhibition de la croissance des parasites par les produits. Ainsi lorsque le pourcentage de croissance est forte, le pourcentage d'inhibition est faible et vis versa. Ces observations ont permis de voir l'activité antiparasitaire de des plantes étudiées. Certains produits ont pu être faits que sur la souche W2 (chloroquino-résistante) du fait que la croissance la souche 3D7 (chloroquino-sensible) ne permettant l'évaluation de l'activité antiparasitaire.

#### **3.2.1.1 Tests antiparasitaires avec les extraits de *Pavetta crassipes***

Les résultats antiparasitaires obtenus à partir des extraits végétaux de cette plante sont présentés sous forme de tableaux et figures ci-dessous. Les extraits alcaloïdes totaux (ALTPC) et alcaloïdes purs (ALPPC1= Elaeocarpidine, ALPPC2 = Hydroxyélaeocarpidine) ont été testés sur deux souches de référence 3D7 et W2. Les valeurs de la parasitémie obtenues après lecture au cytomètre en flux, sont consignés dans les tableaux XXVI et XXVII. La meilleure activité inhibitrice de la croissance des parasites a été donnée par ALTPC avec des  $CI_{50}$  de 1,23  $\mu\text{g/ml}$  (W2) et 3,45  $\mu\text{g/ml}$  (3D7). L'élaeocarpidine a donné un pouvoir inhibiteur de la croissance moins important que celui de ALTPC avec des  $CI_{50}$  de 4,70  $\mu\text{g/ml}$  (W2) et 10,95  $\mu\text{g/ml}$  (3D7). L'hydroxyélaeocarpidine a été le moins actif que les autres avec une  $CI_{50}$  de 10,70  $\mu\text{g/ml}$  sur la souche W2. Ces valeurs exprimées en pourcentage de croissance ont été représentées en courbes de pourcentage de croissance en fonction de la concentration (figures 55a, 55b, 55c et 56a, 56b).

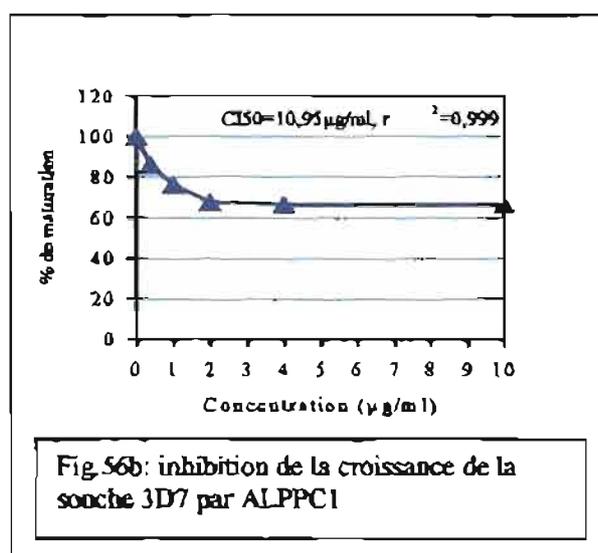
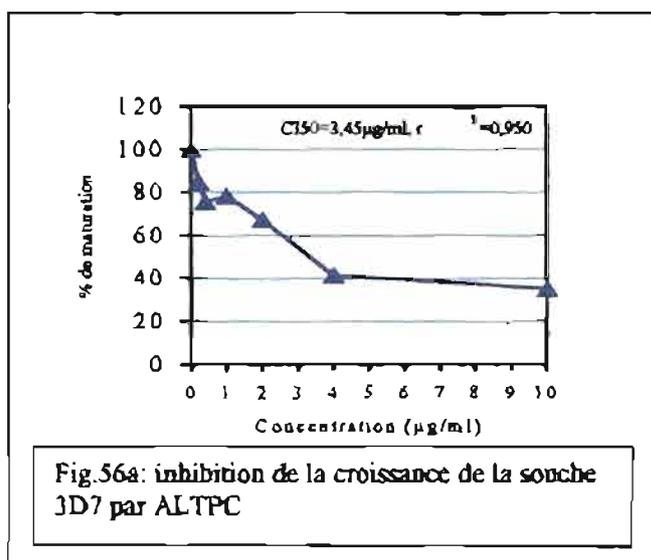
**Tableau XXVI : valeurs exprimant la croissance de la souche chloroquino-résistante W2 sous l'effet de des extraits de *P. crassipes***

Extraits	Concentrations (µg/ml)							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	0 (T+)	0,2	0,4	1	2	4	10	
ALTPC	7,14	8,38	6,31	5,68	3,47	2,02	1,39	<b>1,23</b>
ALPPC1	4,02	3,86	3,83	3,42	2,35	2,16	1,78	<b>4,70</b>
ALPPC2	4,02	3,98	3,92	3,85	3,69	3,2	2,94	<b>10,85</b>



**Tableau XXVII: valeurs exprimant l'effet des extraits de *P. crassipes* sur la croissance de la souche 3D7**

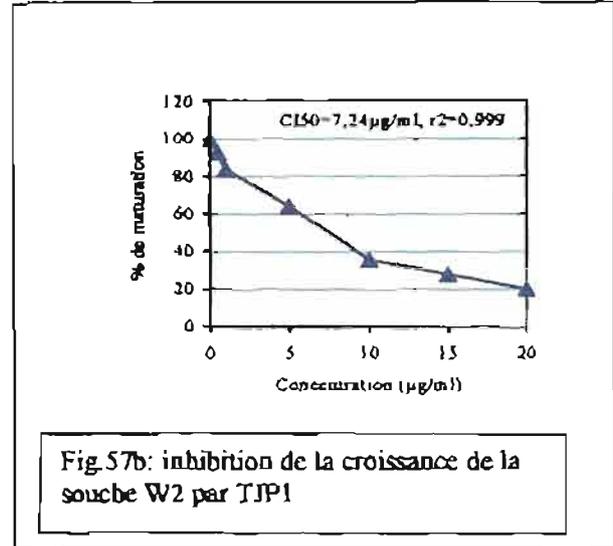
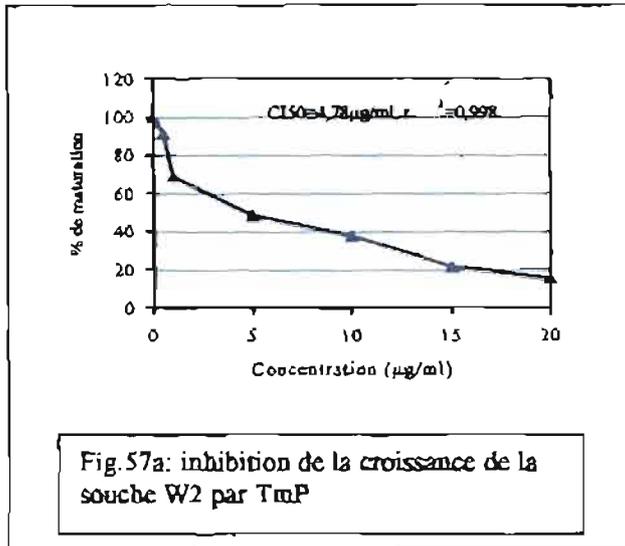
Extraits	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0 (T+)	0,2	0,4	1	2	4	10	
ALTPC	7,13	6,05	5,39	5,59	4,8	2,97	2,51	3,45
ALPPC1	7,13	-	6,15	5,45	4,84	4,76	4,74	10,95



Dans la même plante, des extraits alcooliques ont fait l'objet de tests antiparasitaires avec la souche W2. Ils n'ont été testés sur la souche 3D7 à cause de sa mauvaise croissance. L'extrait le plus actif a été le TMP qui a donné une  $CI_{50}$  de 4,78  $\mu\text{g/ml}$ . Le moins actif a été le produit TJP1 avec une  $CI_{50}$  de 7,24  $\mu\text{g/ml}$ . Les résultats en parasitémie sont représentés dans le tableau ci-dessous (tableau XXVIII) et les courbes correspondantes en pourcentage de croissance sont présentées par les figures 57a et 57b.

**Tableau XXVIII : valeurs exprimant l'effet des extraits méthanoliques de *P. crassipes* sur la croissance de la souche W2**

Extrait	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0 (T+)	0,5	1	5	10	15	20	
TMP	9,16	8,38	6,31	4,45	3,47	2,02	1,39	4,78
TJP1	13,6	12,65	11,43	8,74	4,86	3,82	2,76	7,24



### 3.2.1.2 Tests antiparasitaires avec les extraits de *T. macroptera*

Les tests antiparasitaires ont été faits avec les produits purs isolés des extraits de *T. macroptera*. Certains des produits ont été testés sur la souche W2 uniquement et d'autres sur les deux souches. Les valeurs de la parasitémie obtenus sont exprimées dans les tableaux XXIX, XXX, et XXXI. Les valeurs de la parasitémie montrent une bonne inhibition de la croissance de la souche 3D7 du produit TmE1 avec une  $CI_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$  contre  $14,86 \mu\text{g/ml}$  pour TmF1 et  $15,74 \mu\text{g/ml}$  pour TmA. Les courbes représentatives montrant l'inhibition de la croissance des parasites sont exprimées par les figures 58a, 58b et 58c.

**Tableau XXIX : valeurs exprimant l'effet des extraits de *T. macroptera* sur la croissance de la souche 3D7**

Extraits	Concentration (µg/ml)								CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	0 (T+)	1	2	5	10	25	50	100	
TmA	6,81	6,91	6,54	5,63	4,68	2,05	1,37	-	15,74
TmE1	3,76	-	-	3,13	1,85	1,73	1,29	0,60	7,00
TmF1	3,76	-	-	3,50	2,10	1,66	1,17	0,70	14,86

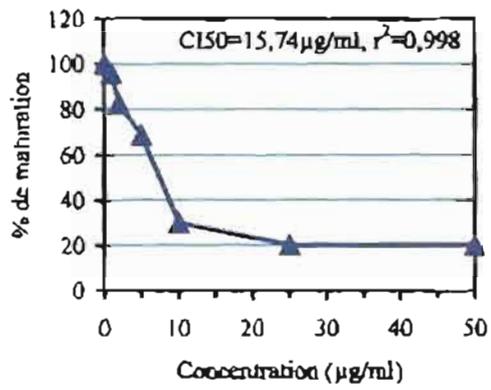


Fig. 58a: inhibition de la croissance de la souche 3D7 par TmA

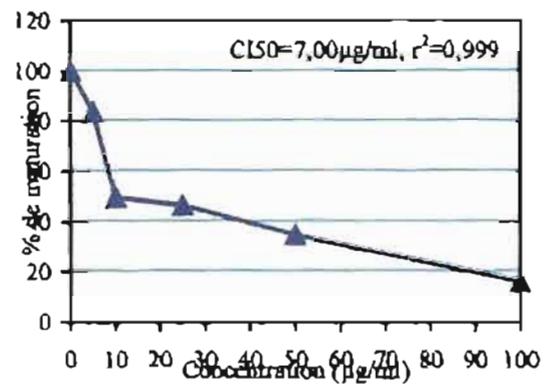


Fig. 58b: inhibition de la croissance de la souche 3D7 par TmE1

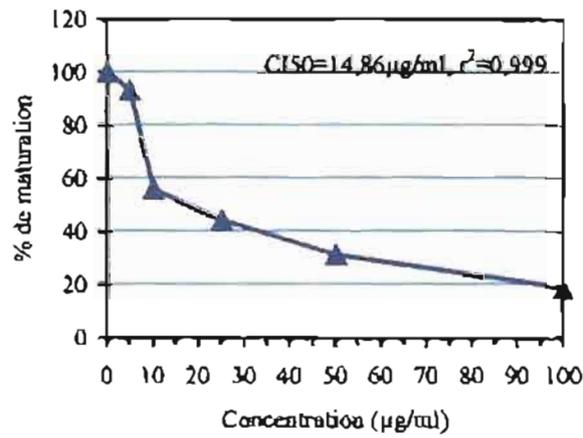
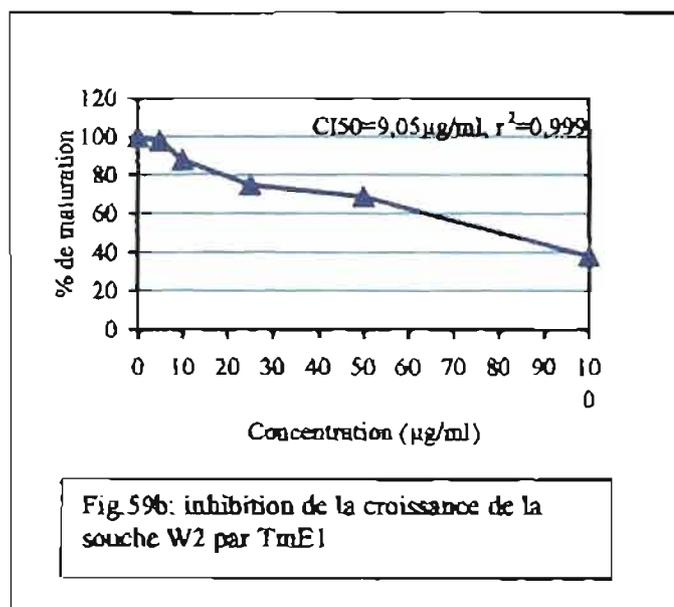
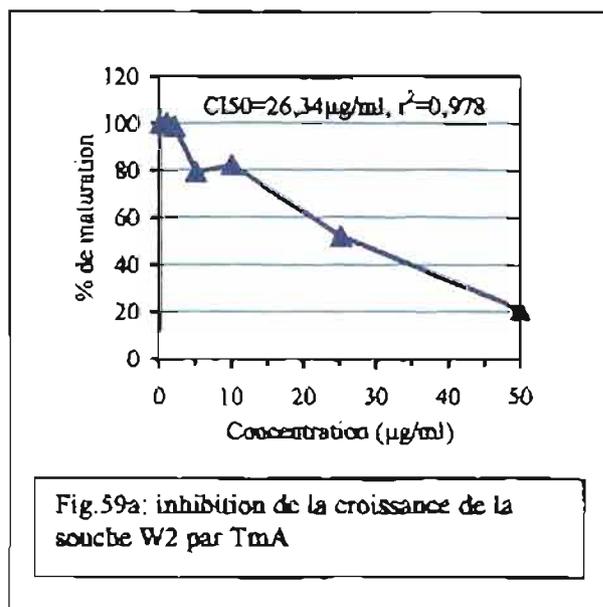


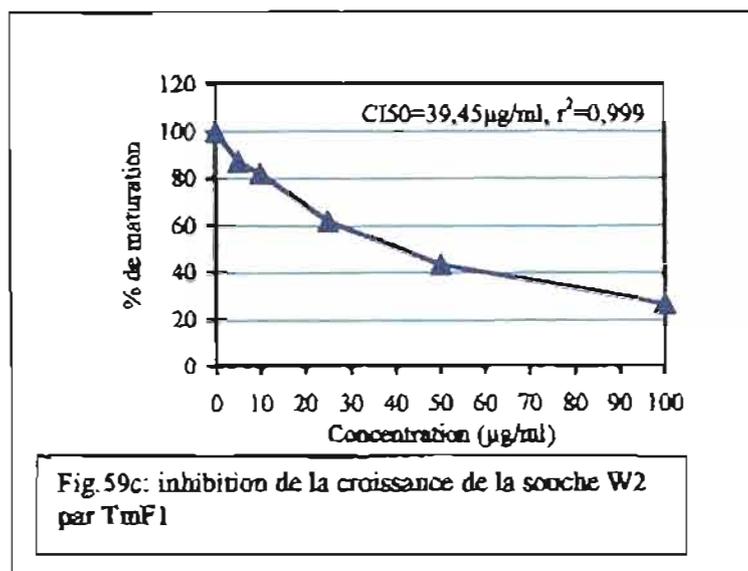
Fig. 58c: inhibition de la croissance de la souche 3D7 par TmF1

Deux autres produits (TmE2 et TmF2) en plus des trois précédents ont été testés sur la souche W2. Les valeurs de la parasitémie que le produit le plus inhibiteur de la croissance est TmE2 avec une  $CI_{50} = 8,57 \mu\text{g/ml}$  (tableau XXX), ensuite vient TmE1 avec une  $CI_{50} = 9,05 \mu\text{g/ml}$ . L'effet des autres produits ont engendrés des  $CI_{50}$  de  $11,55 \mu\text{g/ml}$  pour TmF2,  $26,34 \mu\text{g/ml}$  pour TmA et  $39,45 \mu\text{g/ml}$  pour TmF1. Ces valeurs montrent une inhibition de la croissance des deux souches ce qui montrent les courbes de pourcentage de croissance en fonction de la concentration (figures 59a, 59b, 59c et 60a, 60b).

**Tableau XXX : valeurs exprimant l'effet des produits de *T. macroptera* sur la croissance de la souche W2**

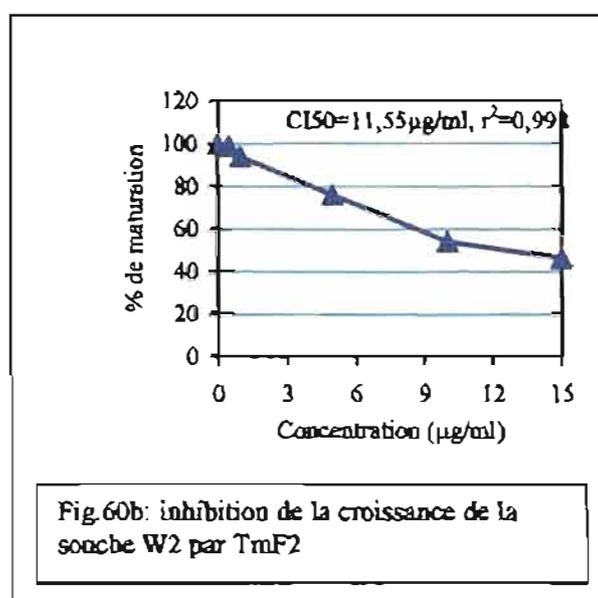
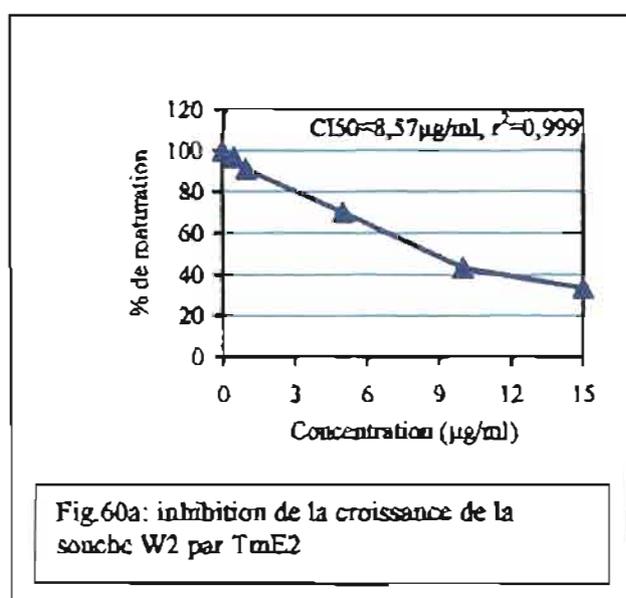
Extrait	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )								$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0 (T+)	1	2	5	10	25	50	100	
TmA	6,55	6,59	6,45	5,19	5,40	3,42	1,37	-	26,34
TmE1	3,9	-	-	3,81	3,43	2,92	2,69	1,49	9,05
TmF1	3,9	-	-	3,40	3,21	2,42	1,70	1,05	39,45





**Tableau XXXI : valeurs exprimant l'effet des produits de *T. macroptera* sur la croissance de la souche W2**

Extrait	Concentration (µg/ml)						CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	0 (T+)	0,5	1	5	10	15	
TME2	14,53	14,05	13,23	10,20	6,32	4,86	8,57
TMF2	14,53	14,38	13,97	11,07	7,88	6,77	11,55



### 3.2.1.3 Tests antiparasitaires avec les extraits de *Cassia siamea*

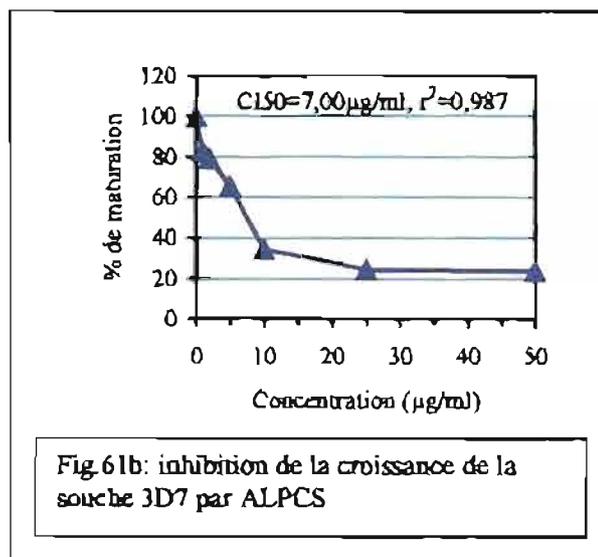
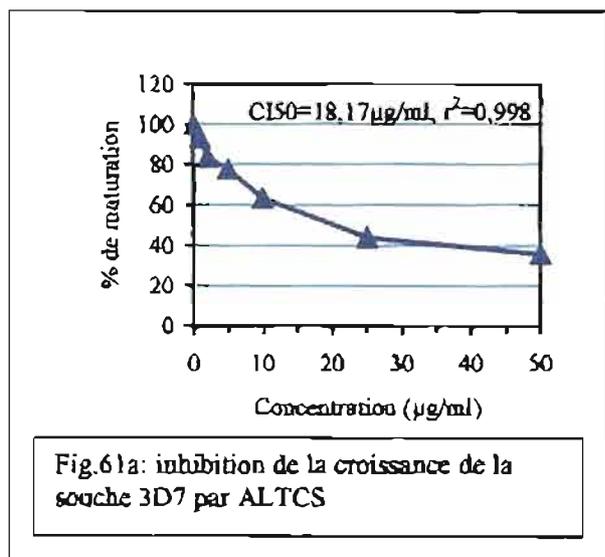
Les tests antiparasitaires faits avec *C. siamea* se sont limités à deux extraits : l'extrait alcaloïdes totaux et une fraction pur qui est connu sous le nom de Barakol. Sur la souche 3D7, la CI<sub>50</sub> est de 7 µg/ml pour le Barakol 2,5 fois plus faible que celle de ALTCS qui est de 18,17 µg/ml. Les valeurs de la parasitémie qui ont engendré ces résultats, sont

consignées dans le tableau XXXII. Sur la souche W2, l'effet du Barakol est plus marqué avec une  $CI_{50} = 2,51 \mu\text{g/ml}$  contre  $21,54 \mu\text{g/ml}$  pour ALTCS (tableau XXXIII).

Les pourcentages de croissance résultants de ces valeurs de la parasitémie, représentés en courbes montrent une allure décroissance dans tous les cas quand on évolue de la plus faible concentration à la plus forte. Cette allure exprime une inhibition de la croissance des parasites au fur et à mesure que la concentration est élevée (figures 61a, 61b et 62a, 62b).

**Tableau XXXII : valeurs exprimant la croissance de la souche 3D7 sous l'effet des produits de *C. siamea***

Extrait	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0 (T+)	1	2	5	10	25	50	
ALTCS	7,23	6,75	6,05	5,63	4,58	3,20	2,60	18,17
Barakol	6,81	5,63	5,39	4,46	2,37	1,68	1,64	7,00



**Tableau XXXIII: valeurs exprimant l'effet des extraits de *C. siamea* sur la croissance de la souche W2**

Extrait	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )							$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0 (T+)	1	2	5	10	25	50	
ALTCS	4,45	4,35	3,85	3,52	2,96	2,10	1,34	21,54
ALPCS	5,6	3,62	3,11	1,89	1,31	1,19	0,34	2,51

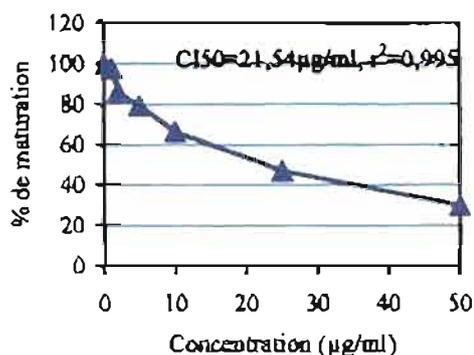


Fig.62a: inhibition de la croissance de la souche W2 par ALTCS

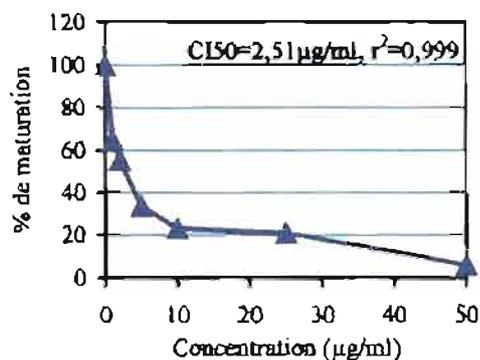


Fig.62b: inhibition de la croissance de la souche W2 par ALPCS

### 3.2.1.4 Tests antiparasitaires avec les extraits d'*Acanthospermum hispidum*

L'extrait « alcaloïdes totaux » (ALTAH) a été le seul à testé sur la souche W2 pour cette plante. Selon la valeur de la  $CI_{50}$  (5,02 µg/ml) obtenue après 48 heures de culture, montre une variation décroissance de la parasitémie quand on part de la faible concentration à la forte concentration (tableau XXXIV). La courbe résultante des pourcentages de croissance correspondants aux valeurs de cette parasitémie, montre cette allure décroissante synonyme d'une inhibition de la croissance de la souche W2 par ALTAH (figure 63).

Tableau XXXIV: valeurs exprimant la croissance de la souche W2 sous l'effet des produits d'*A. hispidum*

Extrait	Concentration (µg/ml)							$CI_{50}$ (µg/ml)
	0 (T+)	0,5	1	5	10	15	20	
ALTAH	9,165	8,62	8,08	4,60	2,02	1,56	1,20	5,02

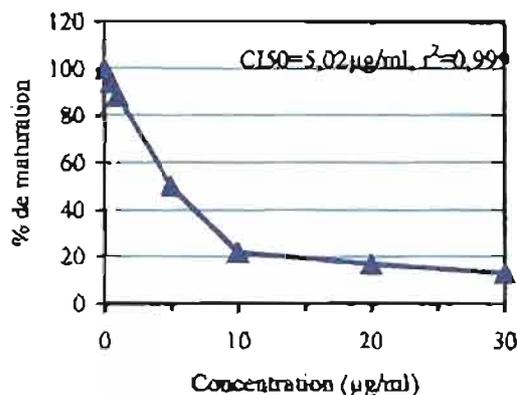


Fig.63: inhibition de la croissance de la souche W2 par ALTAH

### 3.2.2 Tests antiparasitaires sur les isolats

L'activité antiplasmodiale de deux extraits végétaux de *P. crassipes* a été évaluée sur les six isolats. Il s'agit de l'extrait « alcaloïdes totaux » (ALTPC) et l'Elaeocarpidine (ALPPC1) qui ont montré une bonne activité inhibitrice de la croissance de la souche 3D7 et la souche W2.

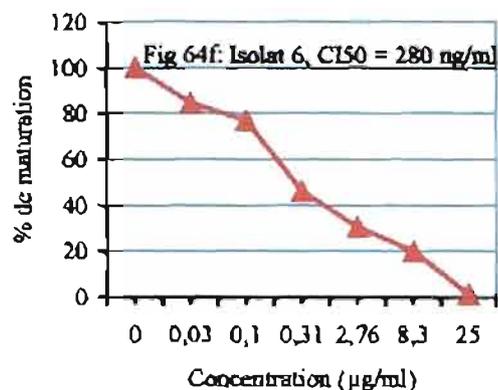
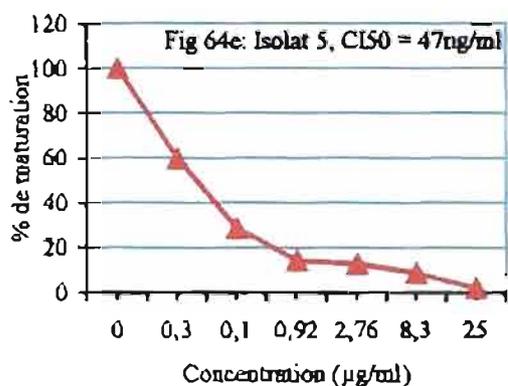
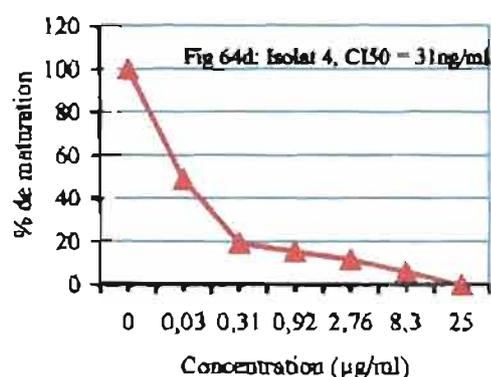
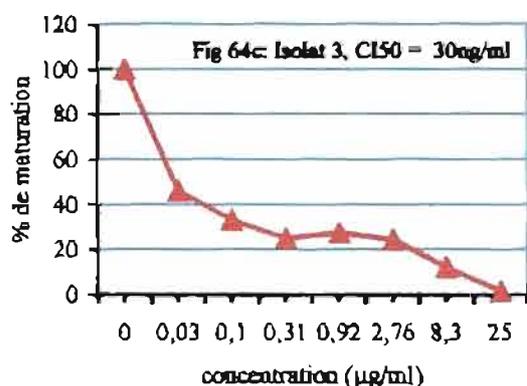
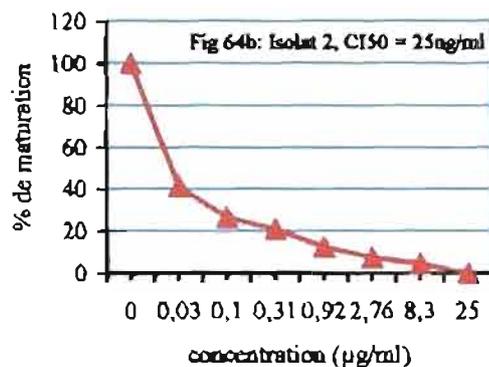
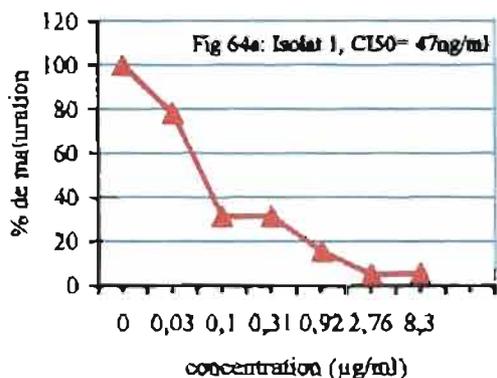
Les valeurs de la parasitémie des isolats sous l'effet de ALTPC, sont consignées dans le tableau XXXV. Elles donnent le degré d'inhibition de la croissance des souches parasitaires par l'extrait exprimé par les  $CI_{50}$  résultantes. On constate que la sensibilité des souches à l'extrait est différente d'une souche à l'autre. C'est ainsi que les souches les plus sensibles sont les souches 1 à 5 dont les  $CI_{50}$  varient entre 25 et 47 ng/ml. La  $CI_{50}$  obtenue avec la souche 6 est au moins 5 fois supérieure aux cinq précédentes avec une valeur de 280 ng/ml.

Tableau XXXV : valeurs de la parasitémie sous l'effet des alcaloïdes totaux de *Pavetta crassipes* (ALTPC)

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Parasitémie (%)					
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6
25	0,00	0,00	0,03	0,00	0,05	0,02
8,3	0,09	0,10	0,22	0,15	0,20	0,26
2,76	0,08	0,15	0,44	0,30	0,30	0,40
0,92	0,25	0,26	0,50	0,40	0,33	-
0,306	0,50	0,44	0,45	0,50	-	0,60
0,102	0,53	0,56	0,60	-	0,66	1,00
0,034	1,25	0,87	0,83	1,26	1,37	1,10
0 (T+)	1,60	2,10	1,80	2,60	2,30	1,30
<b><math>CI_{50}</math> (ng/ml)</b>	<b>47</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>47</b>	<b>280</b>

Les valeurs obtenues après la lecture des résultats sont représentées sous forme de courbe montrant ainsi l'évolution d'inhibition de la croissance des parasites sous l'effet des extraits alcaloïdes totaux (ALTPC) de *Pavetta crassipes*. Les pourcentages de maturation conformément aux valeurs de la parasitémie montrent l'allure décroissance des courbes

résultantes au fur et à mesure que la concentration de l'extrait croît (figures 64a, 64b, 64c, 64d, 64e et 64f).



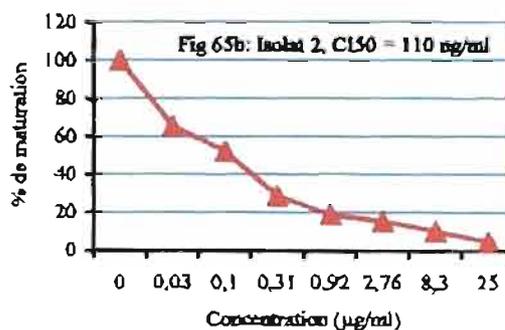
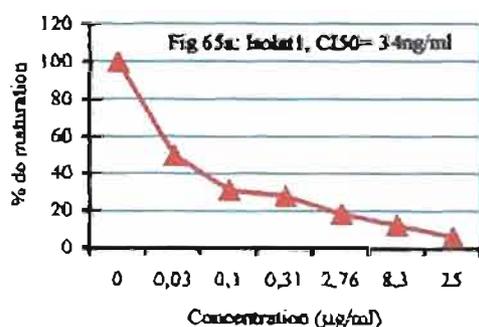
L'élaeocarpidine (ALPPC1) a été testé sur les six isolats. Des valeurs de la parasitémie lues sont présentées dans le tableau XXXVI. Elles ont montré une diversité de sensibilité des souches au produit par rapport à celle observée avec ALTPC. Ainsi les souches 1 et 5 ont été plus sensibles avec une CI<sub>50</sub> égale de 34 ng/ml. Les souches 2, 4 et 6 ont été moins sensibles que les deux précédentes exprimant des CI<sub>50</sub> respectivement de 110,

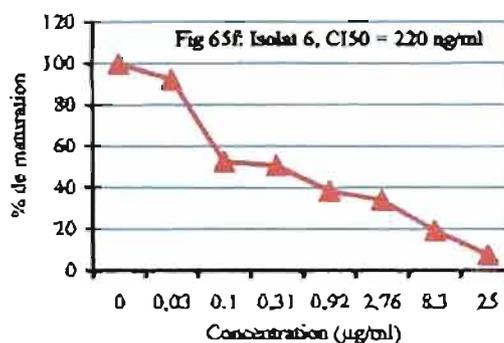
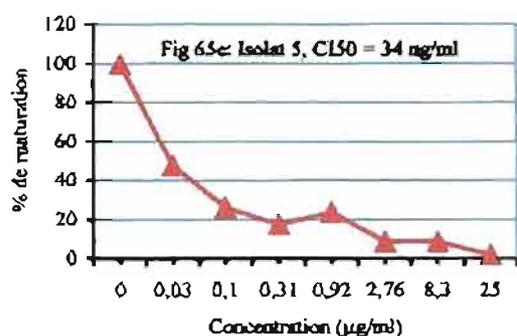
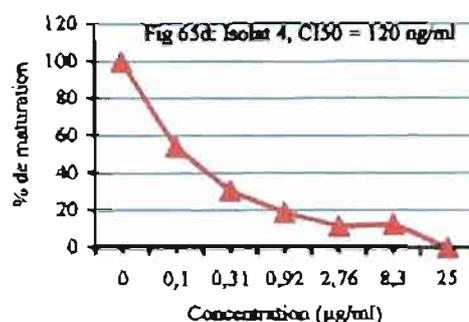
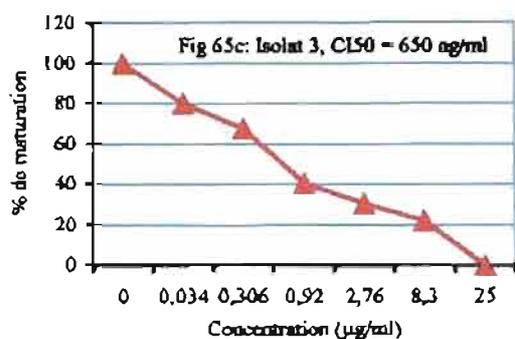
120 et 220 ng/ml. La plus forte  $CI_{50}$  exprimée a été obtenue avec la souche 3 dont la valeur a été de 650 ng/ml.

Les courbes représentatives des pourcentages de croissance inversement proportionnelles aux pourcentages d'inhibition sont présentées par les figures 65a, 65b, 65c, 65d, 65e et 65f. Malgré cette diversité de sensibilité, elles ont montré une inhibition de la croissance des souches par leur allure décroissance de la plus faible concentration à la plus forte.

**Tableau XXXVI : valeurs de la parasitémie sous l'effet de l'alcaloïde pur (ALPPC1) isolé de *Pavetta crassipes***

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Parasitémie (%)					
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6
25	0,10	0,10	0,00	0,00	0,05	0,10
8,3	0,20	0,22	0,40	0,33	0,20	0,25
2,76	0,30	0,33	0,55	0,30	0,20	0,44
0,92	-	0,40	0,73	0,50	0,55	0,50
0,306	0,45	0,60	1,22	0,80	0,40	0,66
0,102	0,50	1,10	-	1,40	0,60	0,7
0,034	0,80	1,37	1,44	-	1,10	1,2
0 (T+)	1,6	2,10	1,80	2,60	2,30	1,30
<b><math>CI_{50}</math> (ng/ml)</b>	<b>34</b>	<b>110</b>	<b>650</b>	<b>120</b>	<b>34</b>	<b>220</b>



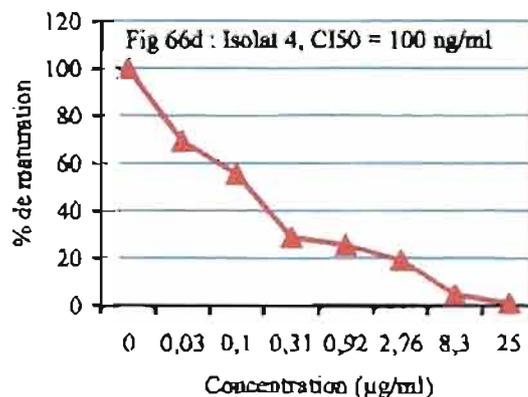
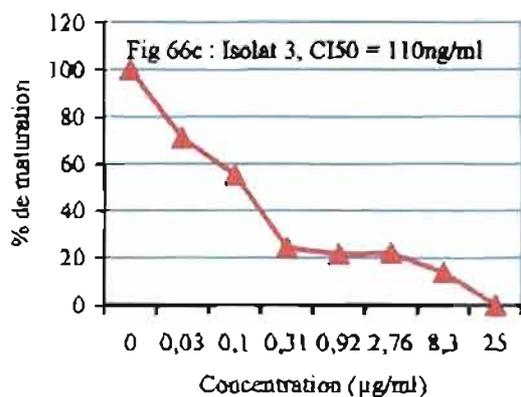
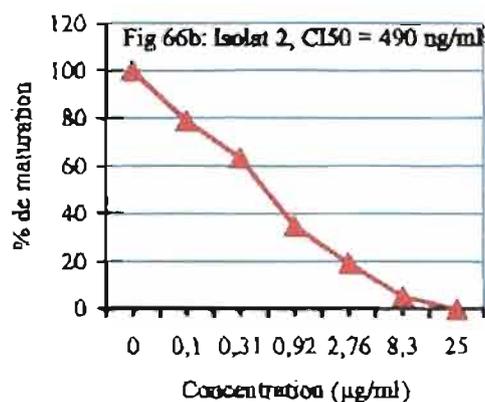
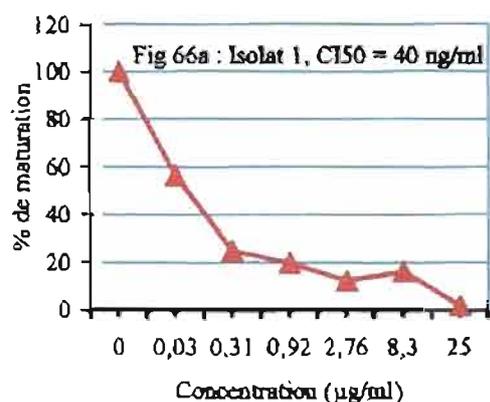


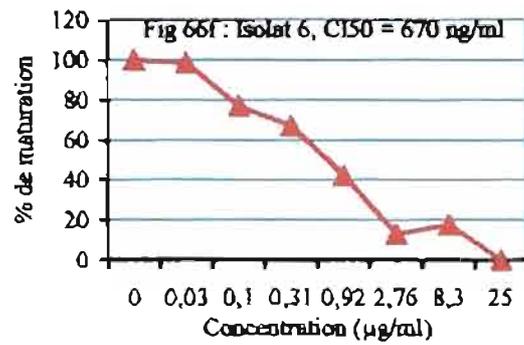
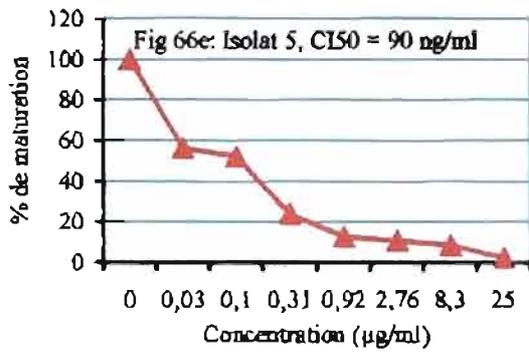
Les tests antiparasitaires réalisés avec l'extrait « alcaloïdes totaux » d'*A. hispidum* ont donné des valeurs de la parasitémie exprimée dans le tableau XXXVII. Selon le tableau, la plus faible CI<sub>50</sub> obtenue est dû à la sensibilité de l'isolat 1 dont la valeur est de 40 ng/ml. Les isolats 3, 4, 5 ont presque la même sensibilité par ce qui nous ont montré les valeurs des CI<sub>50</sub> qui ont été respectivement de 90, 100 et 110 ng/ml. Les isolats 2 et 6 ont présenté des CI<sub>50</sub> assez élevées respectivement de 490 et 670 ng/ml.

Les courbes donnent l'évolution de la croissance des souches en fonction de la concentration de l'extrait ALTAH (figures 66a, 66b, 66c, 66d, 66e, 66f). Cette allure décroissance de la faible concentration à la plus forte montre le pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites de cette plante.

**Tableau XXXVII : valeurs de la parasitémie sous l'effet des alcaloïdes totaux d'*Acanthospermum hispidum* (ALTAH)**

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Parasitémie (%)					
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6
25	0,03	0,00	0,00	0,03	0,06	0,00
8,3	0,26	0,11	0,25	0,12	0,20	0,23
2,76	0,20	0,41	0,40	0,50	0,25	0,17
0,92	0,32	0,73	0,16	0,66	0,30	0,55
0,306	0,40	1,33	0,44	0,75	0,55	0,87
0,102	-	1,66	1,00	1,44	1,20	1,00
0,034	0,90	-	1,28	1,80	1,30	1,28
0 (T+)	1,60	2,10	1,80	2,60	2,30	1,30
<b>CI<sub>50</sub> (ng/ml)</b>	<b>40</b>	<b>490</b>	<b>110</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	<b>670</b>

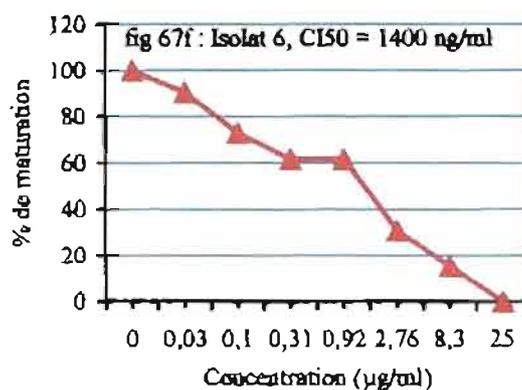
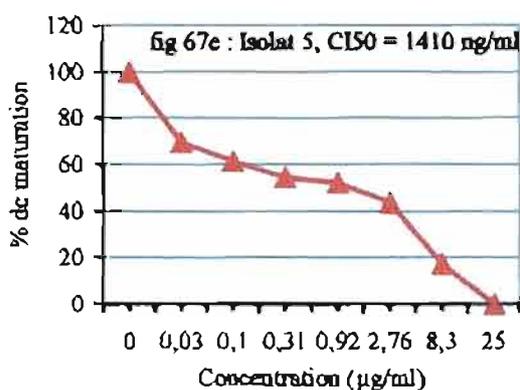
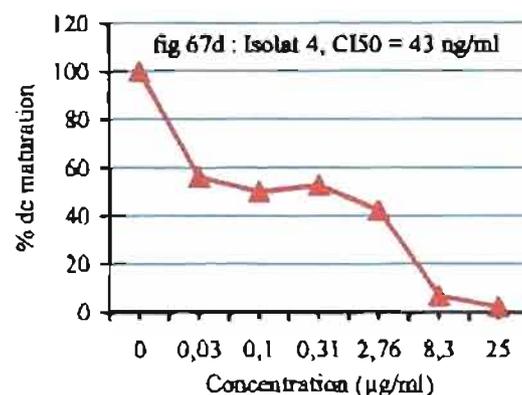
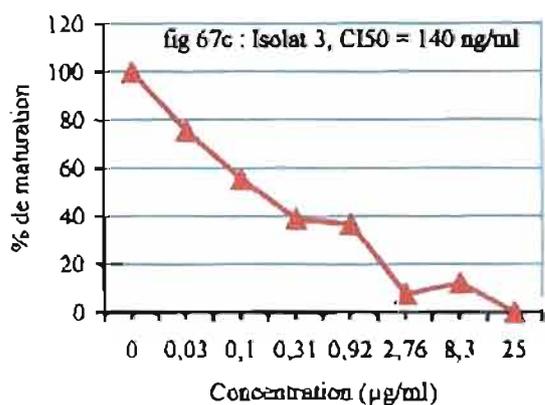
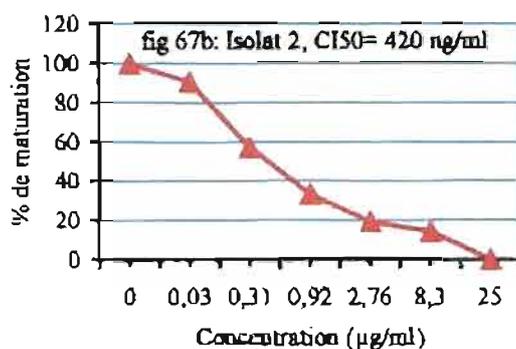
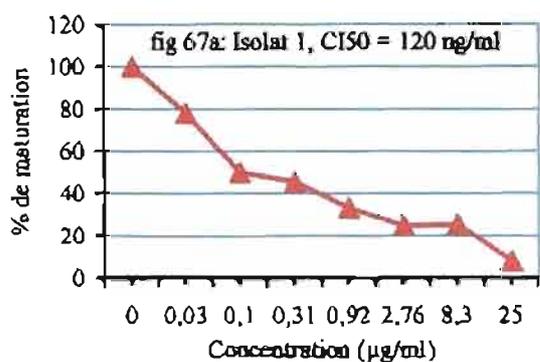




Le Barakol est un des produits qui a été testé sur les souches sauvages. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer l'activité antiparasitaire de confirmer son pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites du paludisme après ce qui a été démontré avec les souches de laboratoire. C'est ainsi qu'il a été plus actif sur la souche 4 avec une CI<sub>50</sub> = 43 ng/ml par rapport aux autres où il a donné une activité inhibitrice exprimée par des CI<sub>50</sub> variant entre 120 ng/ml et 420 ng/ml. La souche qui a supporté un peu son effet inhibiteur est la souche 5 avec lequel la CI<sub>50</sub> a été de 1410 ng/ml (tableau XXXVIII). Les courbes représentatives (figures 67a, 67b, 67c, 67d, 67e et 67f) montrent cette activité inhibitrice de la croissance des isolats.

**Tableau XXXVIII : valeurs de la parasitémie sous l'effet du Barakol extrait de *Cassia siamea***

Concentration (µg/ml)	Parasitémie (%)					
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6
25	0,13	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
8,3	0,41	0,30	0,22	0,18	0,40	0,20
2,76	0,40	0,41	0,14	1,10	1,00	0,40
0,92	0,53	0,70	0,66	-	1,20	0,80
0,306	0,73	1,20	0,70	1,37	1,25	0,80
0,102	0,80	-	1,00	1,30	1,41	0,95
0,034	1,25	1,90	1,36	1,46	1,60	1,18
T+	1,6	2,10	1,80	2,60	2,30	1,30
<b>CI<sub>50</sub> (ng/ml)</b>	<b>120</b>	<b>420</b>	<b>140</b>	<b>43</b>	<b>1410</b>	<b>140</b>



Pour évaluer l'activité antiplasmodiale des nos extraits et produits purs isolés des plantes, il était nécessaire d'évaluer la sensibilité des isolats à la chloroquine. Ainsi la chloroquine a été utilisée à des doses de l'ordre de nanogrammes. Les valeurs de la parasitémie ont permis d'obtenir des  $CI_{50}$  en nanogrammes qui sont converties en nanomolaires. Les valeurs trouvées ont été inférieures à 100 nM valeur, au-delà de laquelle la souche est considérée comme résistante. Nos tests ont donné des  $CI_{50}$  compris entre 9 et 15 nM, ce qui est loin de 100nM (tableau XXXIX). Ces résultats ne montrent qu'aucun des isolats utilisés, était résistant à la chloroquine.

**Tableau XXXIX : valeurs de la parasitémie sous l'effet de la chloroquine**

Concentration (ng/ml)	Parasitémie (%)					
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5	Isolat 6
100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,10	0,16	0,15	0,20	0,14
25	0,40	0,38	0,40	-	0,63	0,26
12,5	0,50	0,65	-	0,72	0,88	0,46
6,25	0,70	1,11	0,74	1,25	1,58	0,62
3,125	0,88	1,60	0,98	1,84	-	0,87
0 (T+)	1,6	2,10	1,80	2,60	2,30	1,30
<b>CI<sub>50</sub> (ng/ml)</b>	<b>3,82</b>	<b>6,74</b>	<b>3,86</b>	<b>5,72</b>	<b>9,77</b>	<b>6,10</b>
<b>CI<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>9,16</b>	<b>16,16</b>	<b>9,26</b>	<b>13,71</b>	<b>23,43</b>	<b>14,63</b>

### 3.3 Discussion des résultats pharmacologiques

L'activité antimalarique de la chloroquine *in vitro* a montré des CI<sub>50</sub> de 40,2 ng/ml pour la souche chloroquino-sensible (3D7) et de 440 ng/ml pour la souche chloroquino-résistante (W2). Ces résultats ont permis d'évaluer la sensibilité des deux souches en convertissant les valeurs des CI<sub>50</sub> en nM. Ainsi la CI<sub>50</sub> de la chloroquine sur la souche 3D7 est de 96,39 nM alors que celle de la souche W2 est de 1055,55 nM. Ces valeurs confirment que la souche 3D7 est sensible à la chloroquine tandis que la souche W2 est résistante si on tient compte du critère selon lequel une souche est chloroquino-résistante si la CI<sub>50</sub> de la chloroquine est supérieure à 100nM. Nous avons évalué l'activité antiplasmodiale *in vitro* de nos extraits végétaux avec ces souches de références qui sont des souches maintenues en culture continue au laboratoire et avec des souches sauvages afin de comparer la sensibilité de chaque type.

Dans notre travail, nous avons commencé d'abord par des tests antiparasitaires avec les souches de laboratoire et les résultats obtenus ont été certes divers mais intéressants.

La première de nos plantes étudiées est *P. crassipes*, une plante selon nos enquêtes, est la plus utilisée dans la zone sud-ouest du Burkina. Les extraits alcaloïdes totaux de cette plante ont donné la meilleure activité inhibitrice de la croissance des souches 3D7 avec une  $CI_{50}$  de 3,45  $\mu\text{g/ml}$  et W2 avec une  $CI_{50}$  de 1,23  $\mu\text{g/ml}$ . Ces résultats montrent le potentiel antiprolifératif de la souche de *Plasmodium falciparum*. Deux alcaloïdes purs (Elaeocarpidine et Hydroxyélaeocarpidine) isolés des extraits alcaloïdiques totaux ont été également testés et ont donné des résultats exprimés en  $CI_{50}$  de 4,70  $\mu\text{g/ml}$  (Elaeocarpidine) sur la souche W2, de 10,8  $\mu\text{g/ml}$  (Hydroxyélaeocarpidine) sur la souche W2 et de 10,95  $\mu\text{g/ml}$  (Elaeocarpidine) sur la souche 3D7. Ils confirment l'activité pharmacologique des Rubiacées plus grande due surtout aux alcaloïdes (Hotellier et al., 1979 ; Bruneton et al., 1993 ; Lamidi et al., 1996 ; Keita-traore et al., 2000, Kumulungui et al, 1997, 1998). Outre ces extraits alcaloïdiques, des extraits alcooliques obtenus de *P. crassipes* ont été testés pour évaluer leur activité antiparasitaire. Les résultats reportés ont montré une activité inhibitrice de la croissance de la souche W2. La meilleure  $CI_{50}$  a été donnée par l'Acanthospermol avec une  $CI_{50}$  de 4,78  $\mu\text{g/ml}$  ; les autres ayant des  $CI_{50}$  supérieures à celle-ci. Nous avons mis en évidence les propriétés antipaludiques de *P. crassipes* à travers le pouvoir inhibiteur de la croissance des souches de *Plasmodium falciparum*. Le fait d'extraire les alcaloïdes totaux, d'isoler des molécules et d'évaluer leurs activités antipaludiques, nous amène à considérer notre travail comme une étude approfondie par rapport à celle qui a été faite sur la même plante uniquement sur les extraits bruts. Ces extraits avaient donné une  $CI_{100}$  de 30 $\mu\text{g/ml}$  (Gbeassor et al., 1989). Par rapport à ces résultats, nous avons pensé à une synergie d'action probable des produits de cette plante. Nous le montrons par le fait que les alcaloïdes totaux ont une  $CI_{50}$  de 1,23  $\mu\text{g/ml}$  alors qu'aucun des deux alcaloïdes isolés n'a une  $CI_{50}$  inférieure à cette valeur bien que tous les alcaloïdes n'ont pu être isolés pour cause d'insuffisance d'extrait et de leur faible teneur (ce que nous a révélé la CCM). On pourrait penser également à la potentialisation de l'activité antiparasitaire de l'extrait alcaloïdes totaux, due à l'ensemble des différents alcaloïdes qu'il contient. Nous rapportons de ce fait pour la première fois un travail sur la plante de manière approfondie.

Nous avons travaillé également sur *Cassia siamea*, une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les accès palustres. Les résultats antiparasitaires sur la souche 3D7 ont donné une  $CI_{50}$  de 18,17 $\mu\text{g/ml}$  pour les extraits totaux et 7,00 $\mu\text{g/ml}$  avec le produit pur qui est le barakol isolé de l'extrait alcaloïdes totaux. Les valeurs des  $CI_{50}$  révélées avec la souche W2 sont de 21,54 $\mu\text{g/ml}$  pour les alcaloïdes totaux et 2,51 $\mu\text{g/ml}$  pour le barakol. Beaucoup de travaux ont été faits sur la plante surtout sur le plan chimique. Notre étude montre pour la

première fois, l'activité antiparasitaire de cette molécule de la plante. En observant ces résultats, on constate que la purification des alcaloïdes totaux a libéré le barakol qui a un principe actif intéressant. Cela amène à croire à une action antagoniste avec d'autres molécules, bien que nous ne l'avons pas démontrée de manière éloquent. L'activité du barakol pourrait être réduite par la présence des autres molécules dans l'extrait alcaloïdes totaux justifiant ainsi les résultats obtenus.

La troisième plante de notre étude est *Terminalia macroptera* dont l'activité antibactérienne a été montrée par d'autres études (Baba-Moussa *et al.*, 1999 ; Silva *et al.*, 1996, 1997). Comme dans le cas de la plante précédente (*C. siamea*), son activité antibactérienne a été démontrée, des molécules ont été isolées mais son activité antiplasmodiale a été prouvée par notre travail. En effet l'activité pharmacologique de cette plante a été renforcée par notre étude à travers nos tests antiparasitaires. Nous avons donc montré que les différentes saponines qui constituent les produits majoritaires de cette plante sont à la base de cette potentialité pharmacologique. Toutes les saponines possèdent un pouvoir inhibiteur de la croissance de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistant (W2) justifié par les  $CI_{50}$  de 26,34 $\mu$ g/ml (arjunglucoside), 9,05 $\mu$ g/ml (séricoside), 8,57 $\mu$ g/ml (arjungénine), 39,45 $\mu$ g/ml (arjungénine) et 11,55 $\mu$ g/ml (acide séricique).

La dernière plante de notre étude est *Acanthospermum hispidum*, une plante de la famille des *Asteraceae*. Cette plante n'a pas connu de traitement approfondi comme les autres parce que nous nous sommes limités aux extraits totaux pour cause d'insuffisance de la poudre de drogue. La CCM faite sur nos extraits a montré une faible teneur des quelques alcaloïdes révélés dans la plante. Malheureusement la quantité des alcaloïdes totaux obtenus de cette poudre n'a pas permis de réaliser l'isolement de ces différents alcaloïdes. Les tests antiparasitaires sur l'extrait alcaloïdes totaux, ont montré une inhibition de la croissance des parasites (W2) avec une  $CI_{50}$  de 5,02 $\mu$ g/ml. Ces tests confirment l'activité pharmacologique de certaines espèces de la famille des *Asteraceae* comme *Artemisia annua* où a été isolé l'artémisinine ou quinghaosu qui est efficace sur la souche de *P. falciparum* (Kirby *et al.*, 1996 ; Meshnick *et al.*, 1996) et est actuellement le deuxième antipaludique naturel de référence après la quinine de *Cinchona* (Debenedetti *et al.*, 2002).

Nous avons donné les différentes valeurs des  $CI_{50}$  obtenues lors des tests parasitaires réalisés avec nos extraits végétaux et produits purs isolés. En effet l'évaluation de leur efficacité sur le plan antiprolifératif a été exprimée sur la base des critères établis par des

auteurs dans la recherche antipaludique comme Rasoanaivo et collaborateurs (1992) et Crampton et collaborateurs (1993).

Selon ces critères, un extrait est considéré très actif si sa  $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ , un extrait est actif si la  $5 \mu\text{g/ml} < CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , un extrait est faiblement actif si la  $50 \mu\text{g/ml} < CI_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$  et un extrait inactif a une  $CI_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ . Par rapport à ces valeurs nous pouvons dire que toutes les plantes choisies pour l'étude approfondie ont une bonne activité antimalarique ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ ). Celles qui ont présenté une  $CI_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$  ont le meilleur pouvoir d'inhibition de la croissance des parasites. Il s'agit des alcaloïdes totaux, l'Acanthospermol de *P. crassipes*, le Barakol de *C. siamea* et les alcaloïdes totaux d'*A. hispidum*.

Il existe aussi d'autres critères de classification des extraits antimalariques en fonction de leur efficacité. Ils ont été fixés par Deharo et collaborateurs (2000). Selon ces critères un extrait est considéré comme actif si sa  $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ . Il est modérément actif si sa  $CI_{50}$  est comprise entre 5 et 10  $\mu\text{g/ml}$ . L'extrait est inactif si sa  $CI_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ . En vous basant sur ces résultats, nous confirmons l'efficacité des extraits alcaloïdes totaux et des produits purs cités selon les critères de classification de Rasoanaivo et Crampton donnés précédemment. Dans ce cas, mis à part ces produits et ces extraits totaux, seuls l'élaeocarpidine de *P. crassipes*, la séricoside et l'arjungénine de *T. macroptera* sont modérément actifs. Les autres produits n'ont pas d'activité antiparasitaire.

En faisant une combinaison des deux types de classification, on peut conclure que les alcaloïdes totaux, l'élaeocarpidine, l'Acanthospermol de *P. crassipes*, le Barakol de *C. siamea*, les alcaloïdes totaux d'*A. hispidum*, la séricoside et l'arjungénine de *T. macroptera*, présentent une bonne activité antiplasmodiale.

Ces résultats confirment l'usage traditionnel de nos plantes et le réalisme de nos choix après l'enquête ethnobotanique et les tests préliminaires. D'une manière générale, aucun produit isolé ainsi que les extraits totaux n'a donné une  $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ . Cependant nous ne pouvons pas dire avec certitude que notre étude a montré l'efficacité définitive de ces plantes car certains principes actifs pourraient être perdus au cours des extractions et purification par dilution dans les solvants ou par rétention dans le gel. Il faut également retenir que nos travaux phytochimiques auraient libéré le principe actif de certaines plantes expliquant le fait que les extraits alcaloïdiques totaux de *C. siamea* n'ont pas une activité antiplasmodiale alors que le produit pur qui est le barakol l'a. Dans la suite des travaux, il sera nécessaire de procéder à l'étude de la cytotoxicité, la génotoxicité et des tests *in vivo* avant d'envisager la mise au point d'un produit pharmaceutique amélioré au même titre que les médicaments conventionnels comme la quinine, la chloroquine et autres.

Aussi avons-nous réalisé des tests antiparasitaires de quelques extraits (les plus actifs sur la souche de référence W2) avec les souches de *Plasmodium falciparum* sauvages. Nous avons voulu dans ce travail évaluer l'activité inhibitrice de nos extraits sur la souche sauvage et comparer cette activité à celle de la souche de laboratoire quand on sait que cette dernière vit dans un milieu physiologique artificiel alors que la souche sauvage se trouve dans un milieu physiologique naturel humain. Nous avons testé donc les alcaloïdes totaux de *Pavetta*, les alcaloïdes totaux d'*Acanthospermum*, l'élaeocarpidine, le barakol et la Chloroquine sur six isolats. Les  $CI_{50}$  en ng/ml, trouvées avec la chloroquine et converties en nM, prouvent qu'aucun des isolats utilisés pour nos essais n'est résistant à la chloroquine ; les valeurs en nM sont comprises entre 9 et 24. Les résultats obtenus avec les extraits végétaux ont montré que la plus forte  $CI_{50}$  exprimant la moins efficace était de 0,67 µg/ml, inférieure à 1 µg/ml. Cela prouve une forte sensibilité des souches sauvages à nos extraits donc une très bon pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites. En faisant la comparaison des résultats des deux tests, on a constaté que cette sensibilité des souches sauvages était 10 fois plus forte par rapport aux souches de référence maintenues en culture continue. Cette différence de sensibilité de ces deux souches (souche de laboratoire et souche sauvage) pourrait s'expliquer par deux raisons:

- d'abord par le fait que la souche sauvage n'est pas résistante et peut comprendre les différentes stades de l'évolution des parasites par rapport aux souches de laboratoire qui sont monoclonales. Les tests à la chloroquine nous l'ont montré avec toutes les  $CI_{50} < 100$  nM qui représente la valeur limite de la sensibilité d'une souche à un produit donné selon la littérature.

- la deuxième explication pourrait être le potentiel physiologique du parasite sauvage à croître dans un milieu de culture artificiel par rapport aux souches de laboratoire qui sont maintenues en culture continue en milieu artificiel. De ces résultats nous avons démontré qu'il est plus judicieux de travailler avec les souches sauvages qu'avec les souches de laboratoire qui, sous l'effet des produits chimiques, acquièrent une certaine résistance aux extraits.

A partir de notre étude, il est possible de conseiller à la population qui utilise cette médecine traditionnelle sur le choix des plantes dans le traitement du paludisme. Cela est très important dans les soins traditionnels, quand on sait que la population utilise souvent des plantes moins efficaces qu'ils sont obligés souvent de changer pour d'autres. Ces plantes pourraient être produites et entretenues afin de les rendre plus disponibles.

# **CONCLUSION PERSPECTIVES**

Les travaux réalisés sur les 4 plantes sélectionnées ont permis d'aboutir aux résultats suivants :

D'abord sur le plan phytochimique, neuf produits purs ont été isolés des différentes plantes étudiées. C'est ainsi qu'à partir des alcaloïdes totaux de *Pavetta crassipes*, nous avons isolé deux alcaloïdes. Il s'agit de l'Elaeocarpidine symbolisée ALPPC1 et l'Hydroxyélaeocarpidine symbolisée par ALPPC2 ; ce dernier étant un produit nouveau. L'extrait total méthanolique de *Pavetta crassipes*, nous a permis d'isoler deux produits connus sous les noms d'Acanthospermol- $\beta$ -galactosidopyranoside (TMP) et de la Rutine (TJP1). Toutes ces molécules ont été isolées pour la première fois dans *Pavetta crassipes*. Quant à *Cassia siamea*, notre étude phytochimique a permis d'isoler le barakol. Dans *Terminalia macroptera*, nous avons recherché principalement les saponosides. En effet, l'étude phytochimique de la plante a permis d'isoler quatre saponosides qui sont l'arjungénine (TmE2 et TmF1), l'arjunglucoside (TmA), le séricoside (TmE1) et l'acide séricique (TmF2).

Sur le plan pharmacologique, les différents extraits et produits isolés ont été testés sur la souche de *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante (W2). Les alcaloïdes totaux de *Pavetta crassipes* et d'*Acanthospermum hispidum* ont donné de bonnes activités antiplasmodiales avec des CI<sub>50</sub> respectivement de 1,23  $\mu$ g/ml et 5,02  $\mu$ g/ml. En ce qui concerne les produits isolés, un excellent pouvoir inhibiteur de la croissance des parasites a été obtenu avec l'Elaeocarpidine, l'Acanthospermol- $\beta$ -galactosidopyranoside isolés de *P. crassipes*, du Barakol provenant de *C. siamea*, de l'arjungénine (TmE2) et du séricoside isolés de *T. macroptera*. Il s'agit des produits dont la CI<sub>50</sub> est inférieure à 10 $\mu$ g/ml.

D'autre part, certains de nos extraits ont été testés sur des isolats de *Plasmodium falciparum* qui sont des souches provenant d'un prélèvement sanguin dans un milieu rural. Les alcaloïdes totaux de *P. crassipes* et d'*A. hispidum*, l'Elaeocarpidine et le Barakol ont été testés. Les résultats ont été excellents dans tous les cas avec des CI<sub>50</sub> inférieures à 1  $\mu$ g/ml et exprimées à l'ordre du nanogramme. Ces valeurs plus de 10 fois inférieures à celles des tests sur la souche de référence, montrent l'intérêt qu'il faudra désormais accorder à l'utilisation des souches sauvages de *Plasmodium falciparum* dans l'évaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits de plante.

Nous avons montré que les alcaloïdes, les saponines et d'autres molécules terpéniques, selon leur provenance, ont des activités antiparasitaires variables. Cette variabilité est importante pour l'orientation des thérapeutes traditionnels pour une meilleure utilisation des plantes dans le traitement du paludisme. De nos jours, compte tenu de l'augmentation inexorable de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques de référence, c'est la découverte de nouvelles substances ne présentant pas de résistance avec des molécules usitées qui demeure la nouvelle orientation de la recherche dans la chimiothérapie du paludisme.

Notre programme de recherche sur les antipaludiques naturels s'inscrit dans la stratégie actuelle de lutte contre le paludisme préconisée par l'OMS en 1993. Ainsi, outre le diagnostic, le traitement et le développement de réseaux de surveillance épidémiologique, il s'agit pour les pays endémiques du paludisme comme le Burkina Faso de promouvoir et renforcer les capacités locales en matière de recherches fondamentales et appliquées en liaison avec d'autres programmes de recherche d'intérêt commun. Grâce à de telles collaborations, la pharmacopée traditionnelle chinoise a fait des progrès sensibles qui ont permis la mise sur le marché de l'artémisinine et de ses dérivés. De tout ce qui précède, il ressort que la médecine traditionnelle africaine doit être davantage explorée et exploitée pour découvrir d'autres plantes antipaludiques et leurs principes actifs.

Un aspect important dans l'ethnopharmacologie, est l'obtention des résultats ethnobotaniques. Il s'agit ici d'obtenir des informations justes avec de vrais tradithérapeutes qui ont le plus souvent besoin d'avoir une confiance pour livrer leurs connaissances. Il est évident que pour une amélioration de la pharmacopée traditionnelle, les gouvernements doivent adopter une politique d'implication officielle de ces tradithérapeutes qui constituent un maillon non négligeable du réseau sanitaire, avec lesquels il faut compter et dialoguer.

A partir des résultats antiparasitaires, notre étude fait ressortir l'intérêt qu'il faut accorder quant à la collaboration avec des tradithérapeutes, leur intégration effective dans la recherche de source d'agents thérapeutiques. Nous confirmons qu'il est évident que certaines plantes médicinales locales sont appelées à devenir de précieux appoints dans les cases de santé, les centres médicaux, les hôpitaux mais ceci après une période de validation et d'amélioration. Il serait donc intéressant d'effectuer une évaluation de la qualité microbiologique des préparations traditionnelles afin de minimiser leur risque de contamination quand on sait que dans les milieux ruraux les règles d'hygiène ne sont souvent pas respectées.

Outre le paludisme, les plantes peuvent être exploitées pour traiter à moindre coût, les autres affections courantes qui sévissent dans nos pays en voie de développement, surtout dans le milieu rural. Après une étude d'évaluation de l'efficacité, de toxicité et de dosage, les recettes thérapeutiques améliorées locales peuvent être mises à la disposition de cette population qui connaît des difficultés d'accéder aux soins de santé malgré la présence des centres de santé encore embryonnaires. Pour y arriver, il appartient de nos jours aux autorités compétentes en matière de santé, de porter main forte dans la valorisation de la médecine et la pharmacopée traditionnelles.

Ces résultats aussi intéressants méritent d'être poursuivis. Nous envisagerons d'étudier la cytotoxicité, la génotoxicité des meilleurs principes actifs. Nous entreprendrons d'évaluer l'activité antiparasitaire *in vivo* des produits non toxiques pour les cellules humaines. Après cette validation, les produits prometteurs feront l'objet de la mise au point des spécialités locales ou modernes en vue de la réalisation des essais cliniques. Les expériences obtenues de cette étude nous permettront d'améliorer les études ethnopharmacologiques qui permettront de découvrir d'autres sources de molécules nouvelles. Elles nous ont donné la conviction que la médecine traditionnelle peut apporter une contribution réelle dans l'amélioration des systèmes de santé. Dans la suite de notre étude, nous envisagerons également d'évaluer la potentialisation des effets antimalariques de nos produits isolés qui se sont avérés antiplasmodiaux, à partir des extraits d'autres plantes nouvelles et certains micro-nutriments comme le nickel, le zinc, le fer, le cobalt etc. Une étude phytochimique approfondie sur *Acanthospermum hispidum* sera poursuivie.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abe F., Yamachi T. (1987) *Trachelospermum*. IV. Glycosides of 19 $\alpha$ -hydroxyoleanane-type triterpenoids from *Trachelospermum asiaticum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (5): 1833-1838
- Abu-Mustafa E.A., El Tawil B.A.H., Fayed M.B.E. (1964) Constituents of local plants. IV- *Ficus carica*, *Ficus sycamorus* and *Ficus salicifolia* leaves. *Phytochemistry*, 3 (6): 701-703
- Adagu L.S., Warrhurst D.C. 1999. Allele-specific, nested, one tube PCR: application to *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 119 (1): 1 – 6
- Addae-Kyereme J., Croft S.L., Kendrick H., Wright C.W. (2001) Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *Journal of ethnopharmacology*, 76, 99-103
- Ajalaoba E.O., Abalaga V.L, Krebs H.C., Oduola A.M.J. (1999) *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amra* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 67: 321-325
- Amos S., Okwusaaba F.K., Gamaniel K., Akah P., Wambebe C. (1998) Inhibitory effects of the aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. *Journal of ethnopharmacology*, 61: 209-213
- Ayivi B., Koumakpai S., Dossou S. H., Dan V, Hazoumé F.A. (1992) Le neuropaludisme chez l'enfant. A propos de 292 observations. *Publ. Med. Afr.*, 25: 45-52
- Babady-Bila, Ngalamahme T., Kilonda A., Toppet S., Compernelle F., Hoornaert G. (1991) An ursadienedioic acid glycoside from *Crassopteryx febrifuga*. *Phytochemistry*, 30 (9): 3069-3072
- Baba-Moussa F., Alapagana K., Bouchet P. (1999) Antifungal activities of seven west-african *Combretaceae* used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 66 (3): 335-338
- Babiker H.A., Pringle S.J., Abdel-Muhsin A., Mackinnon M., Hunt P., Walliker D. (2001) High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *Journal of Infectious Diseases*, 183 (10): 1535 – 1538
- Balansard G. (1990) Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés antibactériennes ou antiparasitaires. *Actes du 1<sup>o</sup> colloque européen d'ethnopharmacologie*, Metz, 22-25
- Balchia M.L., Houghton P.J., Woldemariam T.M. (1996) Elacocarpidine alkaloids from *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Nat. Prod. Lett.*, 8 (2): 105-112
- Basco L.K., Le Bras J. (1994) *In vitro* susceptibility of Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum* to halofantrine, pyronaridine and artemisinin derivatives. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88 (2) : 137 – 144
- Bandon D., Martet G. (1997) Paludisme et voyageurs: protection et information. *Med. Trop.*, 57, 497-500
- Bandon D., Martet G. (1997) Paludisme et voyageurs: protection et information. *Med. Trop.*, 57 : 497-500
- Benoît F., Valentis A., Pellissier Y., Marion C., Dakwoyo Z., Mallié M., Bastide J.M. (1995) Antimalarial activity *in vitro* of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89 (2): 217-218
- Benoît-vical F., Valentis A., Mallié M., Bastide J.M., Beziere J.M. (1999) *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *C. planchonii* leaf extracts and essential oils. *Planta Med.*, 65: 378-381
- Benoît-vical F., Valentis A., Pellissier Y., Diafouka F., Marion C. Kome-Bamba D., Kome M., Mallié M., Yapo A., Bastide J.M. (1996) Antimalarial activity *in vitro* of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54 (1): 67 – 71
- Bermejo A., Vecken H. 1992. Insecticide impregnated bed nets for malaria control: review of the field trials. *Bull. Who.*, 70: 293-296
- Bickil J., Njifutic N., Foyere J.A., Basco L.K., Ringwald P. (2000) *In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 69: 27-33

- Bila B., Ngalamulume T., Penders A., Delaude C. (1992)** A new saponin from *Crossopteryx febrifuga*. *Bull. Soc. R. Sci.*, 61 (3-4): 239-243
- Binka F.N., Kudaje A., Adjuik M., Williams L.A., Lengeler C., Maude G.H., Armah G.E., Kajihara B., Adiamah J.H., Smith P. (1996)** Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana : a randomized controlled trial. *Trop. Med. Int. Health*, 1: 147-154
- Bognounou O. (1975)** Note sur une plante médicinale : le randga ou Kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don-Combretaceae). *Bulletin trimestriel d'information Scientifique*, 8 (2) : 36-44
- Bognounou O. (1988)** Au sujet de la valorisation des pratiques médicales traditionnelles. *Science et Technique, CNRST, Ouagadougou* 3 : 82-93
- Bombardelli E., Bonati A., Gabetta B. et Mustich G. (1974)** Triterpenoids of *Terminalia sericea*. *Phytochemistry*, 13 : 2559-2562
- Bouchaud O., Longuet C., Coulaud J.P. (1998)** Prophylaxie du paludisme. *Rev. Prat.*, 48 : 279-286
- Boudin C., Robert V., Verhave P., Carnevale P., Ambroise-Thomas P. (1991)** *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* epidemiology in a west african village. *Bulletin of the World Health Organization*, 69: 199-205
- Bray P.G., Haawley S.R., Ward S. (1996)** 4-aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol. Pharmacol.*, 50: 1551-1558
- Bringmann G., Saed W. Assi L.A., Francois G., Sankara N.A.S., Peters K., Peters E.M. (1997)** Betulinic acid : isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med.*, 63:255-257
- Brinkmann U., Brinkmann A. (1991)** Malaria and health in Africa: The present situation and epidemiological trends. *Trop. Med. Parasito.*, 42 (3): 204-213
- Brockman A., Price R.N., Van Vugt M., Heppner D.G., Walsh D., Sookto P., Wimonwittawatee T., Looareesuwan S., White N.J., Nosten F. (2000)** *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94 (5): 537 - 544
- Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Editions médicales internationales*. 3è édition.
- Bryskier A., Labro M.T. (1988)** Les antipaludiques d'origine végétale; paludisme et médicaments, *Arnette 1ère éd. Paris*, 101-131
- Carola K., Kristine J-S., Karsten S., Mahabir P.G., Ulrich B., Eckart E. (2000)** Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of ethnopharmacology*, 73: 131-135
- Cartagena E., Bardon A., Catalan C.A., De Hernandez Z.N., Hernandez, Joseph-Nathan P. (2000)** Germacranolides and a new type of guaianolide from *A. hispidum*. *J. Nat. Prod.*, 63 (10) : 1323-1328
- Chaiyaroj S.C., Baranakiti A., Angkasekwinai P., Looareesuwan S., Cowman A.F. (1999)** Analysis of mefloquine resistance and amplification of pfmdr1 in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61 (5): 780 - 783
- Chandenier J., Danis M. (1998)** Le traitement du paludisme : actualité et perspectives. *Développement et santé*, 128 : 24-27
- Chen C.K., Hortmann A.G., Marzabadi M.R. (1988)** Chlorine dioxide oxidation of amines : synthetic utility and a biomimetic synthesis of elaeocarpidine. *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (14): 4829-4831
- CNLP. (1993)** Paludisme grave chez les enfants et immunité anti-Trap. *Rapport d'activités Ouagadougou*. 23p
- CNLP. (1996)** La résistance bat en retraite/le paludisme grave compliqué : physiopathologie. *Publication trimestrielle, année 3, numéro 1*

- Congpuong K., Sirchainsinthop J., Tippawangkosol P., Suprakrob K., Na-Bangchang K., Tan-Ariya P., Karbwang J. (1998) Incidence of antimalarial pretreatment and drug sensitivity in vitro in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* infection in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92 (1): 84 – 86
- Conrad J., Vogler B., Klaiber L., Reeb S., Guse J-H., Roos G., Kraus W. (2001) Vanillic acid 4-O-β-D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside and other constituents from the bark of *Terminalia macroptera* Guill. Et Perr. *Nat. Prod. Lett.*, 15 (1) : 35-42
- Conrad J., Vogler B., Klaiber L., Roos G., Walter U., Kraus W. (1998) Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry*, 48 (4): 647-650
- Conrad J., Vogler B., Reeb S., Klaiber L., Papajewski S., Roos G., Vasquez E., Setzer M.C., Kraus W. (2001) Isoterchebulin and 4,6-O-isoterchebuloyl-D-glucose, novel hydrolysable tannins from *Terminalia macroptera*. *J. Nat. Prod.*, 64 (3) : 294-299
- Conrad J., Vogler B., Reeb S., Klaiber L., Papajewski S., Roos G., Vasquez E., Stezer M.C., Kraus W. (2001) Isoterchebulin and 4,6-O-isoterchebuloyl-D-glucose, novel hydrolysable tannins from *Terminalia macroptera*. *J. Nat. Prod.*, 64 (3): 294-299
- Crampton J. M., Galler R., Sinden R. E., Crisanti A. (1993) La plasmodie et les globules rouges. *La recherche*, 24 (259) : 1220-1296.
- D'Alessandro U., Olaleye B.O., McGuire W., Langerock P., Bennett S., Aikins M.K., Thomson M.C., Cham M.K., Cham B.A., Greenwood B.M. (1995) Mortality and morbidity from malaria in Gambian children after introduction of an impregnated bednet programme. *Lancet* 345 : 479-483
- Dabiré E., Guignemadé T.R., Kam L.K., Coulibaly C.O. (1992) Morbidité palustre au sein de la pathologie fébrile dans le service de pédiatrie de l'hôpital Yalgado Ouédraogo (Burkina Faso). *Publ. Med. Afr.*, 120: 29-32
- Danis M. (1991) Médicaments antipaludiques. *Paludisme Ellipses/Aupelf Ed. Marketing/Ellipses*, 131 – 145
- Danis M., Gentilini M. (1998) Le paludisme, fléau mondial. *Rev. Prat.*, 48, 254-257
- Davidson D.E. 1991. A new generation of antimalaria. *TDR new march* (35) : 1-7
- Davis W.C., Wyatt C.R., Hamilton M.J., Goff W.L. (1992) A rapid, reliable method of evaluating growth and viability of intraerythrocytic protozoan hemoparasites using fluorescence flow cytometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 87: 235-239
- Debenedetti S., Muschietti L., Van Barea C., Clavin M., Broussalis A., Martino V., Houghton P.J., Warhurst D., Steele J. (2002) *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *Journal of ethnopharmacology*, 80: 163-166
- Del Nero L., Lamizana L., Pietra V., Nebie I. (1994) Sensibility to antimalarial drugs by *P. falciparum* in Goundry, Oubritenga Province, Burkina Faso. *Parasitologia*, 36 (3): 287-293
- Del Nero L., Lamizana L., Pietra V., Rotigliano G. (1993) A national survey of the prevalence of Chloroquine resistance *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *J. Trop. Med. Hyg.*, 96:186-190
- Diallo G., Nébié I., Cuzin N., Pagnoni F, Habluetzel A., Esposito F. (1994) Surveillance longitudinale de la morbidité palustre dans 4 villages-sentinelles de la province de l'Oubritenga au Burkina Faso. *IV<sup>ème</sup> congrès de la société Ouest Africaine de parasitologie, Ouagadougou (Burkina Faso)*
- Diker K., El Biach K., Doe de Maindreville M., Levy J. (1997) Reductive Pictet-Spengler cyclization of nitrites in the presence of tryptamine: synthesis of indolo[2,3-α]quinolizidine, nazlinine and elacocarpidine. *J. Nat. Prod.* 60, 791-793
- Diker K., El Biach K., Doe de Maindreville M., Levy J. (1997) Reductive Pictet-Spengler cyclization of nitriles in the presence of tryptamine: synthesis of indolo[2,3-α]quinolizidine, Nazlinine, and Elacocarpidine. *J. Nat. Prod.*, 60 (8) : 791-793
- Direction de la Médecine Préventive (DMP). (1993) Programme national de lutte antipaludique au Burkina Faso. *Ministère de la santé, de l'action sociale et de la famille*, 56p

- Direction des Etudes et de la Planification. (1995)** Statistiques sanitaires 1994. *Ministère de la santé, de l'action sociale et de la famille*, 101p
- Doddrell D., Pegg D.T., Bandall M.R. (1982)** Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfert. *J. Magn. Reson.*, 48 : 323-327
- Druilhe P., Gentilini M. 1982.** Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*: intérêts et limites –méthodologie. *Med. Trop.*, 42 (4) : 437-458
- Ekong M.R., Robson H.J.H., Baker D.A., Warburst D.C. (1993)** Transcript of the multidrug resistance genes in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.*, 106: 107-115
- El Tahir A., Gwiria Satti M.H. & Sami K.A. (1999)** Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Journal of Ethnopharmacolog*, 64: 227 – 233
- Erdelmeier C.A.J., Kinghorn A.D., Farnsworth N.R. (1987)** On-plate injection in the preparative separation of alkaloids using overpressured layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 389 (1): 345-349
- Esposito F., Lombardi S., Modiano D., Zavala F., Reeme J., Lamizana L., Coluzzi M., Nussenweig R. S. (1988)** Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82 (6): 827- 832
- Eykmans L. 1990.** Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*: conséquences et perspectives d'avenir. *Pres. Med.*, 19 : 9-10
- Fayez E.K., Mahmoud I.N. (1998)** A tannin anti-cancer promotor from *Terminalia arjuna*. *Phytochemistry*, 47 (8) 1567-1568
- Findlay G.M., Macgrath B.G., Markson K.L., Holden J.R. (1946)** Investigations in the chemotherapy of malaria in west Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 40, 358-367
- Fiorino D.F., Treit D., Menard J., Lerner L., Phillips A.G. (1998)** Is barakol anxiolytic? *Behav. Pharmacol.*, 9 (4): 375-378
- Flores M.V., Berger-Eiszele S.M., Stewart T.S. (1997)** Long-term cultivation of *Plasmodium falciparum* in media with commercial non-serum supplements. *Parasitol. Res.*, 83: 734-736
- Footo J.S., Cowman F.A. (1994)** The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropica*, 56 : 157-171
- Foresta P., Chirardi O., Gabetta B., Cristoni A. (1988)** Triterpene saponins having anti-inflammatory, mucolytic and antiedemic activities, process for the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them. *Eur. Pat. Appl.*, 12p
- Francois G., Bringmann G., Phillipson D.J., Ake A.L., Dochez C., Rubenacker M., Schneider C., Wery M., David C.W., Kirby G.C. (1994)** Activities od extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum pellatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *Ancistrocladus barteri* against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Phytochemistry*, 35: 1461-1467
- Franzworth N.R. (1994)** Ethnopharmacology and drug development. *Ciba Found Symp.*, 185 : 42 - 51
- Gariboldi P., Verotta L., Gabetta B. (1990)** Saponins from *Crossopteryx febrifuga*. *Phytochemistry*, 29 (8): 2629-2635
- Gasquet M., Delmas F., Timon-David P., Keita A., guindo M., Koita N., Diallo D., Doumbo O. (1993)** Evaluation *in vitro* and *in vivo* a traditional antimalarial, "Malarial 5". *Fiterapia*, LXIV (5): 423-426
- Gasquet M., Delmas F., Timond-David P. (1993)** Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial drug 'Malarial 5'. *Fitoterapia*, LXIV, 423-426
- Gazin P., Cot M., Sans S., Halma J.M., Pazart L., Legrand D., Baillet F., Robert V., Carnevale P. (1988)** La part du paludisme dans les consultations d'un dispensaire sahélien. *Annale de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 68 : 15-24

- Gbeassor M, Koussou Y, Amegbo K, de Souza C, Koumaglo K, Denke A. (1989) Antimalarial effects of eight African medicinal plants. *J Ethnopharmacol.*, 25 (1) : 115-118
- Geoffrey C., Kirby. (1996) Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 605 – 609
- Gesler M., Nkunya M.H., Mwasumbi L., Heinrich M., Tanner M. (1994) Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Tropica*, 56 : 65-67
- Gessler M.C., Nkunya M.H., Mwasumbi L.B., Heinrich M., Tanner M. (1994) Screening Tanzania medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Trop.*, 56 (1) : 65 - 77
- Gomez-saladin E., Fryauff D.J., Taylor walter R.J., Laksana B.S., Susanti A.I., Purnomo, Subianto B., Richie T.L. (1999) *Plasmodium falciparum* mdr1 mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (2): 240 – 244
- Greenwood B., Bradley A.K., Greenwood A.M. (1987) Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of the Gambia, West Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 478-486
- Grellier P., Ramiaramanana L., Millerieux V., Deharo E., Schrevel J., Frappier F., Trigalo F., Bodo B., Pousset J.L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytother. Res.*, 10 : 317-321
- Gribble G.W. (1970) Total synthesis and stereochemistry of dl-elaecarpidine. *J. Org. Chem.*, 35 (6): 1944-1949
- Gribble G.W., Switzer F.L. (1987) A practical synthesis of (±)-elaecarpidine. *Synth. Commun.*, 17 (4): 377-383
- Gribble G.W., Switzer F.L., Soli R.M. (1988) A biomimetic approach to the *Elaeocarpus* alkaloids. Syntheses of (±)-elaecamine A, (±)-elaecamine C, (±)-elaecarpidine, and (±)-tarenine. *J. Org. Chem.*, 53 (14): 3164-3170
- Gu H.M., Lu B.F., Qu Z.X. (1989) Antimalarial activities of 25 derivatives of artemisinin against chloroquinoresistant *P. berghei*. *Acta Pharmacologica sinica.*, 1 : 48-50
- Guiguemé T.R., Aouba A., Ouédraogo J.B., Lamizana L. (1994) Ten years surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *Am. J. Med. Hyg.*, 50 (6): 699-704
- Guiguemé T.R. (1991) Evaluation de la chimiorésistance, paludisme. *Ellipses/Aupelf, Marketing / Ellipses*, 193-195
- Guiguemé T.R. (1991) Point sur le paludisme, séminaire de recyclage des agents de santé, province du Houet. *OCCGE Centre Muraz (281): 1-8*
- Habluetzel A., Diallo D.A., Esposito F., Lamizana L., Pagnoni F., Lengeler C., Traore C., Coussens S.N. (1997) Do insecticide-treated curtains reduce all-cause child mortality in Burkina Faso? *Tropical Medicine And International Health*, 2 (9): 855-862
- Hallock Y.F., Manfredi K.P., Dai J.R., Cardellina J.H., Gulakowski R.J., MacMahon J.B., Schaffer M., Stahl M., Golden K.P., Brinkmann G., François G., Boyd M.R. (1997) Michellamines D-F, new HIV inhibitory dimeric naphthylisoquinoline alkaloids, and korupensamine E, a new antimalarial monomer, from *Ancistrocladus korupensis*. *J. Nat. Prod.*, 60: 677-683
- Harley-Mason J., Taylor C.G. (1969) Synthesis of the indole alkaloid elaecarpidine. *Aust. J. Chem.*, 22 (4): 801-806
- Hayes R.J., Marsh K., Snow R.W. (1992) Case-control studies of severe malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 95: 157-166
- Hedberg K., Shaffer N., Davachi F. (1993) *Plasmodium falciparum* associated anemia in children at a large urban hospital in Zaïre. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48: 365-371
- Henrik T.S., Jesper B.N., Ulla W.S., Ulf N., Pushpangadan P., Prabhakar J., George V. (2001) In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 195 – 204

- Honda T., Murae T., Tatsushi T., Tsuyuki T., Takahashi T., Sawai M. (1976) Arjungenin, arjunglucoside I, and arjunglucoside II. A new triterpene and new triterpene glucosides from *Terminalia arjuna*. *Bull. Chem. Soc.*, 49 (11): 3213-3218
- Honda T., Murae T., Tsuyuki T., Takahashi T. (1976) The structure of arjungenin. A new sapogenin from *Terminalia arjuna*. *Chem. Pharm. Bull.*, 24 (1): 178-180
- Hosup Y., Shin-Young P., Jinwoong K. (1998) A-ring contracted triterpenoid from *Rosa multiflora*. *Phytochemistry*, 48 (8): 1399-1401.
- Hottelier F., Delaveau P., Poussot J.L. (1979) Alcaloïdes et glucoalcaloïdes des feuilles de *Nauclea latifolia* SM. *Planta Med.*, 35: 242-246
- Hurd R.E., John B.K. (1990) Gradientenhanced spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 87 : 422-428
- Hurd R.E., John B.K. (1991) Gradientenhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantumcoherence spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 91 : 648-653
- Hussain R.A., Liu Y.M., Poveda L.J., Bordas E., Chung B.S., Pezzato J.M., Soejarto D.D., Kinghorn A.D. (1990) Plant derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *J. ethnopharmacol.*, 28 (1): 103-115
- Jensen J.B. (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27 : 1274-1276
- Johns S.R., Lambertson J.A., Sioumis A.A. (1968) Elaeocarpidine, a new indole alkaloid from *Elaeocarpus archboldianus*. *Aust. Chem. Commun.*, (7), 410
- Johns S.R., Lambertson J.A., Sioumis A.A., Suarez H., Willing R.I. (1971) *Elaeocarpus* alkaloids. IV. Alkaloids of *Elaeocarpus sphaericus*. *J. Chem.*, 24 (8): 1679-1694
- Jonathan A.K., Simon L.C., Howard K., Colin W.W. (2001) Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 99 – 103
- Jurgen C., Bernhard V., Iris K., Gudrun R., Ulrich W., Wolfgang K. (1998) Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry*, 48 (4): 647- 650
- Jurgen C., Bernhard V., Sabine R., Iris K., Stefan P., Gudrun R., Ertlada V., Mary C.S., Wolfgang K. (2001) Isoterchebulin and 4,6-O-Isoterchebuloyl-D-glucose, Novel Hydrolyzable Tannins from *Terminalia macroptera*. *J. Nat. Prod.*, 64: 294-299
- Kerharo J., Adam J.G. (1974) La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. *Edit. Vigot-Frères, Paris 1012*
- Khalid S.A., Duddeck H., Gonzales-Sierra M. (1989) Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.*, 52: 922-927
- Kirby G.C. (1996) Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90 (6): 605-609
- Kirby G.C. (1997) Plants as a source of antimalarial drugs. *Tropical Doctor*, 1: 7-11
- Kremsner P.G., Wildling E., Jenne L., Graninger W., Bienzle U. (1994) Comparaison of micronized halofantrine with chloroquine-antibiotic combinations for treating *Plasmodium falciparum* malaria in adults from Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50 (6): 790 – 795
- Kriby G.C. (1996) Medical plants and the control of parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 605-609
- Krogstad D.J., Schlesinger P.H., Hervaldt B.L. (1988) Antimalarial agents: mechanism of chloroquine resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 799-801
- Kumuhungui B.S., Ouattara C.A.T., Esposito F., Fumoux F., Traoré A.S. (1997) Etude de l'activité antiplasmodique des tanins et des alcaloïdes sur les souches de *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Actes des III<sup>èmes</sup> journées de la Société Burkinabè de Parasitologie, Ouagadougou, Burkina Faso*

- Kumulungu B.S., Ouattara C.A.T., Fumoux F., Esposito F., Traoré A.S. (1998) Rôle pharmacodynamique des alcaloïdes et des tanins des racines de *Mitragyna inermis* sur les cultures de *Plasmodium falciparum* in vitro. *Société Ouest Africaine de Parasitologie. Dakar, Sénégal*
- Kuria K.A.M., De Costa S., Muriuki G., Masengo W., Kibwage L., Hoogmartens J., Lackeman G.M. (2001) Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): in vitro confirmation of ethnopharmacological use. *Journal of ethnopharmacology*, 74: 141-148
- Lamidi M., Gasquet M., Ollivier E. (1996) Antiparasitic studies of *Nauclea diderrichii* bark. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 6: 31-33
- Laventure S., Mouchet J., Blanchy S., Marrama L., Rabarison P., Andrianaivolambo L., Rajaonarivelo E., Rakotoarivony L., Roux J. (1996) Le riz source de vie et de mort sur les plateaux de Madagascar. *Cahiers "santé"*, 2 (6): 79-86
- Le Bras J. (1993) La résistance du *Plasmodium falciparum*, Quinine, la bonne référence pour l'Afrique. *Actua. Palu.*, 5, 1-7
- Le Bras J., Basco L.K., Charmot G. (1993) Les bases de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et ses différents profils. *Cahiers « santé »*, 3 : 293-301
- Le Bras J., Basco L.K., Charmot G. (1993) Les bases de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* et ses différents profils. *Cahiers "santé"*, 3 : 293-301
- Le Bras J., Longuet C., Charmot G. (1998) Transmission et résistance des plasmodies. *Rev. Prat.* 48: 258-263
- Li G.Q., Guo X.B., Jian H.X., Fu L.C., Shen L.C., Li R.S., Dai B.Q., Li ZL. (1985) Observation on the efficacy of quinghaosu suppository in 100 cases of *falciparum* malaria. *J. Tradit. Chin. Med.*, 5 (3) : 159 - 161
- Longworth D.L. (1995) Drug-resistant malaria in children and in travellers. *Antimicrobial resistance in pediatrics*, 42: 649-664
- Looareesuwan S., Wilairatana P., Chokejindachai W., Chalermrut K., Wernsdorfer W., Gemperli B., Gathmann L., Royce C. (1999) A randomized, double-blind, comparative trial of a new oral combination of artemether and benflumetol (CGP 56697) with mefloquine in the treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (2): 238 - 243
- MacKinnon S, Durst T, Arnason JT, Angerhofer C, Pezzuto J, Sanchez-Vindas PE, Poveda LJ & Gbeassor M. (1997) Antimalarial activity of tropical *Meliaceae* extracts and gedunin derivatives. *J. Nat. Prod.*, 60 (4) : 336 - 341
- Magidson O.Y., Grigorovski A.M. (1936) Acridine compounds and their antimalarial action. (note de Mauss I. H. et Mietzsch F). *I. Chem. Ber.*, 69b: 396-401
- Magidson O.Y., Rubtov N.V. (1937) Quinoline compounds as sources of medicinal products. VI. Antimalarial compounds with the side chain in the four positions. *I. Gen. Chem.*, 7: 1896-1908
- Mahato S.B., Kunda A.P. (1994) <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclotriterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37 (6): 1517-1575
- Mahato S.B., Nandy A.K., Lager P., Weber M. (1990) Determination of structure and stereochemistry of tomentosic acid by x-ray crystallography. A novel mechanism for transformation of arjungenin to tomentosic acid. *Indian Inst. Chem. Biol.*, 2(8): 1445-1450
- Makinde J.M., Amusan O.O., Adesogan E.K. (1988) The antimalarial activity of *Spathodea campanulata* stem bark extract on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Planta Med.*, 54 (2): 122-125
- Makinde J.M., Awe S.O., Salako L.A. (1994) Seasonal variation in the antimalarial activity of *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*. *Fitoterapia*, LXV, 124-130
- Marsh K., Forster D., Waruiru C. (1995) Indicators of life-threatening malaria in african children. *N. Engl. J. Med.*, 332: 1399-1404

- Milhouz W.K., Gerena L., Kyle D.E., Oduola A.M. (1989) Emergence of multi-drug resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Biol. Res.*, 313: 61-72
- Molyneux M., Marsh K. (1991) Epidemiological aspects of severe and complicated malaria: research needs. *Appl. Field Res. Malaria Reports*, 2: 6-8
- Moreno A., Cuzin-Onattara N., Nebie L., Sanon S., Brasseur P., Druilhe P. (2001) Use of the DELI-microtest to determine the drug sensibility of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Ann. Trop. Med. Parasito.*, 95 (3): 309 – 312
- Mouchet J. (1980) Lutte contre les vecteurs et nuisance en santé publique. *Encycl. Med. Chir Paris, maladies infectueuses*, 120 : 10-13
- Moyen G., Nzingoula S., Mowandza-Ndinga J.C., Nkoua J.L., Mpemba A.B., Fourcade V. (1993) Le paludisme de l'enfant dans un service de pédiatrie à Brazzaville – à propos de 1073 observations. *Med. Afr. Noire*, 40 : 177-181
- Mueller M.S., Karhagomba I.B., Hirt H.M, Wemakor E. (2000) The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical; and clinical aspects. *Journal of ethnopharmacology*, 73: 487-493
- Mustofa, Valentin A., Benoit-Vical F., Pélissier Y., Koné-Bamba D., Mallié M. (2000) Antiplasmodial activity of plant extracts used in west african traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 73: 145-151
- Nandy A.K., Podder G., Saha N.P., Mahato S.B. (1989) Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. *Phytochemistry*, 28 (10): 2769-2772
- Nchinda T.C. (1976) Traditional and western medicine in Africa: collaboration or confrontation? *Tropical Doctor*, 6: 133-135
- Ndifor A.M., Howells R.E., Ward S.A. (1992) Chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in vitro in vivo in a savannah town in Cameroun. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86: 479-482
- Nevill C.G., Some E.S., Mung'ala V.O., Mutemi W., New L., Marsh K., Lengeler C., Snow R.W. (1996) Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop. Med. Int. Health*, 1: 139-146
- Nkunya M.H.H., Weenen H., Bray D.H., Mgani Q.A., Mwaumbi L.B. (1991) Antimalarial activity of Tanzanian Plants and their active constituents: The Genus *Uvaria*. *Planta Med.*, 57: 341-343
- Nongomierma R., Proliac A., Raynaud J. (1988) Vitexin and isovitexin in the flowers of *Terminalia macroptera* Guill. Et Perr. (Combretaceae). *J. Fac. Pharm.*, 43 (4): 293
- Nongomierma R., Proliac A., Raynaud J. (1990) O-Glycosyl flavonoids of flowers from *Terminalia macroptera* Guill. Et Perr. (Combretaceae). *Pharm. Acta. Helv.*, 65 (8): 233-235
- Ofulla A.V., Okoye V.C., Khan B., Githure J.L., Roberts C.R., Johnson A.J., Martin S.K. (1993) Cultivation of *Plasmodium falciparum* parasite in a serum-free medium. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49: 1017-1022
- Oketch-Rabah H.A., Christensen S.B., Frydenvang K., Dossaji S.F., Theander T.G., Cornett C., Watkins W.M., Kharazmi A., Lemmich E. (1998) Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalyxolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Med.*, 64: 559-562
- Oketch-Rabah H.A., Dossaji S.F., Christensen S.B., Frydenvang K., Lemmich E., Cornett C., Olsen C.E., Chen M., Kharazmi A. (1997) Antiprotozoal compounds from *Asparagus africanus*. *J. Nat. Prod.*, 60 : 1017-1022
- Oluwole O., Amusan G., Ezekiel K.A., Makinde J.M. (1996) Antimalarial active principles of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytoter. Res.*, 10: 692-693
- O.M.S. (1959) Malaria eradication throughout the world. *WHO Chronicle* 13, 348
- O.M.S. (1993) Mise en oeuvre de la stratégie mondiale de lutte antipaludique. Rapport d'un groupe d'étude de l'O.M.S sur la mise en oeuvre du plan mondial d'action pour la lutte contre le paludisme, 1993-2000. *Série de rapports techniques*, n° 839, 67p

- O.M.S. (1993) Rapport technique, 529 :128
- O.M.S. (1996) MALARIA n°5 and infectious diseases in Africa. *Minutes of the 2<sup>nd</sup> pan-african malaria meeting*
- O.M.S. (1996) World malaria situation in 1993. *Weekly Epidemiological Record*, 3: 17-22 ; 4: 25-29 ; 5: 37-39 ; 6: 41-48
- O.M.S. (1997) World malaria situation in 1994. *Weekly Epidemiological record*, 72 (36): 269-274
- O.M.S. (1998) African initiative for malaria control in the 21st century. *WHO*, 18p
- O.M.S. (1998) Rollback Malaria Project: resources support network for prevention and control of malaria epidemics. *Doc. OMS, n°CDS/RBM/RSN/EPI/98*
- Omulokoli E., Khan B., Chhabra S.C. (1997) Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 56: 133-137
- Onayade O.A., Scheffer J.J.C., Baerheim A. (1990) The importance of phytotherapy and screening of plants used medicinally in africa. *Planta Medica*, 56: 503-504
- Ouedraogo J.B., Guignemé T.R., Gbary A.R. (1987) Enquête sur la chimiosensibilité du paludisme et formation d'une équipe nationale aux tests de chimiosensibilité au Burkina Faso. *OCCGE, Doc. Techn., N° 9.173/73*
- Ouedraogo J.B., Guignemé T.R., Gbary A.R. (1990) Surveillance passive de la chimiorésistance palustre a Bobo Dioulasso. *Med. Afr. Noire*, 37 : 259-265
- Ouedraogo J.B., Guignemé T.R., Gbary A.R. (1990) Surveillance passive de la chimiorésistance palustre à Bobo- Dioulasso. *Med Afr. Noire*, 37: 259-265
- Pattaroyo M.E., Amador R., Clavior P. (1987) A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood of *P. falciparum* malaria. *Nature*,. 332: 158 – 161
- Pavol G., Wilson R.J., Smalley M.E., Brown J. (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 72 : 87-88
- Phillipson D.J. (1999) New drugs from nature-it could be yew. *Phytother. Res.*, 13: 2-8
- Phillipson D.J., Wright W.C. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *Journal of ethnopharmacology*, 32: 163-165
- Phillipson J.D. (1994) Natural products as drug. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 17-19
- Pietra V., Lamizana L., Del Nero L., Rotigliano G. (1992) Surveillance de la chimiosensibilité in vivo de *P. falciparum* à la chloroquine au Burkina Faso : évolution de la résistance 1988-1990. *Parasitologia*, 34 (1-3) : 131-134
- Pietra Y., Procacci P.G., Sabatinelli G., Kumlien S., Lamizana L., Rotigliano G. (1991) Impact de l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine sur le paludisme dans une zone rurale de haute transmission au Burkina Faso. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses filiales*, 84 (4) : 375-385
- Plowe V., Djimde A., Bouare M. (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutation in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52: 565-568
- Przesky E.A., Meyer J.J.M., Louw A.L (2001) *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of ethnopharmacology*, 76 (3): 239-245
- Puping L., Xingjie L., Xingcong L., Decheng Z., Toshio Y. (1992) Triterpenes of *Terminalia chebula* Retz. *Sc. Pharm.*, 34 (2): 126-132
- Ramachandran Nair A.G., Sankara Subramanan S., Bohlmann F., Schonewies S., Mabry T.J. (1976) A new diterpene galactoside from *Acanthospermum hispidum*. *Phytochemistry*, 15 : 1776-1778

- Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Rakoto-Ratsimamanga A. (1992) Quatre ans de recherche en chimiothérapie antipaludique, bilan et perspectives. *Rev. Med. Pharm. Afr.*, 212-217
- Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Ramanitrahasimbola D., Herintsoa R., Rakoto-Ratsimamanga A. (1999) Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine. *Journal of ethnopharmacology*, 64: 117 – 126.
- Ratsimamanga-Urverg S., Rasoanaivo P., Milijaona R., Rakotoarimanga J., Rafatro H., Robijaona B., Rakoto-Ratsimamanga A., Verdier F., Le Bras J. (1994) *In vitro* antimalarial activity, chloroquine potentiating effect and cytotoxicity of alkaloids of *Hernandia voyroni* Jum. (*Hernandiaceae*). *Phytother. Res.*, 8 (1): 18 – 21
- Robert V., Gazin P., Boudin C., Molez J.F., Ouédraogo V., Carnevale P. (1985) La transmission du paludisme en zone de savane arborée et en zone rizicole des environs de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Annale de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 65 (2) : 201-214
- Rouinson B.L (1992) The role of the *mdr1* (p-glycoprotein) gene in multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 95-102
- Rosset R., Cande M. & Jardy A. (1991) Chromatographies en phases liquides et supercritiques, 3<sup>ème</sup> édition, Masson Paris.
- Rotigliano G., Lamizana L., Procacci P.G., Kamlien S. (1990) *In vitro* sensibility of *P. falciparum* to chloroquino-resistance in Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84 (5): 670-671
- Saidu K., Onah J., Orisadipe A., Oluola A., Wambebe C., Gamaniel K. (2000) Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of ethnopharmacology*, 71: 275-280
- Samia M., El-Sayyad., Samir A. Ross., Hanaa M. Sayed. (1984) New isoquinolone alkaloids from the leaves of *Cassia siamea*. *Journal of Natural Products*, 47 (4) 708-710
- Sanon I., Pare J., Traoré S., Modiano D., Kam K.K., Kaboré J., Lamizana L., Sawadogo S.A., Guigemdé T.R. (1997) Formes cliniques du paludisme grave en milieu hospitalier pédiatrique a Ouagadougou. *Cahiers « Santé », 7 (1) : 13-17*
- Sanon S. (1998) Impact des rideaux imprégnés d'insecticide sur la transmission du paludisme par rapport à la position d'un village dans la zone d'étude. *Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou*
- Schapira A. (1990) The resistance of *P. falciparum* malaria in Africa to 4-aminoquinolones and antifolates. *Acandinav. J. Infect. Dis. Suppl.*, 75
- Senga P., Betho V.M.F., Nzingoula S. (1991) Les anémies palustres chez l'enfant à Brazzaville. *Arch. Fr. Pédiatr.*, 48: 299-300
- Shafiullah M., Parveen M., Kamil M., Ilyas. (1995) A new isoflavone C-glycoside from *Cassia siamea*. *Fitoterapia*, LXVI (5): 439-441
- Shafiullah, Mohammad S.K., Mehtab P., Mohammad K., Mohammad I. (1996) Isolation of 2',3',6-trihydroxy-4'-methoxy-7-O-neohesperidoside, a Novel Glycoside from *Cassia siamea*. *J. Chem. Research. (s)*: 2-3
- Sharma P., Sharma J.D. (1999) Evaluation of *in vitro* schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*-an ethnobotanical approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 83 – 95
- Siddiqui W.A. Richmond-crum S.M. (1977) Fatty acid-free bovine albumin as plasma replacement for *in vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*. *J. Parasitol.*, 63: 583-584
- Silva O., Duarte A., Cabrita J., Pimentel M., Diniz A., Gomes E. (1996) Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *Journal of ethnopharmacology*, 50 (1): 55-59
- Silva O., Dwarte a., Pimental M., Viegas S., Barroso H., Machado J., Pires L., Cabrita J., Gomes E. (1997) Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. *Journal of Ethnopharmacology*, 57: 203-207

- Silva O., Gomes E.T., Wolfender J-L., Marston A., Hostettmann K. (2000) Application of high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry to the characterization of ellagitannins from *Terminalia macroptera* roots. *Pharm. Res.*, 17 (11): 1396-1401
- Simonsen H.T., Nordskjold J. B., Smitt U.W., Nyman U., Palpu P., Joshi P., Varughese G. (2001) *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiparasitic activity. *Journal of ethnopharmacology*, 74: 195-204
- Sindiga L, Nyaigotti-chacha C., Kamunah M.P. (1995) Is fever a good sign for clinical malaria in endemic communities? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52: 306-310
- Snow R.W., Omumbo J.A., Lowe B., Molyneux C.S., Obiero J.O., Plamer A., Weber M.W., Pinder M., Nahlen B., Obonyo C., Newbold C., Gupta S., Marsh K. (1997) Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet*, 349 (9066): 1650 – 1654
- Sofoworo A. (1980) The present status of knowledge of the plants used in traditional medicine in Western Africa: a medical approach and chemical evaluation. *Journal of ethnopharmacology*, 2: 109-118
- Su X., Kirkman L.A., Fujioka H., Wellemans T.E. (1999) Complex polymorphisms in an approximately kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell.*, 91: 593-603
- Summerfield A., Keil G.M., Mettenleiter T.C., Rziha H.J., Saalmuller A. (1997) Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Res.*, 36 (1): 55-62
- Takayama H., Katsura M., Seki N., Kitajima M., Aimi N., Sakai S., Santiaworn D., Liawarnangrath B. (1992) Elaeocarpidine, a naturally occurring racemate, from *Tarenna vanprukii*. *Planta Med.*, 58 (3): 289-291
- Tella A. (1976) Studies on *Azadirachta indica* in malaria [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.*, 58 (2) : 318
- Ter Kuile F.O., Dolan G., Nosten F., Edstein M.D., Luxemburger C., Phaipun L., Chongsaphajaisiddhi T., Webster H.K., White N.J. (1993) Halofantrine versus mefloquine in treatment of multidrug-resistant *falciparum* malaria. *Lancet*, 341 (8852) : 1044 – 1049
- Thonggaard W., Deachapanya C., Pongsakorn S., Boyd E.A., Bennett G.W., Marsden C.A. (1996) Barakol : a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53 (3): 753-758
- Thonggaard W., Pongsakorn S., Sudsang R., Bennett G.W., Kendall D.A., Marsden C.A. (1997) Barakol, a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but off uptake *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 319 (2-3) : 157-164
- Tomas-Barberan F.A., Hostettmann K. (1988) A cytotoxic triterpenoid and flavonoids from *Crossopteryx febrifuga*. *Planta Med.*, 54 (3): 266-267
- Toua L., Ngimbi N.P., Tsakala M., Mesia K., Cimanga K., Aperi S., De Bruyne T., Pieters L., Totté J., Vlietinck A.J. (1999) Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *Journal of ethnopharmacology*, 68: 193-203
- Trager W. & Jensen J.P. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675
- Trager W. (1987) The cultivation of *Plasmodium falciparum*: application in basic and applied research on malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 81 : 511 – 529
- Trager W., Jensen J. (1997) Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: impact on malaria research. *J. Parasitol.*, 27 : 989-1006
- Trager W., Polonsky J. (1981) Antimalarial activity of quassinoids against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56: 539-537
- Trager W., Polonsky J. (1994) Antimalarial activity of quassinoids against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30: 531-537
- Traore-Keita F., Gasquet M., Di Giorgio C., Ollivier E., Delmas F., Keita A., Doumbo O., Balansard G., Timond-David P. (2000) Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. *Phytoter. Res.*, 14 : 45-47
- Udeinya L.J. (1993) Anti-malarial activity of Nigerian neem leaves. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87: 471

- Ueno H.M., Doyama J.T., Padovani C.R., Salata E. (1996) [Effect of *Momordica charantia* L. in mice infected with *Plasmodium berghei*]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 29 (5) : 455 – 460
- Valentin A., Pelissier Y., Benoit F., Marion C., Kone D., Mallie M., Bastide J.M., Bessiere J.M. (1995) Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytother.*, 2: 141-146
- Van Der Geest S. (1997) Is there a role for traditional medicine in basic health services in Africa? A plea for a community perspective. *Tropical Medicine And International Health*, 2 (9): 903-911
- Van der Heyde H.C., Elloso M.M., Vande Waa J., Schell K., Weidanz W. (1995) Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects leucocytes on the malarial parasite. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2 (4): 417-425
- Van Vugt M., Wilairatana P., Gemperli B., Gathmann L., Phaipan L., Brockman A., Luxemburger C., White N.J., Nosten F., Loareesuwan S. (1999) Efficacy of six doses of artemether-lumfantrine (benflumetol) in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (6): 936 – 942
- Vaugelade J. (1987) Les besoins de santé exprimés par une population rurale du Burkina, symposium international « le médicament essentiel dans les pays en développement », Paris, 19-20
- Vennerstrom J.L. Klayman D.L. (1989) Protoberberine alkaloids as antimalarial. *J. Med. Chem.*, 31: 1084-1087
- Vigya S., Singh J., Sharma J.P. (1992) Anthraquinones from heartwood of *Cassia siamea*. *Phytochemistry*, 31 (6): 2176-2177
- Wardell D.A., Molynaux M.E., Beales P.F. (1990) Severe and complicated malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84 (2): 1-65
- Weenen H., Nkanya M.H.H., Bray D.H., Mwasumbi L.B., Kinabo L., Kilimahi V.A.E., Wijaberg J.B.P.A. (1990) Antimalarial compounds containing an  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl moiety from Tanzanian medicinal plants. *Planta Med.*, 56: 371-373
- Wellems E.T., Wootton J.C., Fajoka H., Su X., Cooper R., Baruch D., Fidock D.A. (1998) *Plasmodium falciparum* CG2, linked to chloroquine resistance, does not resemble Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Cell.*, 94: 285-286
- Wellems T.E. (1992) Molecular genetics for drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology today*, 7: 110-112
- Wernsdorfer W.H. (1994) Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*, 56: 143-156
- Wernsdorfer W.H., Payne D. (1991) The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmac. Ther.*, 50: 95-121
- White N.J. (1994) Artemisinin: current status. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88 (1): 3-4
- Wilker W., Leibfritz D., Kernschbaum R., Berniel W. (1993) Gradient selection in inverse heteronuclear correlationspectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 31 : 1184-1186
- Wilson C.M., Serrano A.E., Wasley A., Bogenschutz M.P., Shankar A.H., Wirth. (1989) Amplification of a gene related to mammalian *mdr* gene in drug resistant *P. falciparum*. *Science*, 244: 1184-1186
- Wilson C.M., Volkman S.K., Thaitong S., Martin R.K., Kyle D.E., Milhous W.K., wirth D.F. (1993) Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57: 151-160
- Wright C.W., Phillipson J.D. (1990) Natural products: the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother. Res.*, 4: 127-139
- Wright C.W., Phillipson J.D., Awe S.O., Kirby G.C., Warhurst D.C., Quetin-Leclercq J., Augenot L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and some their anhydronium bases. *Phyoter. Res.*, 10: 361-363
- Wyatt C., Goff W., Davis W. (1991) A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *J. Immunol. Meth.*, 140: 23-30

# ANNEXES

Date:...../...../200...

PHYTOTHERAPEUTE/TRADIPRATICIEN/HERBORISTE  /  / 

Nom:..... Prénom (s):.....

Date et lieu de naissance:..... Sexe:.....

Ville/village:..... Pays:.....

Adresse:.....

**PLANTE**

Nom scientifique:.....

Nom vulgaire:.....

Nom vernaculaire: Mooré, Bobo, Dioula:.....

Partie utilisée:  Feuilles,  Ecorces de tronc,  Racines,  fruits

Autres:.....

Etat du matériel végétal à l'utilisation:  Sec,  Frais,  Calciné,**MODE DE PREPARATION**

Récipient:..... Liquide de préparation:..... Quantité:.....

Méthode:  Décoction,  Infusion,  Macération

Autres plantes associées:.....

Produits associés:.....

Préparation : Durée:..... Période :..... Lieu :.....

**TRAITEMENT** Voie orale,  Bain corporel,  Bain de vapeur,  Fumigation,  massage Autres (à préciser):.....

Dose:

• Enfant:.....

• Adulte:.....

Duré:.....

**OBSERVATIONS:**.....  
.....  
.....

## **ANNEXE 2 : Synthèse des informations obtenues au cours du recensement sur les plantes les plus citées**

### **1. Enquête à Léquéma**

Léquéma est un village situé à environ 15 Km à l'Est de Bobo Dioulasso. Nous avons interviewé xx personnes tous des tradithérapeutes.

- Thérapeute N°1 : il s'appelle Salia Kalo. Il est né vers 1936 à Léquéma. Il est agriculteur et tradipraticien de profession. Salia Kalo a longtemps utilisé les plantes dans le traitement des affections courantes. Il donne ici trois de ses recettes qu'il prescrit en soins curatifs du paludisme.

#### *\*Crassopteryx febrifuga*

Il appelle cette plante « saiguai sangansô » nom vernaculaire bobo. La récolte se fait pendant la saison des pluies. Les feuilles fraîches sont idéalement utilisées pour faire un décocté. La préparation se fait dans un canari ou une marmite avec de l'eau naturelle<sup>1</sup> pendant 2 heures au moins. Le décocté est utilisé à la dose de 1 calebasse 2 fois par jour pour un enfant. Pour l'adulte, il conseille de boire autant que la personne peut (entre 3 à 5 calebasses par jour). Le traitement dure 5 jours au maximum.

#### *\*Acanthospermum hispidum*

Cette herbe dont le nom vernaculaire bobo est « salossô » est entièrement utilisée par Salia Kalo pour soigner les symptômes du paludisme. Elle est récoltée surtout pendant la saison des pluies. La décoction est réalisée dans un canari à partir du matériel végétal frais ou sec avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures environ. La préparation est boe à raison de 2 verres par jour (matin et soir) pour un enfant et de 3 verres par jour (matin, midi et soir) pour un adulte. Le traitement se fait jusqu'à soulagement constaté du malade.

#### *\*Pavetta crassipes*

Les feuilles de cette plante généralement utilisées dans la préparation de la pâte à base de farine, à Léquéma, sont aussi conseillées par Salia Kalo dans les soins curatifs du paludisme. Les feuilles de préférence fraîches sont portées à ébullition dans l'eau pendant un peu moins d'une heure. Le décocté obtenu est bu à raison d'un demi-verre 1 à 2 fois par jour pour un enfant et 1 verre 1 à 2 fois par jour pour un adulte. La durée de traitement n'est pas précisée. Il doit poursuivre jusqu'à guérison. Cette plante est facilement disponible en saison des pluies.

- Thérapeute N°2 : son nom est Souro SANOU. Il est né à Léquéma vers 1942 et pratique l'agriculture vivrière. Il donne des soins curatifs à partir des plantes médicinales.

#### *\*Crassopteryx febrifuga*

Il utilise les feuilles fraîches de cette plante pour les soins. L'eau naturelle est le liquide de préparation du décocté qui se fait pendant un peu moins d'une heure dans un canari. Le patient est traité par voie orale à la dose d'une demi-calebasse de décocté 2 fois par jour pour un enfant et 2 calebasses 2 fois par jour pour un adulte. Le bain corporel doit accompagner le traitement par voie orale à raison de 2 fois (matin et soir) par jour.

#### *\*Acanthospermum hispidum*

Les accès fébriles sont traités avec le décocté obtenu à partir des tiges feuillées fraîches ou sèches de cette plante. Il est conseillé de les utiliser fraîches car sèches les feuilles tombent facilement laissant les épines et les tiges, difficiles à récolter. La décoction se fait dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures. Le traitement est donné fait par voie orale : pour un enfant 1 à 2 verres par jour pendant 1 semaine et pour un adulte 3 à 4 verres par jour pendant 1 semaine.

#### *\*Pavetta crassipes*

Cette plante est connue sous le nom vernaculaire bobo de « yantan ». Souro SANOU utilise le décocté à partir des feuilles fraîches ou sèches pour soigner les malades présentant les symptômes du paludisme. La préparation se fait dans un canari pendant 2 à 3 heures de temps. En ce qui concerne le traitement, il donne à l'enfant un demi-verre de décocté 3 fois par jour et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement dure 4 jours au moins.

- Thérapeute N°3 : Soumana Sogo dit Kokolo est un cultivateur tradipraticien né à Léquéma vers 1932.

#### *\*Crassopteryx febrifuga*

---

<sup>1</sup> Eau naturelle : eau non traitée provenant d'une mare, d'un fleuve ou d'un puits ;

Les feuilles fraîches sont utilisées pour faire un décocté dans un canari avec de l'eau naturelle pendant un peu moins d'une heure. La dose pour le traitement est d'une calabasse 2 fois par jour pour un enfant et 2 à 3 calabasses 2 fois par jour pour un adulte.

*\*Acanthospermum hispidum*

Toute la plante herbacée fraîche ou sèche est conseillée par ce thérapeute traditionnel comme plante antipaludique. La préparation (décoction) se fait dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 3 heures environ. Le décocté est bu à raison d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte et cela pendant 5 jours. Il est aussi utilisé en bain corporel.

*\*Pavetta crassipes*

Selon Soumana Sogo, *Pavetta crassipes* du nom vernaculaire bobo de « yantan », soigne les malades présentant les symptômes du paludisme. Les feuilles fraîches ou sèches sont utilisées pour faire la décoction. La préparation se fait dans un canari pendant 2 heures environ. Le traitement est de 1 verre de décocté 2 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement dure 3 à 4 jours au moins.

- Thérapeute N°4 : il se nomme Vinsoum SANOU, né vers 1942 à Léguéma. Il est cultivateur tradipraticien.

*\* Crassoptyryx febrifuga*

Il utilise *Crassoptyryx febrifuga* du nom vernaculaire bobo « saigui sangansô » pour traiter le paludisme. Les feuilles fraîches ou sèches sont utilisables. La décoction se fait 1 à 2 heures environ dans n'importe quel récipient (marmite ou canari) avec de l'eau naturelle. Le traitement avec le décocté se fait par voie orale à la dose d'un demi-verre 2 à 3 fois par jour pour un enfant et 1 à 2 verres 2 à 3 fois par jour pour un adulte. Le bain corporel doit accompagner le traitement par voie orale à raison de 2 fois (matin et soir) par jour.

*\* Acanthospermum hispidum*

Vinsoum SANOU traite les accès fébriles avec cette plante sous forme de décoction. Du nom vernaculaire bobo « Salossô », les tiges feuillées de cette plante sont utilisées fraîches ou sèches. La décoction se fait dans un canari avec de l'eau naturelle. Du sucre peut être ajouté afin d'atténuer un peu le goût amer du décocté. Le traitement se fait par voie orale, pour un enfant 1 calabasse 2 fois par jour pendant 4 à 5 jours et pour un adulte 1 calabasse 3 à 4 fois par jour pendant 4 à 5 jours.

*\* Pavetta crassipes*

Cette plante est également connue du thérapeute N°4. Il utilise les feuilles fraîches pour préparer le décocté dans un canari ou une marmite avec de l'eau naturelle. Le décocté, après une heure environ d'ébullition, est obtenu. La posologie est d'un demi-verre 3 fois (matin, midi et soir) par jour pour un enfant et 1 à 2 verres 3 fois par jour pour un adulte.

- Thérapeute N°5 : il s'appelle Vinsoum Abdoulaye SANON. Il est né en 1972 à Léguéma. Il est agriculteur mais donne souvent des soins curatifs à partir des plantes médicinales de la région. Il a cité *Crassoptyryx febrifuga* comme plante antipaludique. Les feuilles de la plante sont utilisées fraîches pour préparer le décocté dans un canari avec de l'eau naturelle. La préparation dure environ 1 heure. Pour le traitement il conseille une calabasse 2 fois par jour pour un enfant et 2 calabasses 2 fois par jour pour un adulte.

- Thérapeute N°6 : ce thérapeute traditionnel âgé de 30 ans environ s'appelle Kouessé SANOU. Cultivateur, il utilise une décoction des feuilles fraîches ou sèches de *Pavetta crassipes* pour soigner les symptômes du paludisme. La préparation se fait avec de l'eau naturelle dans un canari pendant un peu moins d'une heure. Le traitement se fait par voie orale, accompagné d'un bain corporel. La posologie est d'une calabasse 2 fois par jour pour un enfant et de 3 calabasses par jour pour un adulte. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison.

## 2. Enquête à Baré

-Thérapeute N°1 : Sanou Sompro, tradipraticien d'environ 60 ans est né à Baré. Il nous rapporte ici certaines de ses recettes de sa pharmacopée locale.

*\* Crassoptyryx febrifuga*

Il utilise les feuilles fraîches ou sèches de cette plante. La décoction est faite dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures. La dose pour le traitement est d'environ ¼ de verre 2 fois par jour pour un enfant et ½ verre 2 fois par jour pour un adulte.

*\* Pavetta crassipes*

Il utilise les feuilles fraîches ou sèches qu'il récolte pendant la saison des pluies. La décoction se fait dans un canari avec de l'eau naturelle. La préparation dure 1 à 2 heures. Pour ce qui est de la dose, il conseille ¼ de verre 2 fois par jour pour un enfant et ½ verre 2 fois par jour pour un adulte.

- **Thérapeute N°2** : il se nomme Sanou Siné Abraham. Né en 1962 à Baré, il est cultivateur tradipraticien de la région. Parmi les recettes de sa médecine traditionnelle figurent les plantes suivantes :

*\*Crossopteryx febrifuga*

Les feuilles fraîches ou sèches de cette plante sont utilisées. La récolte se fait à la saison des pluies. La décoction est faite dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures. La dose pour le traitement est d'environ ¼ de verre 2 fois par jour pour un enfant et ½ à 1 verre 2 fois par jour pour un adulte. Ce thérapeute signale un effet indésirable qui peut être les vomissements.

*\* Pavetta crassipes*

Il utilise les feuilles fraîches ou sèches qu'il récolte pendant la saison des pluies. La décoction se fait dans un canari avec de l'eau naturelle. La préparation dure 1 à 2 heures. Pour ce qui est de la dose, il conseille ¼ de verre 2 fois par jour pour un enfant et ½ verre 2 fois par jour pour un adulte. Le vomissement constitue un effet indésirable.

- **Thérapeute N°3** : SIMORO Jean est né vers 1953 à Yié. Il est cultivateur tradipraticien à Baré. Il donne ici deux des recettes qu'il dispose pour les soins curatifs traditionnels du paludisme.

*\*Pavetta crassipes*

La partie utilisée de la plante correspond aux feuilles fraîches ou sèches récoltées surtout pendant la saison des pluies. La méthode de préparation est la décoction réalisée dans un canari avec de l'eau naturelle pendant une heure environ. Le traitement se fait par voie orale et par bain corporel. La dose est d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et de 3 verres 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement dure 7 jours.

*\* Acanthospermum hispidum*

Selon SIMORO Jean, la plante entière est utilisée fraîche ou sèche pour préparer le décocté. La préparation se fait dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures de temps. Le traitement se fait par voie orale et par bain de vapeur. Le malade doit boire le décocté à la dose de 2 verres par jour pour un enfant et 3 verres par jour pour un adulte jusqu'à guérison.

**3. Enquête à Dinderesso**

A Dinderesso, un phytothérapeute nous a donné des informations concernant certaines des plantes antipaludiques utilisées dans la région. Il s'agit de Alassane OUEDRAOGO né en 1963. Il est agent des eaux et forêts à l'ENEF de Dinderesso.

*\*Crossopteryx febrifuga*

Les feuilles de cette plante sont utilisées fraîches ou sèches. Elles sont préparées par décoction dans tout récipient avec de l'eau naturelle. La quantité est de 30 g environ pour 1,5 litres d'eau. La préparation nécessite 15 minutes d'ébullition. Le traitement se fait par voie orale, en bain de vapeur et/ou en bain de vapeur. Pour l'enfant, la dose par voie orale est d'un demi-litre de décocté par jour et pour un adulte 1 litre par jour.

*\*Acanthospermum hispidum*

Du nom français « Courtisan de volaille », la plante est utilisée entière selon Alassane Ouédraogo. L'espèce est rudérale et saisonnière et peut être fraîche ou sèche. Elle se prépare en décoction dans tout récipient avec de l'eau naturelle. La quantité est de 3 litres d'eau. La durée de la préparation est de 20 minutes en ébullition. Elle est utilisée en association avec *Cochlospermum planchonii* ou *Cochlospermum tinctorium* ou *Ficus sycomorus ssp gnaphalocarpa*. Le traitement se fait soit par voie orale, soit par bain de vapeur ou bain corporel. La dose est d'un 1 litre par jour pour un enfant et 1,5 litres pour un adulte. Le traitement dure 3 à 7 jours.

*\*Pavetta crassipes*

Cette espèce du nom vernaculaire mooré « Mònk-bissri » est utilisée pour traiter les malades présentant les symptômes du paludisme. Les feuilles fraîches ou sèches sont utilisées pour faire la décoction. La préparation se fait dans tout récipient pendant 15 minutes d'ébullition. La quantité est de 30 g pour 1,5 litres d'eau. Elle est associée à *Acanthospermum hispidum*. Le traitement se fait par voie orale, par bain corporel ou par bain de vapeur. La dose est de ½ verre de décocté 3 fois par jour pour un adulte pendant 4 à 5 jours. Le traitement pour un enfant n'a pas été fourni.

*\* Ficus sycomorus ssp gnaphalocarpa*

Cette espèce est citée par le forestier écologiste. Du nom vernaculaire dioula « Toro-kiema » et mooré « Karkanga », on utilise les feuilles et les écorces de tronc fraîches ou sèches pour préparer le décocté. Tout récipient peut être utilisé pour la préparation. La quantité est de 15 g de feuilles et 20 g d'écorces pour 3 litres d'eau naturelle. Les plantes associées sont *Cochlospermum planchonii* et *Acanthospermum hispidum*. La préparation dure 20 minutes à ébullition. Le traitement se fait par voie orale, par bain corporel et/ou par bain de vapeur. Le bain corporel se fait 2 fois par jour pour tout âge. La dose à boire est d'un demi-litre par jour pour un enfant et 1 litre par jour pour un adulte. Le traitement dure 3 à 7 jours.

#### 4. Enquête à Koumdimi

- Thérapeute N°1 : MILLOGO Souro est cultivateur tradipraticien, né vers 1951 à Koumdimi. Il rapporte ici quelques plantes de sa pharmacopée locale que sont :

##### \**Crossopteryx febrifuga*

Du nom vernaculaire bobo « saiguai sangansô », cette espèce est utilisée pour les soins curatifs du paludisme. Les feuilles sont utilisées surtout fraîches. La préparation traditionnelle est la décoction. Elle se fait dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 heure environ. Le traitement se fait par voie orale et par bain de vapeur. La dose est d'une calabasse par jour pour un enfant et 2 à 3 calabasses par jour pour un adulte.

##### \**Acanthospermum hispidum*

Toute la plante herbacée est utilisée fraîche ou sèche. Elle est préparée en décoction dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 2 à 3 heures. Le décocté est bu et utilisé en bain corporel. La posologie est de 1 à 2 petites calabasses par jour pour un enfant et de 3 à 4 calabasses par jour pour un adulte et cela jusqu'à guérison.

##### \**Pavetta crassipes*

Cette espèce fait aussi partie des plantes utilisées par Millogo Souro. Les feuilles sont utilisées fraîches ou sèches pour la préparation du décocté. La préparation se fait dans un canari pendant 1 heure. Le traitement est d'une calabasse 2 fois par jour pour un enfant et 2 à 3 calabasses 2 fois par jour pour un adulte et cela jusqu'à guérison.

- Thérapeute N°2 : MILLOGO Soungalo est né vers 1954 à Koumdimi. Il est agriculteur tradipraticien. Il nous a donné ses recettes de la pharmacopée traditionnelle utilisant ces plantes.

##### \**Crossopteryx febrifuga*

Comme les autres praticiens, il utilise les feuilles de cette espèce fraîches ou sèches pour préparer le décocté. Le matériel de préparation est le canari. Le liquide est de l'eau naturelle. La préparation dure 2 à 3 heures de temps. Le traitement se fait par voie orale et/ou par bain corporel. La dose est de 3 petites calabasses par jour pour un enfant et 3 calabasses moyennes par jour pour un adulte. Le traitement est poursuivi jusqu'à guérison.

##### \**Pavetta crassipes*

Selon ce thérapeute traditionnel, *Pavetta crassipes* soigne les malades présentant les symptômes du paludisme. Les feuilles fraîches ou sèches sont utilisées pour la décoction. La préparation se fait dans un canari pendant 2 heures de temps environ. Le traitement se fait par voie orale, par bain corporel ou par bain de vapeur. La dose est de 2 calabasses par jour pour un enfant et 4 calabasses par jour pour un adulte. Le traitement dure 5 jours au moins.

- Thérapeute N°3 : un des thérapeutes traditionnels de Koumdimi est MILLOGO Zézouma. Né vers 1934, il est cultivateur tradipraticien.

##### \**Crossopteryx febrifuga*

Il utilise les feuilles fraîches ou sèches de cette espèce. La décoction est faite dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 2 à 3 heures. Du jus de citron est ajouté. Le traitement se fait par voie orale, accompagné de bain corporel. La dose pour le traitement est d'un demi-verre de décocté 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison.

##### \**Acanthospermum hispidum*

Millogo Zézouma traite les accès palustres avec cette plante sous forme de décoction. Du nom vernaculaire bobo « Salossô », les tiges feuillées de cette plante sont utilisées fraîches ou sèches. La décoction se fait dans un canari avec de l'eau naturelle en y ajoutant des morceaux de citron. La préparation dure 1 à 2 heures environ. Le traitement se fait par voie orale et par bain corporel. La dose pour un enfant est d'un demi-verre 3 fois par jour et pour un adulte 1 verre 3 fois par jour jusqu'à guérison.

## 5. Enquête à Borodougou

A Borodougou nous avons rencontré, SANOU Paulin Sompro âgé d'environ 72 ans qui est un agriculteur tradipraticien de profession. De ses informations, nous rapportons celles de deux espèces de plantes les plus connues comme antipaludéennes dans la pharmacopée locale.

### \**Acanthospermum hispidum*

Les tiges feuillées de la plante sont utilisées fraîches ou sèches. La préparation se fait dans un canari avec de l'eau naturelle portée à ébullition pendant 2 heures. Le décocté est utilisé par voie orale et par bain corporel. Le malade doit boire 2 calbasses par jour s'il est enfant. La dose adulte est de 3 calbasses par jour. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison.

### \**Pavetta crassipes*

Il utilise les feuilles fraîches ou sèches de cette espèce pour la préparation du décocté. La préparation se fait dans un canari avec de l'eau naturelle pendant 1 à 2 heures d'ébullition. Le traitement se fait par voie orale et par bain corporel. La dose est d'une calbasse par jour pour un enfant et 2 à 3 calbasses par jour pour un adulte jusqu'à guérison.

## 6. Enquête dans la ville de Bobo dioulasso

- **Thérapeute N°1** : OUEDRAOGO Dramane est un herboriste aveugle et lépreux. Il est assisté soit de sa femme soit de son fils d'une trentaine d'années. Il a environ 60 ans. Cet herboriste a accepté de nous donner les recettes de sa pharmacopée parce qu'il a été abordé par l'intermédiaire d'un de ses fidèles clients. Il a été convaincu par le fait que ce Monsieur était à la recherche d'un bon antipaludique parce qu'il avait des rechutes fréquentes de paludisme malgré les traitements suivis. Il nous a donné une recette composée de plusieurs plantes qu'il a fallu identifier plus tard avec l'aide d'un écologiste. Ainsi, faisaient partie du traitement les espèces suivantes :

*Myrtagyna inermis* (feuilles et racines), *Anogeissus leiocarpus* (feuilles), *Securinega virosa* (feuilles), *Cassia sieberiana* (feuilles et racines), *Barchinia rufescens* (feuilles), *Ochna sveinfurshiana* (feuilles), *Combretum molle* (feuilles), *Bamboussa vulgaris* (feuilles), *Gardinia sokotensis* (feuilles), *Terminalia avicenoides* (racines), *Pavetta crassipes* (feuilles), *Nauclea latifolia* (racines), *Trichilia emetica* (racines), *Datarium microcarpum* (racines), *Pseudoedrela kostchy* (racines), *Diospyros mespiliformis* (racines), *Cochlospermum planchonii* (feuilles et racines), *Canthium sp* (feuilles), *Opilia celtidifolia* (feuilles), *Acanthospermum hispidum* (tiges feuillées). Toutes ces plantes sont employées sèches mais il a indiqué qu'elles pouvaient être utilisées fraîches.

Ce thérapeute traditionnel propose de préparer une décoction de ces plantes dans un même canari. Il s'agit d'une association de 20 plantes dont le décocté est utilisé par voie orale et en bain corporel. La dose est d'un demi-verre 2 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement dure au maximum 3 jours. Parmi des espèces figurent *Pavetta crassipes* et *Acanthospermum hispidum*.

- **Thérapeute N°2** : elle s'appelle SANOU Awa . Elle est herboriste tradipraticienne à Bobo dioulasso. Elle a présenté des espèces de plantes antipaludéennes parmi lesquelles figurait *Acanthospermum hispidum*. Elle la vend en tiges feuillées sèches mais peut être utilisée à l'état frais. La préparation se fait dans tout récipient (canari ou marmite). La décoction qui se fait avec de l'eau naturelle doit durer 1 à 2 heures. Le traitement se fait par voie orale et par bain corporel. La posologie est d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte jusqu'à guérison.

- **Thérapeute N°3** : le troisième herboriste s'appelle SANGARE Majoula. Elle a donné quelques espèces de plantes antipaludiques de sa boutique parmi lesquelles figurent :

### \**Pavetta crassipes*

Les feuilles sèches de cette espèce sont vendues mais peuvent être utilisées fraîches. Elles sont préparées dans un canari ou une marmite avec de l'eau naturelle pendant 2 heures à ébullition. Le traitement est par voie orale à la dose d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le bain corporel doit accompagner le traitement par voie orale. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison.

### \**Crossopteryx febrifuga*

SANGARE Majoula utilise les feuilles sèches ou fraîches de cette espèce. La préparation se fait dans un canari ou une marmite avec de l'eau naturelle. Le décocté est bu à raison d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement se poursuit jusqu'à guérison.

### \**Acanthospermum hispidum*

On utilise les tiges feuillées sèches ou fraîches de cette plante. Elles sont préparées dans tout récipient avec de l'eau naturelle pendant 1 heure environ. Le traitement se fait par voie orale et par bain de vapeur. La dose est d'un demi-verre 3 fois par jour pour un enfant et 1 verre 3 fois par jour pour un adulte. Le traitement se poursuit jusqu'au moment où le malade ne présente plus les symptômes traités (fièvre, maux de tête).

### ANNEXE 3 : Composition du milieu de culture RPMI-1640 lyophilisé

Composants	PM	Concentration (mg/l)	Molarité (mM)
<b>a) Sels minéraux</b>			
Nitrate de calcium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	236	100,00	0,424
Chlorure de potassium (KCl)	75	400,00	5,30
Sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ )	120	48,84	0,407
Chlorure de sodium (NaCl)	58	6000,00	103,44
Phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	142	800,00	5,63
<b>b) Acides aminés</b>			
L-Arginine	174	200,00	1,10
L-Asparagine	132	50,00	0,379
Acide L-Aspartique	133	20,00	0,150
Dihydrochlorure de L-Cystine	313	65,00	0,206
Caide L-Glutamique	147	20,00	0,136
L-Glutamine	146	300,00	2,05
Glycine	75	10,00	0,133
L-Histidine	155	15,00	0,0967
L-hydroxyproline	131	20,00	0,153
L-Isoleucine	131	50,00	0,382
L-Leucine	131	50,00	0,382
Dihydrochlorure de L-Lysine	146	40,00	0,219
L-Méthionine	149	15,00	0,101
L-Phénylalanine	165	15,00	0,0909
L-Proline	115	20,00	0,174
L-Sérine	105	30,00	0,286
L-théonine	119	20,00	0,168
L-Tryptophane	204	5,00	0,0245
Dihydrate de Sodium L-Tyrosine	261	29,00	0,110
L-Valine	117	20,00	0,171
<b>c) Vitamines</b>			
Biotine	244	0,2	0,008
D-Ca Pantothenate	477	0,25	0,0005
Chlorure de Choline	140	3,00	0,0214
Acide folique	441	1,00	0,0022
i-Inositol	180	35,00	0,194
Niacinamide	122	1,00	0,0081
Pyridoxine HCl	206	1,00	0,0048
Riboflavine	376	0,20	0,0005
Thiamine HCl	337	1,00	0,0029
Vitamine B12	1355	0,005	0,00000369
<b>d) autres composés</b>			
Glucose	180	2000,00	11,10
Glutathion réduit	307	1,00	0,0032
Phénol	398	5,00	0,0125

## **ANNEXE 4 : Communication et Productions scientifiques**

**Sanon S.**, Kumulungui B., Ouattara C.A.T. , Barro N., Fumoux F., Traoré A.S. 1998. Etude comparative de l'activité hémolytique de quelques plantes utilisées dans le traitement du paludisme au Burkina Faso. *Vèmes journées de la Société Burkinabè de Parasitologie (SO.B.PAR.)*, CCM, Ouagadougou, Burkina Faso

**Sanon S<sup>a,d</sup>**, Ollivier E<sup>b</sup>, Azas N<sup>c</sup>, Mahiou V<sup>b</sup>, Gasquet M<sup>c</sup>, Ouattara C.T<sup>a</sup>, Nebie I<sup>d</sup>, Traore A.S<sup>a</sup>, Esposito F<sup>d</sup>, Balansard G<sup>b</sup>, Timon-David P<sup>c</sup>, Fumoux F<sup>e</sup>. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *Journal of ethnopharmacology* (ACCEPTE)

**Sanon S<sup>a,d</sup>**, Azas N<sup>c</sup>, Gasquet M<sup>c</sup>, Ollivier E<sup>b</sup>, Mahiou V<sup>b</sup>, Barro N.<sup>a</sup>, Cuzin-Ouattara N<sup>d</sup>, Traore S.A<sup>a</sup>, Esposito F<sup>d</sup>, Balansard G<sup>b</sup>, Timon-David P<sup>c</sup>, Fumoux F<sup>e</sup>. Antiplasmodial activity of alkaloids from *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC), two plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *Parasitology Research* (ACCEPTE)

**Souleymane Sanon<sup>a</sup>**, Valérie Mahiou<sup>b</sup>, Nadine Azas<sup>c</sup>, Evelyne Ollivier<sup>b</sup>, Monique Gasquet<sup>c</sup>, Robert Faure<sup>d</sup>, Laurent Debrauer<sup>e</sup>, Alfred Traore<sup>a</sup>. New tetrahydro- $\beta$ -carboline from *Pavetta crassipes*. *Planta Medica* (SOU MIS)

Ilboudo-Sanogo E., Cuzin-Ouattara N., Diallo D.A., Cousens S.N., Esposito F., Habluetzel A., **Sanon S.**, Ouedraogo A.P. 2001. Insecticide-treated materials, mosquito adaptation and mas effect : entomological observations after five years of vector control in Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95 (4): 353-360

Moreno A., Cuzin-Ouattara N., Nebie I., **Sanon S.**, Brasseur P. 2001. Use of the DELI-microtest to determine the drug sensibility of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 95 (3): 309-312

## Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso

Sanon S<sup>a,d</sup>., Ollivier E<sup>b,c</sup>., Azas N<sup>c</sup>., Mahiou V<sup>b</sup>., Gasquet M<sup>c</sup>., Ouattara C.T<sup>a</sup>., Nebie I<sup>d</sup>., Traore A.S<sup>e</sup>., Lupoito F<sup>d</sup>., Balansard G<sup>b</sup>., Timon-David P<sup>c</sup>., Fumoux F<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Laboratory of pharmacology of clinical biochemistry of CRSBAN, UFR/SVT, University of Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>b</sup> Laboratory of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranee, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseilles, France

<sup>c</sup> Laboratory of parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranee, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseilles, France

<sup>d</sup> National Center of Research and of Formation on the Malaria, Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>e</sup> Laboratory of Immunogenetic and Pharmacology of Malaria, Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranee, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseilles, France

\*Corresponding author:

Université de la Méditerranée

Faculté de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacognosie

27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille cedex 5

Tél/Fax : 33 (0) 491 83 55 93

E. mail adress: Ollivier.Evelyne@pharmacie.univ-mrs.fr

### Abstract

In Burkina Faso, most people in particular in rural areas use traditional medicine and medicinal plants to treat usual diseases. In the course of new antimalarial compounds, an ethnobotanical survey has been conducted in different regions. Seven plants often cited by traditional practitioners and not chemically investigated have been selected for an antiplasmodial screening: *Pavetta crassipes* (K. Schum), *Acanthospermum hispidum* (DC), *Terminalia macroptera* (Guill. et Perr), *Cassia siamea* (Lam), *Ficus sycomorus* (L), *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hiern) and *Crossopteryx febrifuga* (AFZ. Ex G. Don Benth). Alkaloidic, chloroformic, methanolic, hydromethanolic and aqueous crude extracts have been prepared and tested on *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant W2 strain. A significant activity has been observed with alkaloidic extract of *P. crassipes* (CI50<4µg/ml), of *A. hispidum*, *C. febrifuga*, and *F. agrestis* (4<CI50<10µg/ml). The best result is obtained with aqueous extract of *T. macroptera* with a CI50=1µg/ml. These results confirm the traditional use of these plants.

**Keywords:** Burkina Faso, Folk medicine, Ethnobotany, medicinal plants, malaria, *Plasmodium falciparum*

### 1. Introduction

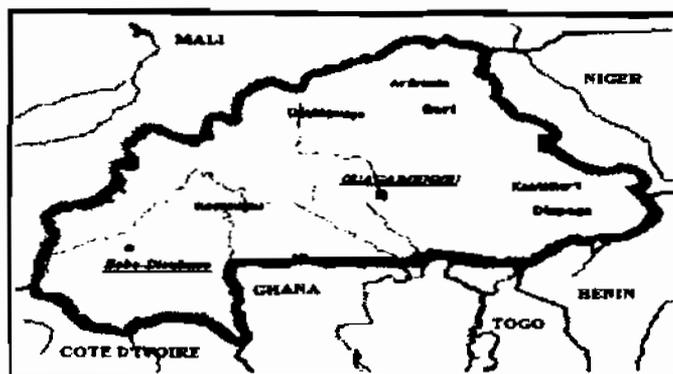
Malaria is the most important disease in the world with an estimated of 300-500 million clinical cases each year with a corresponding mortality of 2-3 million deaths per year (WHO, 1993, 1996). In Burkina Faso, malaria is the main cause of morbidity with more than 1,5 million clinical cases for children under 5 years. Malaria is also main cause of mortality corresponding to 20 % of deaths in medical centers (Issa S. et al., 1997). The declining efficacy of classical medication in relation to the rapid extension of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant strains has led to a need for new efficient antimalarial drugs. In Africa where malaria is endemic, access to chemical treatments is reduced in rural areas and cultural practices still remain important. Consequently 80% of population has recourse to traditional medicine for treating affections of early childhood and in particular to treat malaria (Geoffrey et al., 1996 ; Marsh et al., 1995 ; Phillipson et al., 1994) . It is a real necessity to research new efficient antimalarial compounds and accessible for most of people. In the present study , an ethnobotanical survey has been realized to evaluate the plants traditionally used in Burkina Faso against malaria. Their *in vitro* antimalarial activity has been determined.

### 2. Methodology

#### 2.1. Survey methodology

An ethnobotanical survey has been realized to identify plants used in traditional medicine against malaria. During this survey, traditional practitioners and herborists (who sell dried plant material and advise people) have been interviewed. The first information was obtained in november 1999 at

Ouagadougou (fig 1). A second list of plants has been established in west of Burkina Faso at Bobo Dioulasso (fig 1) and in 5 villages surroundings (Leguena, Dinderesso, Bare, Borodougou, Koundimi). The traditional practitioners treat malaria in function of symptomatology. During our survey, the following information was gattered:



- The diagnosis of disease, mainly determined by the traditional healer
- For each medicinal plant collected, its vernacular name, the part used, preparation, administration and posology were obtained.
- Twenty five traditional healers were interviewed (two women and twenty tree men (mean age : 50 years)) belonging to different ethnic groups. The traditional healers have been interviewed individually. They live in different villages and in different regions of Burkina Faso. They don't belong to the same ethnic group and don't always speak the same language or dialect. Each traditional healer must cite all the plants used in his pharmacopoea against fever, nausea and headache.

## 2.2. Plant material

The most used plants have been collected and identified by National School Water and Forest at Dinderesso (Bobo Dioulasso). For each plant a voucher herbarium specimen has been deposited in the laboratory of pharmacognosy of Marseilles (Table 1).

## 2.3. Plant crude extracts

Air dried plants were finely powdered and submitted to aqueous, hydromethanolic, methanolic and chloroformic extractions. Aqueous extractions were performed by boiling water during 30 min. Hydromethanolic 50%, methanolic and chloroformic extractions were performed by maceration at room temperature during 16 hours. After percolation, the solvents were evaporated in vacuo and the aqueous solution for hydromethanolic was freeze dried. Alkaloidic extracts were prepared by extraction with chloroform after alkalization by  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrated of the powdered drug. The chloroformic extracts were evaporated in vacuo. These dried extracts were used for the antimalarial assays.

## 2.4. Pharmacology tests

### 2.4.1 Parasites

The antimalarial activity of plant extracts was assessed against the chloroquine-resistant strain W2 of *Plasmodium falciparum* maintained in continuous culture according to the methodology described by Trager et al. (1976, 1987). Parasites were cultivated in group A+ human erythrocytes and suspended at a 4% hematocrit in RPMI medium supplemented with Hepes,  $\text{NaHCO}_3$ , 10% A+ human serum and Neomycin (Sigma, St Louis, Mo, USA) at 37°C in a gas mixture of 5%  $\text{O}_2$  - 6%  $\text{CO}_2$  - 90%  $\text{N}_2$ ; RPMI 1640, Hepes,  $\text{NaHCO}_3$  were obtained from Gibco-BRL (Paisley, Scotland).

### 2.4.2. extracts preparation

The crude extracts (alkaloidic, chloroformic, methanolic and hydromethanolic) were dissolved in DMSO to obtain a concentration of 2mg/ml. Dilutions were prepared from these solutions to obtain final concentrations of 4 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Aqueous extracts were dissolved in sterile water at the concentration of 4mg/ml. The final concentrations prepared by dilution were 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 2.4.3. Antimalarial assays

Assays were performed in triplicate in 96 well tissue culture plates (Nunc Brand products, Fisher, Paris, France) containing 200 $\mu\text{l}$  of W2 asynchronous parasite cultures at 2% of parasitemia and 2% hematocrit, and the extract dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma, St Louis, Mo, USA). Negative controls treated by solvent (DMSO) and positive controls were added to each set of experiments.

#### 2.4.4. Flow cytometric assessment of parasitemia

Parasitemia was evaluated after 48 hours by a flow cytometric method derived from the protocol published by Van der Heyde et al (1995). Parasite growth was assessed by a flow cytometric method in order to determine the number and viability of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* on the basis of the ability of the parasite to take up and metabolize hydroethidine (HE) into ethidium, a DNA-binding fluorochrome (Wyatt et al, 1991). After incubation with hydroethidine, parasitized and uninfected erythrocytes were all identified on the basis of fluorescence intensity and size. For HE staining, a stock solution of HE (10mg/ml) (Interchim, Montluçon, France) in DMSO was prepared and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The culture medium was removed from each well of parasite culture plates. Two hundred microliters of HE diluted at 1/200 in phosphate buffered saline (PBS; Sigma, St Louis, Mo, USA) was added to each well and incubated for 20 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in the dark. Parasites were then washed twice in PBS by centrifugation at 1200g for 5 min and were resuspended in a final volume of 1 ml of PBS in the tubes for fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Flow cytometry data acquisition and analysis were performed on a FACSort instrument (Becton-Dickinson, San Jose, CA). The detectors for forward and side scatter of the FACSort were set to E-01 and 250, respectively, and both detectors were set to the logarithmic scale. The FL2 detectors were also adjusted to bring events within the detection range of instrument (generally 459 for FL2). Both infected and uninfected erythrocytes were gated in the analysis and the percentage of parasitemia (number of infected erythrocytes/total erythrocytes  $\times$  100) was determined using the LYSIS II program (Becton-Dickinson). Ten thousand cells were used for data acquisition.

The antimalarial activity of extracts was expressed by the inhibitory concentrations 50% ( $\text{IC}_{50}$ ), representing the concentration of drug that induced a 50% parasitemia decrease compared to control culture.  $\text{IC}_{50}$  were calculated by non-linear regression analysis processed on dose-response curves by the table Curve software (Jandel Scientific, Paris, France). May Grünwald Giemsa-stained thin blood smears were also achieved for controlling microscopically results obtained by flow cytometry. The correspondence between the two methods was previously analyzed by the rank correlation test of Spearman (Azas et al., 2002).

### 3. Results and discussion

The aim of the survey was to identify the plants traditionally used against malaria and determine the most active extracts for each plant. The most cited plants by the traditional healers were *Pavetta crassipes* (K. Schum), *Acanthospermum hispidum* (DC), *Terminalia macroptera* (Guill. et Perr), *Cassia siamea* (Lam), *Ficus sycomorus* (L), *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hiern) and *Crossopteryx febrifuga* (AFZ. Ex G. Don) Benth (Table 1). The information collected during the ethnobotanical survey shown that traditional preparations were often decoctions. The plant material was used fresh or dried. The preparation lasted not more than 3 hours. The treatment consisted in drinking cold decoction (1-2 cups per day for children and 3-4 cups per day for adults). Body baths were also effected during oral treatments. The treatment lasted until recovery. In the case of no improvement after 3 to 7 days, another plant was used.

Recently, progress in chemical analysis presented evidence that complex molecules elaborated by natural organisms could hardly be synthesized by chemical process. Moreover resistance of *Plasmodium falciparum* to chemical treatment still remained important. So natural products isolated from plants used in traditional medicine which have *in vitro* potent antiplasmodial action, represented potential sources of new antimalarial drugs (Gasquet et al., 1993; Wright et al., 1990). In this work, the antimalarial activities of crude extracts against the chloroquine-resistant strain W2 were assessed by a flow cytometric method derived from the protocol published by Van der heyde et al.(1995). A major advantage to using HE staining was the possibility to follow parasite growth and assess viability (Wyatt et al., 1991). The potential of crude extracts as new antimalarial drugs already suggested by other data was strongly confirmed from our *in vitro* experiments with a reference chloroquine-resistant clone. The most interesting antiparasitic property was obtained with aqueous extract of *T macroptera* ( $\text{CI}_{50}=1\mu\text{g/ml}$ ) (table 3). The alkaloid rich extracts of *P Crassipes* with a  $\text{CI}_{50}$  lower than  $4\mu\text{g/ml}$  as well as those derived from *A hispidum*, *C febrifuga* and *F. agrestis* ( $4<\text{CI}_{50}<10\mu\text{g/ml}$ ) demonstrated also consistent antimalarial activity. However the results shown in table 3 confirmed antimalarial potential of all extracts and justified their use in traditional medicine by traditional healers or herborists : they encouraged to pursue investigations to extract and identify the active chemical compounds in particular alkaloids responsible for the antimalarial effects observed. For *T. macroptera*, active compounds are perhaps saponoids and must be isolated for identification and antiplasmodial evaluation. These new tools for the chemotherapy of malaria are badly needed, considering the deteriorating global malarial situation, the lack of commercially available vaccines, and the continuing spread of drug resistance.

### **Acknowledgements**

We thank the AUF agency, the french government (Foreign affairs ministry) and the University of the Mediterranee for the financial support of the research. We thank the teams of the different laboratories of Pharmacognosy, Parasitology, Immunogenetic and of the research centers (CRSBAN, CNRFP) for the contribution and help in the realization of this study. We thank also Mr. Alassane OUEDRAOGO, Inspector of National School of Water and Forest at Dinderesso in Burkina Faso for the botanical identification and collect of plants.

### **References**

- Asres K., Baleha F., 2000. Phytochemical screening and in vitro antimalarial activity of the stem bark of *Combretum molle* r. Br. Ex g. don. Ethiopian Pharmaceutical Journal, 16, 25-33
- Azas N., Laurencia N., Delmas F., Di Giorgio C., Gasquet M., Laget M., Timond-David P., 2002. Synergistic in vitro antimalarial activity of plants extracts used as traditional herbal remedies in Mali. Parasitology Research, 88 (2), 165-171
- Gasquet M., Delmas F., Timond-David P. et al. 1993. Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial drug 'Malaria 5'. Fitoterapia LXIV, 423-426
- Geoffrey C., Kirby. 1996. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90, 605 - 609.
- Marsh K., Forster D., Waruiru C. 1995 . Indicators of life-threatening malaria in african children. N. England Journal of Medicine, 332, 1399-1404
- OMS., 1993. Rapport technique, 529 :128
- OMS., 1996. World malaria situation in 1993, weekly Epidemiological Record, 3, 17-22 ; 4, 25-29 ; 5, 37-39 ; 6, 41-48.
- Phillipson J.D., 1994. Natural products as drug. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 88, 17-19
- Sanon I., Pare J., Traoré S., Modiano D., Kam K.K., Kaboré J., Lamizana L., Sawadogo S.A., Guigemdé T.R.1997. Formes cliniques du paludisme grave en milieu hospitalier pédiatrique a Ouagadougou. Cahiers « Santé », 7 (1), 13-17
- Trager W., Jensen J.P. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science, 193, 673-675
- Trager W., 1987. The cultivation of *Plasmodium falciparum*: application in basic and applied research on malaria. Annals of Tropical and Medical Parasitology, 81, 511 - 529.
- Van der Heyde H.C., Elloso M.M., Vande Waa J., Schell K., Weidanz W., 1995. Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects leucocytes on the malarial parasite. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 2 (4): 417-425
- Wright C.W., Phillipson J.D., 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. Phytotherapy Research, 4: 127-139
- Wyatt C., Goff W., Davis W., 1991. A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. Journal of Immunology Methodology, 140, 23-30

**Table 1 : most important plants in the treatment of malaria cited in the ethnobotanical survey and them antimalarial traditional preparations in Burkina Faso**

Plant name (Specimen/family)	Family	Specimen number	Freq. (Perc) of citation	Ethnic groups	Part used	Date of survey-collect	Material state /preparation	Administration method
<i>Acanthospermum hipidum</i> (DC)	<i>Asteraceae</i>	BM-ah00	12 (8,51%)	M, B, Da	Stem/leaves	12-12/2000	*F/D/D	Body bath, orally
<i>Cassia siamea</i> (Lam)	<i>Caesalpiniaceae</i>	BM-cs99	11 (7,80%)	M, B	Leaves	11-12/1999	*F/D/D	Body bath, orally
<i>Crossopteryx febrifuga</i> (AFZ. Ex G. Don) Benth	<i>Rubiaceae</i>	BM-cf00	12 (8,51%)	B, Da, Di, M	Leaves	12-12/2000	*F/D/D	Body bath, orally, steam baths
<i>Fadogia agrestis</i> (Schweinf. Ex Hiern)	<i>Rubiaceae</i>	BM-fa99	8 (5,67%)	Di, B	Leaves	11-12/1999	*F/D/D	Body bath, orally
<i>Ficus sycomorus</i> (L)	<i>Moraceae</i>	BM-fs00	5 (3,54%)	M, B	Leaves/bark stem	12-12/2000	*F/D/D	Body bath, orally, steam baths
<i>Pavetta crassipes</i> (K. Schum)	<i>Rubiaceae</i>	BM-pc00	14 (9,92%)	B, Da, Di, M	Leaves	12-12/2000	*F/D/D	Body bath, orally
<i>Terminalia macroptera</i> (Guill. et Perr)	<i>Combretaceae</i>	BM-tm99	7 (4,96%)	M, B	bark root	11-12/1999	*F/D/D	Body bath, orally

\*F/D/D: fresh/dried/decoction. M: mossi, B: bobo, Di: dioula, Da: dafin

Table 3 : IC<sub>50</sub> of seven plants crude extracts on *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant W2 strain

Plants	IC <sub>50</sub> (µg/ml) of Crude extracts				
	Crude alkaloids	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH(50%)	H <sub>2</sub> O
<i>P. crassipes</i>	<4	>10	>10	>10	> 500
<i>C. siamea</i>	4<CI50<10	>10	>10	>10	23,15
<i>T. macroptera</i>	>10	>10	>10	>10	1
<i>A. hispidum</i>	4<CI50<10	>10	>10	>10	64
<i>C. febrifuga</i>	4<CI50<10	>10	>10	>10	187
<i>Fadogia agrestis</i>	4<CI50<10	>10	>10	>10	182
<i>F. sycomorus</i> (leaves)	4<CI50<10	>10	>10	>10	430
<i>F. sycomorus</i> (stem bark)	>10	>10	>10	>10	63

Antiplasmodial activity of alkaloidic extracts from *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC), two plants used in traditional medicine in Burkina Faso

Sanon S<sup>a,d</sup>., Azas N<sup>c</sup>., Gasquet M<sup>c</sup>., Mahiou V<sup>b</sup>., Ollivier E<sup>b</sup>., Barro N<sup>c</sup>., Cuzin-Onattara N<sup>d</sup>., Traore S.A<sup>a</sup>., Exposito F<sup>d</sup>., Balansard G<sup>b</sup>., Timon-David P<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Laboratory of pharmacology of clinical biochemistry of CRSBAN, UFR/SVT, University of Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>b</sup> Laboratory of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranee, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseilles, France

<sup>c</sup> Laboratory of parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Mediterranee, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseilles, France

<sup>d</sup> National Center of Research and of Formation on the Malaria, Ouagadougou, Burkina Faso

\*Corresponding author:

Université de la Méditerranée

Faculté de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacognosie

27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille cedex 5

Tel/Fax : 33 (0) 491 83 55 93

Email address: Ollivier.Evelyne@pharmacie.univ-mrs.fr

**Abstract :**

In the course of the search of new antimalarial compounds, a study of plants traditionally used against malaria in Burkina Faso has been effected. An ethnobotanical study permitted to identify the plants currently used by the traditional healers and herborists. Two plants among them were selected: *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC). Alkaloidic extracts of these plants were tested *in vitro* against two reference clones of *Plasmodium falciparum*: the W2 chloroquine-resistant and the D6 chloroquine-sensitive strains. A significant inhibitory activity was observed with *P. crassipes* (IC<sub>50</sub>=1.23µg/ml) and *A. hispidum* (IC<sub>50</sub>=5.02µg/ml). Antiplasmodial activity was also evaluated against six *P. falciparum* isolates from children between 4 and 10 years old. The IC<sub>50</sub> values for alkaloidic extracts were in the range 25 - 670ng/ml. The results indicated that *P. falciparum* wild strains were more sensitive to alkaloidic extracts than strains maintained in continuous culture. Moreover, the alkaloidic extracts exhibit a good *in vitro* antimalarial activity and weak cytotoxic activities against three human cell lines (THP1, Normal Melanocytes, HTB-66). Isolation and structural determination is now necessary to determine precisely the active compounds.

**Keywords:** ethnomedicine, alkaloidic extracts, malaria, *Plasmodium falciparum*

**1. Introduction**

In spite of many efforts, malaria still remains the most important disease in the world responsible for more than 2 million deaths per year (OMS, 1996). The declining efficacy of classical medication in relation to the rapid extension of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant strains has led to a need for new efficient antimalarial drugs (Rascanavo et al. 1998, Omulokoli et al. 1997). In Burkina Faso chemioresistance was known since 1983 (Del Nero, 1983, Guigemde, 1994) and malaria is the main cause of morbidity with more than 1.5 million clinical cases for children under 5 years. Malaria is also the main cause of mortality corresponding to 20 % of deaths in medical centers (Issa, 1997). In Burkina Faso, one of the principal approaches to chemotherapeutic research against malaria consists of investigating the antiparasitic activity of plants traditionally used against fever and jaundice. In the present study we planed to evaluate the antiplasmodial activity of alkaloidic extracts of two plants *Pavetta crassipes* K. Schum (Rubiaceae) and *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae) selected by an ethnobotanical survey. Their *in vitro* antiplasmodial activity was assessed against references clones and wild isolates of *P. falciparum*

**2. Material and methods**

**2.1. Plant material**

Burkina Faso is a country with a great biodiversity and where traditional pharmacopoea based on plants used is very current. Two ethnobotanical surveys were realized in two parts of the country: the center part (Ouagadougou) and the West part (Bobo Dioulasso). The first one was effected in november 1999 at Ouagadougou and the second in december 2000 at Bobo Dioulasso and five villages surroundings (Leguema, Dinderasso, Bare, Borodougou, Koundimi). Plants were collected during the second survey. The traditional

healers cited about one hundred plants traditionally used against malaria. Among them, two plants : *P. crassipes* (leaves) and *A. hispidum* (stem leaves) were selected for biological evaluation.

The plants which have been collected in December 2000, were identified by National School Water and Forest at Dinderesso (Bobo Dioulasso). For each plant a voucher herbarium specimen has been deposited in the laboratory of Pharmacognosy of Marseille : *Pavetta crassipes* (K. Schum) Rubiaceae, voucher specimen BH-pc00 collected at Iéguéma; *Acanthospermum hispidum* (DC) Asteraceae, voucher specimen BH-ah00 collected at Dinderesso. The parts of plant used for biological evaluation are : leaves for *Pavetta crassipes* and stem leaves for *Acanthospermum hispidum*. The plant material was collected in the same place

## 2.2. Preparation of alkaloidic extracts

The procedure for preparation of alkaloidic extracts is classical. Dried drugs (500g) were finely powdered and then extracted by petroleum ether to eliminate waxes, lipids, terpenes and other lipophilic compounds. The drug is then dried and alkalized by  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% and then macerated 16 hours with  $\text{CHCl}_3$ . After percolation, the chloroformic extract is concentrated and then extracted by water acidified by sulfuric acid (pH 3). The aqueous layer is then alkalized by  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% until pH 8-9 and extracted by  $\text{CHCl}_3$ . The chloroformic layer is evaporated in vacuo to yield alkaloidic extracts. The alkaloidic extract of *Acanthospermum hispidum* is analysed by TLC (Silica gel 60F<sub>254</sub> /  $\text{CHCl}_3$ -MeOH(95:5)). The alkaloidic extract of *Pavetta Crassipes* is analysed by TLC (Silica gel 60F<sub>254</sub> /  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0.25)). Two plates are prepared per extract. The revelation is effected by spraying one plate by Dragendorff reagent and the second by iodoplatinate reagent

The analytical study for standardisation is in progress.

## 2.3. Pharmacology tests

### 2.3.1 Reference clone

Antimalarial activity was assessed against the W2 chloroquine-resistant strain and the D6 sensitive-strain maintained in culture continue according to the methodology described by Trager et al. (1976). Parasites were cultivated in group A+ human erythrocytes and suspended at a 4% hematocrit in RPMI 1640 medium supplemented with HEPES,  $\text{NaHCO}_3$ , 10% A+ human serum and Neomycin (Sigma, St Louis, MO, USA) at 37°C in a gas mixture of 5%  $\text{O}_2$ - 6% $\text{CO}_2$ -90% $\text{N}_2$ ; RPMI 1640, HEPES,  $\text{NaHCO}_3$  were obtained from Gibco-BRL (Paisley, Scotland).

### 2.3.2. Isolates

Twenty five fresh isolates were obtained in Wawougé (40 km north of Ouagadougou) from children. Their ages ranged from 4 to 10 years. Veinous blood was collected before treatment and placed in vacutainer ACD tubes (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) and the tubes were immediately transported to laboratory. Parasitized erythrocytes were washed three times in RPMI medium 1640 (Life technologies, Paisley United kingdom) to remove leukocytes and platelets. If parasitemia exceeded 1%, infected erythrocytes were diluted to 1% with uninfected erythrocytes and resuspended in culture medium to a hematocrit of 1.5%. The suspensions were supplemented with 10% human serum and buffered with 25 mM HEPES and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Thin blood smears were stained by Giemsa and were examined to determine the *P. falciparum* density. Samples with a mono-infection due to *P.falciparum* and a parasite count ranging from 0.5% to 9% were used to test drug sensitivity. Six isolates were selected for antimalarial assays

### 2.3.3. Antimalarial assays

The micro drug susceptibility test used in this study was adapted from the microtest method recommended by the World Health Organisation. The drug sensitivity of each isolate was tested on pre-coated wells with increasing concentrations of alkaloids extracts and chloroquine. Following culturing in pre-coated wells for 48h, the samples were processed to thin blood films. Results were calculated by counting the parasite concentration per well against the negative control wells. For every field isolate, three separate culturing lines were run for each extract.

The 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) i.e., the drug concentration resulting in a 50% parasitemia decrease compared to the control well was determined by non linear regression processed on dose-response curves by the Table Curve software (Jandel Scientific, Paris, France). Isolates were considered chloroquine-resistant if the  $\text{IC}_{50}$  was greater than 100nM.

### 2.3.4. Cytotoxic assays

Tissue culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Toxicity of extracts was evaluated on three human cell lines that represented various models for toxicity assays :

- > monocytes (THP1 cells) incubated in 1ml RPMI 1640 medium supplemented with 15% foetal calf serum (FCS) (Eurobio, Paris, France) and antibiotics (streptomycine-penicilline) (Azas et al. 2002). THP1 cells were employed in the toxicity assays because of their use in the culture of the amastigote forms of *Leishmania* in the laboratory.

- primary culture of normal melanocytes isolated from infant foreskin (MHN) and grown in a modified MCDB 153 medium supplemented with insulin, phorbol 12- myristate 13-acetate (TPA), hydrocortisone, Bovine pituitary extract (BPE) and FCS (Jean et al. 2001 ).
- malignant melanoma cells (HTB- 66) incubated in minimum essential medium (Eagle) supplemented with amino acids, sodium pyruvate, Earle's BSS and FCS (Di Paola et al. 1971)

Cell lines were incubated for a 72 h incubation period at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in duplicate cultures and were treated by various concentrations of each extract dissolved in DMSO (10<sup>5</sup> cells/ml). Cell growth was estimated by flow cytometric counting after staining with 5µl propidium iodide (1mg/ml). For each extract the cell growth (IC<sub>50</sub>) was compared to a control culture without drugs but maintained in the same conditions of culture. Cytotoxic:antiplasmodial ratios (CAR)(IC<sub>50</sub> mammalian cells lines / IC<sub>50</sub> against parasites) were determined for each extract (Munoz et al., 1999).

### 3. Results and discussion

The IC<sub>50</sub> values of plant extracts against references clones and isolates were listed in table 1. All isolates were successfully cultured and were chloroquine-sensitive (IC<sub>50</sub> < 100nM) . Alkaloidic extracts were more active against isolates (about 20-fold greater) than against reference clones. These results confirmed the susceptibility of testing drugs sensitivity against isolates in spite of references clones. Classification of results was based on classical studies performed with antiplasmodial extracts (Deharo et al. 2000) :

- IC<sub>50</sub> less than 5µg/ml, the extract was considered active
- From 5 to 10 µg/ml the extract was considered moderately active
- Over 10 µg/ml the extract was considered inactive.

Alkaloidic extracts of *P. crassipes* was shown to be active in vitro against all isolates with IC<sub>50</sub> values ranging from 25 to 208 ng/ml. In previous study, Gbeassor et al. (1989), reported that crude extracts of aerial parts of *P. crassipes* collected in Togo inhibited significantly in a dose-dependant manner the growth of *P. falciparum* isolates obtained from adolescent subjects. According to its effects, *P. crassipes* was classified in a group of plants exhibiting an IC<sub>50</sub> < 7.5µg. Our results confirmed the antiplasmodial activity of this plant. Moreover the purification of the crude extracts has permitted the isolation of the alkaloidic extracts containing more active constituents against *in vitro P falciparum* growth with weaker IC<sub>50</sub> values .

These results showed the great antiplasmodial potential of the alkaloidic extracts against *P. falciparum*. Similar results were obtained with alkaloidic extracts of *A. hispidum* (geometric mean IC<sub>50</sub> : 250 ng/ml). In Brazil, *A. australe* is a medicinal plant also used for treatment of fever and/or malaria. The crude extract (ethanolic extract) of *A. australe* leaves was partly active at the dose of 1000mg/kg-1day-1(4x) inhibiting parasite multiplication by 40% and showed promising antimalarial activity against a chloroquine- resistant strain of *P. falciparum* in culture (Carvalho et al. (1991). The results obtained here once again confirmed the antimalarial potential of this plant. Differences in isolates sensitivities were observed and may be due to the preliminary medicines administered before the assays with the extracts or to the physiological potential of the parasite to grow in a synthetic medium.

Alkaloidic extract of *P crassipes* was the most potent extract tested in this study. IC<sub>50</sub> values of alkaloidic extract of *P Crassipes* (geometric mean : 76 ng/ml) were three-fold lower than those of *A. hispidum* (geometric mean : 250ng/ml). Preliminary *in vitro* assessment showed that the activity was concentrated in the crude alkaloidic mixture extracted from the leaves. Identification of the active alkaloids was in progress. The relatively better antimalarial activity of alkaloidic extract of *P. crassipes* may be due to the alkaloids content or to the synergistic antimalarial effects of the different alkaloids contained in the extract.

Toxicity of both extracts was assessed against three human cell lines classically employed in the laboratory and selectivity indices were calculated (table 2). THP1 cells were employed in toxicity assays because of their use in the culture of amastigote forms of *leishmania* and the other cell lines represented two different models of transformed and non-transformed cells. Extracts exhibited weak toxicity and good cytotoxic: antiplasmodial ratios as defined by Phillipson ( Munoz et al. 1999). For these promising extracts tested only in preliminary experiments *in vitro*, we suggest that the *in vivo* antimalarial activity should be evaluated as well as the acute and chronic toxicity in the rat, prior to any chemical purification since a recent study have focused the use of *A hispidum* by Brazilian people in an attempt to produce abortion (Lemonica et al.(1994)). In these experiments, the treatment of pregnant rats, during the organogenic period, with aqueous extracts of *A hispidum* produced an increase in the number of external malformations, and this was related to dose.

Natural products isolated from plants used in traditional medicine which have *in vitro* potent antiplasmodial action represented potential sources of new antimalarial drugs (Gasquet et al. 1993; Wright et al. 1990). The results of this study indicate that "medicinal" plants should be studied systematically, confirm the antimalarial potential of the alkaloidic extracts of *P. crassipes* and *A. hispidum* and justify their use in traditional medicine by traditional healers or herborists. They encouraged to pursue investigations to identify the active alkaloids responsible for the antimalarial effects observed. These new tools for the treatment of malaria are badly needed considering the deteriorating global malarial situation and the continuing spread of drug resistance. For developing countries where the cost of imported drugs is almost prohibitive, local plants may well offer safe, effective and inexpensive alternative medicines.

### Acknowledgements

We thank the AUF agency, the french government (Foreign affairs ministry) and the University of the Mediterranean for the complete financial support of this work realized during three missions in France. We thank also the teams of the different laboratories of Pharmacognosy, Parasitology and of the research centers (CRSBAN, CNRFP) for their help in the realization of this study.

### References

- Azas N, Laurencin N, Delmas F, Di Giorgio C, Gasquet M, Laget M, Timon-David P (2002) Synergistic *in vitro* antimalarial activity of plant extracts used as traditional herbal remedies in Mali. *Parasitol Res* 88: 165-171
- Crampton JM, Galler R, Sinden RE, Crisanti A (1993) La plasmodie et les globules rouges. *La recherche* 24: 1220-1296
- Carvalho LH, Brandao MG, Santos-Filho D, Lopes JL, Krettli AU (1991) Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian J Med Biol Res* 24: 1113-1123
- Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munoz V, Ruiz G, Sauvain M (2001) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 77: 91-98.
- Del Nero L, Lamizana L, Pietra V, Rotigliano G (1993) A national survey of the prevalence of Chloroquine resistance *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *J Trop Med. Hyg* 96: 186-190
- Gasquet M, Delmas F, Timon-David P et al (1993) Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial drug 'Malarial 5'. *Fitoterapia* LXIV: 423-426
- Gbeassor M, Kassou Y, Ameglo K, De Souza C, Koumaglo K (1989) Antimalarial effects of eight African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 25: 115-118
- Guigemdé TR, Aouba A, Ouédraogo JB, Lamizana L (1994) Ten years surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *Am J Med Hyg* 50 : 699-704
- Jean S, Bideau C, Bellon L, Hallimi G, De Meo M, Orsiere T, Duménil G, Bergé-Lefranc JL, Botta A (2001) Expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA : study by cDNA arrays and real time quantitative-PCR. *Biochim Biophys Acta* 1522 : 89-96.
- Di Paola RS, Kucincaky WI, Onodera K, Ratajczak MZ, Hijiya N, Moore J, Gewirtz AM (1997) Evidence for a functional kit receptor in melanoma, breast and lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 4: 176-182.
- Lemonica IP, Alvarenga CM (1994) Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millsp. in pregnant rats. *J. Ethnopharmacol* 43: 39-44
- Munoz V, Sauvain M, Mollinedo P, Callapa J, Rojas I, Gimenez A, Valentin A, Mallie M (1999) Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)- Roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Med* 65: 448-449.
- Omukokoli E, Khan B, Chhabra SC (1997) Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 56: 133-137
- OMS (1996) World malaria situation in 1993, weekly *Epidemiological Record*, 3: 17-22 ; 4: 25-29 ; 5: 37-39 ; 6: 41-48.
- Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Ramanitrasimbola D, Rafatro H, Rakoto-Ratsimamanga A (1999) Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la Chloroquine. *J. Ethnopharmacol* 64 : 117-126.
- Sanon I, Pare J, Traoré S, Modiano D, Kam KK, Kaboré J, Lamizana L, Sawadogo SA, Guigemdé TR (1997) Formes cliniques du paludisme grave en milieu hospitalier pédiatrique a Ouagadougou. *Cahiers « Santé »* 7 : 13-17
- Trager W, Jensen J (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675
- Wright CW, Phillipson JD (1990.) Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 4: 127-139

Tableau : IC<sub>50</sub> (ng/ml) of alkaloidic extracts of *P. crassipes* (ALTPC), of *A. hispidum* (ALTAH) and of chloroquine (CQ) on isolates and references clones of *Plasmodium falciparum*.

	Isolate 1	Isolate 2	Isolate 3	Isolate 4	Isolate 5	Isolate 6	W2	D6
ALTPC	47	25	30	31	47	280	1230	1020
ALTAH	40	490	110	100	90	670	5020	4690
CQ	3,82	6,74	3,86	5,72	9,77	6,10	440	31
*CQ (nM)	9,16	16,16	9,26	13,71	23,43	14,63	*1055,55	74,09

- IC<sub>50</sub> of chloroquine expressed in nM to validate the sensitivity of *P. falciparum* (for IC<sub>50</sub>>100nM the strain is considered to be chloroquine-resistant)

Tableau II: IC<sub>50</sub> (µg/ml) of alkaloidic extracts of *P. crassipes* (ALTPC), of *A. hispidum* (ALTAH) against three human cell lines (THP1; MHN; HTB66) and range of cytotoxic :antiplasmodial ratios or CAR (IC<sub>50</sub> against mammalian cell lines / IC<sub>50</sub> against parasite)

Plants	THP 1	MH N	HTB6 6	Range of CAR for the three lines							
				Isolate 1	Isolate 2	Isolate 3	Isolate 4	Isolate 5	Isolate 6	W2 strain	D6 strain
ALTPC	46.1	62.7	79.9	980<CAR<1702	1842<CAR<4000	1535<CAR<2700	1486<CAR<2581	980<CAR<1702	164<CAR<286	37<CAR<65	45<CAR<79
ALTAH	60.2	79.8	100.8	1282<CAR<2144	2410<CAR<4033	547<CAR<916	602<CAR<1008	669<CAR<1120	90<CAR<151	10<CAR<21	13<CAR<22

## New tetrahydro- $\beta$ -carboline from *Pavetta crassipes*.

Souleymane Sanon<sup>a</sup>, Valérie Mahion<sup>b</sup>, Nadine Azas<sup>c</sup>, Evelyne Ollivier<sup>b</sup>, Monique Gasquet<sup>c</sup>, Robert Faure<sup>d</sup>, Laurent Debrauer<sup>e</sup>, Alfred S. Traore<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacologie de Biochimie clinique du CRSBAN, UFR/SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>b</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseille, France

<sup>c</sup> Laboratoire de parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 Bd Jean Moulin, 13385 cedex 5, Marseille, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Valorisation de la Chimie Fine, UMR 6009, Université d'Aix Marseille III, France

<sup>e</sup> Laboratoire des Xénobiotiques, INRA Centre de Recherche de Toulouse, Toulouse, France

### Abstract

Together with known compounds, a new tetrahydro- $\beta$ -carboline derivative, hydroxy-elaecarpidine, was isolated from the leaves of *Pavetta crassipes* K. SCHUM. Its structure was elucidated by spectrometric analysis, including 2D NMR data. Antiplasmodial activity was evaluated *in vitro* on *Plasmodium falciparum*.

### Introduction

During our ongoing research for new antimalarial substances, we have studied plants traditionally used in Burkina Faso against Malaria. An ethnobotanical survey was realised in two parts of the country : the center part, Ouagadougou and the west part, Bobo Dioulasso [1]. After screening tests, the alkaloidal extract of *Pavetta crassipes* was selected for its promising *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*. *Pavetta crassipes* K. SCHUM (Rubiaceae) is a species indigenous to the tropical Africa in particular in humid savana of Soudan. This plant is commonly known as "Mokbiisri" (Mooré vernacular name) and the decoction is used in folk medicine against malaria (pernicious access) [2, 3]. In a previous paper, we described antiplasmodial activity on chloroquine resistant and wild strains of the alkaloidal extract of *Pavetta crassipes* [4]. However, there have been few investigations concerning the constituents of this plant [2]. The present paper deals with the chemical and biological investigations of the leaves extracts of *Pavetta crassipes*. A new tetrahydro- $\beta$ -carboline derivative, hydroxy-elaecarpidine (1) was isolated, together with known compounds : acanthospermol [5], elaecarpidine [6] and rutine. The structural elucidations were performed by spectroscopic analysis, including 2D NMR data. Antiplasmodial effects of the isolated compounds were investigated.

The molecular formula of compound 1, C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O, was deduced from the HREIMS. The <sup>1</sup>H RMN spectral data of 1 were characteristic of a  $\beta$ -carboline indole alkaloid with a methine proton resonating as a broad doublet at  $\delta_H$  3.38 and very closely comparable to those of elaecarpidin [6, 7]. The main difference concerns the aromatic region indicating a substitution of the benzene ring ( $\delta_H$  6.76 d (2.1), 6.59 dd (8.6; 2.1), 7.10 d (8.6)). The value of the molecular ion on the mass spectrum and the fragment at m/z 199, suggest for compound 1 the presence of one hydroxy group compared with elaecarpidine. The <sup>13</sup>C RMN spectrum was in good agreement with our proposal, and showed the presence of 17 carbons. The lowfield shifted methine carbone at  $\delta_H$  85.1 (C-20) also accords with data for the  $\beta$ -carboline indole alkaloids. In the aromatic region, the signal at  $\delta_C$  151.2 can be attributed to the OH-bearing carbon, which can be located at C-10 regarding the chemical shifts of carbons in indolic nucleus :  $\delta_C$  129.0 (C-4), 129.0, (C-5), 111.6, (C-7), 112.3, (C-8) and 132.9 (C-9) [8]. Further analysis of COSY, HMQC and HMBC spectra led to the complete assignment of all remaining protons and the unambiguous structure of 1 (table 1). In fact, the aromatic proton resonating at  $\delta_H$  6.59 (H-11) was three-bond coupled with the signal of the quaternary carbon at  $\delta_C$  132.9 assigned to C-9, corroborating the location of the OH function at C-10. The low shift for H-3 ( $\delta_H$  3.38) and H-20 ( $\delta_H$  2.75) on <sup>1</sup>H RMN spectrum indicated  $\beta$  configurations at C-3 and C-20 [7]. The structure of 1 was thus established as the 6-OH derivative of elaecarpidine, a new compound.

A preliminary antimalarial screening on the chloroquine resistant strain W2 of the extracts of *Pavetta crassipes* showed the best activity with alkaloidal extract (CI50 > 4  $\mu$ g/ml) [1]. The antimalarial activity of the 4 compounds isolated was evaluated on two strains of *Plasmodium falciparum*, the chloroquino-sensitive strain 3D7 and the chloroquino-resistant strain W2 [9]. The best activity was observed for alkaloidal extract on the two strains of *Plasmodium falciparum*. Elaecarpidine and acanthospermol showed also a significant activity on W2 strain.

## Materials and Methods

UV spectrum was recorded on a Beckman DU 520 spectrophotometer and IR spectrum on a Nicolet 205XB FTIR spectrometer. All  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR and two-dimensional NMR spectra were recorded in  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  ppm) on Bruker AMX 400 spectrometer operating at 400.13 MHz ( $^1\text{H}$  NMR) and 100.62 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR). HREIMS spectra were run on a MALDI-TOF (Voyager-DE STR; perSeptive Biosystems) spectrometer. MS spectra was obtained on a Ion Trap Finigan (Thermo Quest) spectrometer. Melting point was taken on a Büchi Melting Point B-540. Optical rotation were taken on a Perkin Elmer 341 OROT 589 nm Polarimeter.

Leaves of *Pavetta crassipes* K. SCHUM [2] were collected in november 2000 by S. Sanon in Lèguéma and Dindéresso, two villages located at about ten Km from Bobo Dioulasso, in the West part of Burkina Faso. The plant was identified by National School of Water and Forest at Dinderesso (Bobo Dioulasso). Voucher herbarium specimen has been deposited in the Laboratory of Pharmacognosy of Marseille. Extraction of alkaloids : powdered leaves (900 g) were successively macerated 16h with 2.5 l petroleum ether (bp 40-65°) and 4.5 l  $\text{CHCl}_3$  after alkalisation with  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30 %). The chloroformic layer was extracted with acidic water (3 %  $\text{HCl}$ ). The aqueous layer was further alkalized with 30 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  and extracted with  $\text{CHCl}_3$ , affording after evaporation in vacuo a  $\text{CHCl}_3$  extract containing the total alkaloids (residue 0.562 g). Next, the leaves were macerated 16h with methanol/water (1:1, 2.5 l) affording the hydromethanolic extract (84.32 g). The alkaloidal extract was fractionated by chromatography on Kieselgel (0.040-0.063 mm) Merck, eluted by  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  8:2. The hydromethanolic extract was fractionated on Lichroprep RP-18 (25-40  $\mu\text{m}$ ) Merck, eluted with a gradient of  $\text{MeOH}/\text{water}$ . Silica gel GF254 was used for tlc.

Hydroxyelaeocarpidine (1) :  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$ , amorphous,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  0 (c 0.03,  $\text{MeOH}$ ), MP 220 °C (decomposition), UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{MeOH}$ ) nm (log  $\epsilon$ ): 274; IR  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$  3333, 2956, 2926, 2856, 1709, 1665, 1597, 1457, 1376, 1213, 1178, 1125, 1038; HREIMS  $m/z$  (%): 284.17635 (M+H) [284.17629 calcd], 199 (43), 177 (90), 137 (35), 84 (87).

**Bioassays** : Antimalarial activity was assessed against the chloroquino-sensitive strain 3D7 and the chloroquino-resistant strain W2, maintained in continuous culture according to the methodology described by Trager et al (1976) [9]. Parasites were cultivated in group A+ human erythrocytes and suspended at a 4 % hematocrit in RPMI 1640 medium supplemented with Hepes,  $\text{NaHCO}_3$ , 10 % A+ human serum and Neomycin (Sigma, St Louis, MO, USA) at 37°C in a gas mixture of 5 %  $\text{O}_2$ - 6 %  $\text{CO}_2$ -90 %  $\text{N}_2$ ; RPMI 1640, Hepes,  $\text{NaHCO}_3$  were obtained from Gibco-BRL (Paisley, Scotland). The extract and the compounds were dissolved in DMSO.

## Acknowledgements

We thank the AUF agency, the french government (Foreign affairs ministry) and the University of the Mediterranee for the complete financial support of this work. We thank the teams of the different laboratories of Pharmacognosy, Parasitology, Immunogenetic and of the research centers (CRSBAN, CNRFP) for the contribution and help in the realization of this study.

## References

- 1 Sanon S, Ollivier E, Azas N, Mahiou V, Gasquet M, Ouattara CT, Nebie I, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P, Fumoux F. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso, J of Ethnopharmacology (in press).
- 2 Kerharo J, Adam JG. La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. Vigot frères Edition, Paris 1974; p. 705-706.
- 3 Amos S, Okwuasaba FK, Gamaniel K, Akah P, Wambebe FA. Inhibitory effects of the aqueous extracts of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. Journal of ethnopharmacology 1998; 61: 209-213.
- 4 Sanon S, Azas N, Gasquet M, Mahiou V, Ollivier E, Barro N, Cuzin-Ouattara N, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P. Antiplasmodial activity of alkaloids from *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC), two plants used in traditional medicine in Burkina Faso, Parasitology Research (in press).
- 5 Ramachandran Nair AG, Sankara Subramanan S, Bohlmann F, Schöneweiss S, Mabry TJ. A new diterpene galactoside from *Acanthospermum hispidum*. Phytochemistry, 1976; 15: 1776-1778.
- 6 Takayama H, Katsura M, Seki N, Kitajima M, Aimi N, Sakai S-I. Elaeocarpidine, a naturally occurring racemate from *Tarenna vanprukii*. Planta Med 1992; 58: 289-290.

- <sup>7</sup> Balchin ML, Houghton PJ, Woldemariam TB. Eleocarpidine alkaloids from pelargonium species (Geranaiceae). *Nat Prod Lett* 1996; 8: 105-112.
- <sup>8</sup> Verpoorte R, Van Beek TA, Riegman RLM, Hylands PJ, Bisset NG. Aromatic chemical shifts in *o*-hydroxy- and -methoxy-substituted indole alkaloids; reference data and substituent-induced chemical shifts for ten different chromophoric groups. *Organic Magnetic Resonance* 1984; 22: 5: 328-335.
- <sup>9</sup> Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673-675.

Corresponding author : Dr. Valérie Mahiou . Laboratoire de Pharmacognosie . Faculté de Pharmacie . 27 Boulevard Jean Moulin . 13385 Marseille cedex 05 . France. E-Mail : [Valerie.Mahiou@pharmacie.univ-mrs.fr](mailto:Valerie.Mahiou@pharmacie.univ-mrs.fr) . Phone/Fax : 04 91 83 55 93

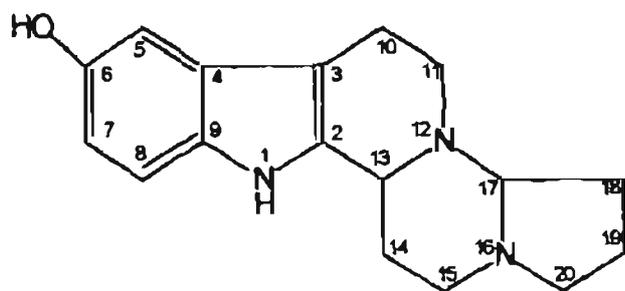
Table 1 : <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, COSY and HMBC data for compound 1 (CD<sub>3</sub>OD; 400.13 and 100.62 MHz).

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (J/Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	COSY	HMBC
2	-	136.2	-	-
3	3.38 brd (11.1)	61.4	H-14	-
5	3.22 m 2.49 td (11.1; 3.5)	48.7	H-5 (2.49), H-6 (2.63) H-5 (3.22), H-6	C-3, C-6, C-7 C-3, C-6, C-7
6	2.87 m 2.63 d (15.0)	22.6	H-5 (2.49), H-6 (2.63) H-5, H-6 (2.87)	C-2, C-5, C-7 C-2, C-5, C-7
7	-	107.3	-	-
8	-	129.0	-	-
9	6.76 d (2.1)	103.1	H-3	C-7, C-10, C-11, C-13
10	-	131.2	-	-
11	6.59 dd (8.6; 2.1)	111.6	H-9, H-12	C-9, C-10, C-13
12	7.10 d (8.6)	112.3	H-9, H-11	C-8, C-10, C-11, C-13
13	-	132.9	-	-
14	2.22 d (12.9) 1.85 m	29.5	H-3, H-14 (1.85), H-15 H-3, H-14 (2.22), H-15	C-3, C-15 -
15	3.22 m 2.40 t (11.1)	51.4	H-14, H-15 (2.40) H-14, H-15 (3.22)	C-14, C-17, C-20 -
17	3.08 t (7.9) 2.33 q (8.5)	52.9	H-17 (2.33), H-18 (1.85) H-17 (3.08), H-18 (1.76)	C-19, C-20 C-15, C-18
18	1.85 m 1.76 m	20.6	H-17 (3.08), H-19 (2.10) H-19 (2.10)	C-19 C-20
19	2.10 m 1.76 m	30.0	H-18 (1.85), H-19 (1.76), H-20 H-19 (2.10), H-20	- -
20	2.75 t (6.5)	85.1	H-18 (1.76), H-19	C-3, C-15, C-19

Table 2 : *in vitro* antimalarial activity on the chloroquino-sensitive strain 3D7 and the chloroquino-resistant strain W2 of *Plasmodium falciparum*.

	CI50, 3D7 (µg/ml)	CI50, W2 (µg/ml)
Alkaloidal extract	3.45	1.23
Eleocarpidine (PC1)	10.95	4.70
OH-eleocarpidine (PC2)	-	10.85
Acanthospermol (TmP)	-	4.78
Rutin (TJP1)	-	7.24

- no determined



Hydroxyélaeocarpidine