

République du Mali  
Un Peuple-Un But-Une Foi

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

ANNEE : 2002-2003

Thèse N°.....

---

**Etude phytochimique d'une plante  
antipaludique utilisée au Mali : spilanthes  
oleracea Jacq. (Asteraceae)**

---

Thèse présentée et soutenue publiquement le .....  
Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

Par **Monsieur Makan Négué Diarra**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

**JURY :**

**Président :**

Pr Moussa Harama

**Membres :**

Dr Elimane Mariko

Dr Benoit Yaranga Koumaré

**Directeur de thèse :**

Dr Drissa Diallo

# Introduction

## Introduction

Le paludisme constitue un problème majeur de santé publique avec plus de 36 % de la population mondiale, soit 2,3 milliards de personnes sont exposées à cette maladie. C'est en Afrique intertropicale que la situation est la plus préoccupante. Dans cette zone où vivent plus de 400 millions de personnes, 300 millions seraient infectés, et 120 millions seraient malades chaque année (Malvy et coll., 2000).

La mortalité due au paludisme est estimée entre 1,5 et 2,7 millions de décès chaque année dont environ un million d'enfants de moins de cinq ans et fait de cette maladie un fléau mondial; près de 90 % de ces décès proviennent en Afrique au sud du Sahara (OMS, 1998; OMS, 2000). La prise en charge de cette urgence médicale demeure un problème d'actualité, face à la progression de la résistance à la chloroquine. Les stratégies actuelles de contrôle de paludisme sont orientées vers la découverte de nouvelles molécules antipaludiques. En Afrique, les ressources naturelles sont estimées très importantes mais elles sont peu exploitées. On dénombre près de 50.000 espèces de plantes vascularisées sur les 250.000 espèces existantes dans le monde entier. La Médecine Traditionnelle est essentiellement basée sur une utilisation des ressources végétales (TRAORE, 1999). Les plantes ont toujours constitué une source de remède assez utilisée. Des raisons économiques et socio-culturelles font que plus de 80 % des populations africaines utilisent la médecine traditionnelle qui demeure un élément indispensable pour la prise en charge effective de la santé des populations.

Au Mali, l'Institut National de Recherche en Santé Publique ( INRSP ) à travers son Département de Médecine Traditionnelle ( DMT ) a mis une recette à base de trois plantes ( *Cassia occidentalis* L., *Lippia chevalieri* M. et *Spilanthes oleracea* J.) sous le nom de **Malarial 5**. Des études beaucoup plus approfondies ont été réalisées par le département pour améliorer l'efficacité de ce produit. Elles ont permis de montrer des effets bénéfiques du **Malarial 5** dans le traitement du paludisme et de prouver que l'activité antiparasitaire est essentiellement due au spilanthol extrait de *Spilanthes oleracea*. La connaissance des constituants chimiques des plantes facilite l'étude de leur activité biologique et un meilleur contrôle de qualité en vue d'une préparation pharmaceutique. C'est dans ce cadre que notre travail a porté sur une étude phytochimique de *Spilanthes oleracea*. C'est une plante annuelle de la famille des

*Asteraceae* qui peut atteindre 50 cm de haut. Les feuilles et les fleurs ont un goût piquant accompagné par un picotement et un engourdissement, ont été utilisées dans l'alimentation comme une épice, en médecine populaire pour lutter contre le bégaiement, le mal de dent, les affections bucco-dentaires, des gastrites et des maladies de gorges (Nakatani et Nagashima, 1992).

Le but de notre travail est l'amélioration de l'état de santé des populations par l'utilisation des médicaments à base de cette plante, en définissant une meilleure méthode de préparation de ce produit.

# MOTIVATION

Notre travail s'inscrit dans une perspective de valorisation et de développement de la recherche sur les plantes médicinales afin de pouvoir satisfaire au besoin de santé des populations; ceci reste une volonté des autorités sanitaires de notre pays suite à l'engagement de l'O M S à œuvrer dans ce domaine.

Il a été motivé par :

- ◆ la volonté de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales au Mali,
- ◆ la nécessité de développer et de faciliter l'accès aux médicaments traditionnels améliorés à moindre coût compte tenu du coût élevé des médicaments conventionnels
- ◆ l'intérêt que suscite l'étude des molécules naturelles à activité antipaludique,
- ◆ l'amélioration de la forme de présentation du malarial en passant de la forme tisane à la forme gelule,
- ◆ la nécessité de standardiser les extraits aqueux de *Spilanthes oleracea*.

# OBJECTIFS

## **Objectif général**

Améliorer l'état de santé des populations par l'utilisation des phytomédicaments à base de *Spilanthes oleracea* J.

## **Objectifs spécifiques**

- ♠ Identifier les différents groupes chimiques présents dans les capitules de *Spilanthes oleracea* J.
- ♠ Déterminer les teneurs en eau, en cendres, et en substances extractibles par l'eau des capitules de *Spilanthes oleracea* J.
- ♠ Déterminer la teneur en spilanthol des capitules de *Spilanthes oleracea* J.
- ♠ Déterminer la DL<sub>50</sub> des extraits aqueux des capitules de *Spilanthes oleracea* J.
- ♠ Déterminer la teneur en huiles essentielles de *Lippia chevalieri*.

# Chapitre I GÉNÉRALITÉS

# **1 Rappels sur le paludisme**

## **1-1 Définition**

Le paludisme ( palu: marais) ou malaria ( = mauvais air ) est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. La maladie est transmise par la piqûre d'un moustique: l'anophèle femelle appartenant au genre *Anopheles* ( Gentilini 1993 ).

Les quatre espèces plasmodiales parasites de l'homme sont: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*. En général, *Plasmodium falciparum* peut causer la mort.

## **1-2 Répartition géographique**

Le paludisme sévit actuellement dans la ceinture de pauvreté du globe. Il est surtout redoutable en zone tropicale où *Plasmodium falciparum* est l'agent du paludisme grave (Gentilini, 1993).

## **1-3 Cycle des plasmodies :**

*Plasmodium falciparum* évolue chez deux hôtes: l'homme et l'anophèle femelle. Le cycle comprend deux phases:

- une phase de sporogonie ou cycle sexué qui se déroule chez l'anophèle femelle;
- une phase de schizogonie ou multiplication asexuée chez l'homme ( Camus et coll., 1997 ).

### **1-3-1 Schizogonie ou multiplication asexuée chez l'homme** ( Gentilini, 1993, Traoré, 1999 ).

Au cours de la piqûre, un moustique infesté injecte dans un capillaire des sporozoïtes, formes infestantes contenues dans les glandes salivaires.

Les sporozoïtes ne restent dans la circulation sanguine qu'une demi - heure, ils gagnent le foie et pénètrent dans les hépatocytes. Le développement et la multiplication des sporozoïtes repoussent en périphérie le noyau de la cellule.

Le parasite forme une masse multinucléée, appelée schizonte ou corps bleu. L'éclatement du corps bleu libère de nombreux mérozoïtes qui passent dans la circulation sanguine. Cette période correspond à la phase d'incubation du paludisme. La durée de cycle dit exo-érythrocytaire est de sept à quinze jours.

Les mérozoïtes pénètrent dans les hématies et se transforment en trophozoïtes. Ces mérozoïtes présentent une affinité pour tous les globules rouges, quelque soit leur stade. Le trophozoïte se développe, grossit, son noyau se divise, il en résulte un schizonte. Il se charge progressivement d'un pigment spécifique issu de la dégradation de l'hémoglobine: ou pigment malarique.

Dans les schizontes mures ou corps en rosace, s'individualisent les mérozoïtes qui seront libérés lors de l'éclatement de l'hématie. Cet éclatement provoque l'accès thermique clinique. L'hémoglobine libérée est phagocytée par les polynucléaires ou les mononucléaires qui deviennent mélanifères. Ils deversent cette charge pigmentaire dans les tissus, au niveau des cellules du système monocyte-macrophage. Chaque cycle érythrocytaire dure 48 heures ( fièvre tierce maligne ). Après plusieurs cycles schizogoniques, apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexué, les gamétocytes mâles et femelles.

1-3-2 **Sporogonie ou cycle sexué chez l'anophèle femelle** ( Gentilini, 1993; Traoré, 1999).

En prenant son repas sanguin sur le sujet parasité, l'anophèle femelle absorbe toutes les formes parasitaires présentes dans le sang. Seuls les gamétocytes assurent la poursuite du cycle .

Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes mâles se transforment en gamètes mâles par exflagellation et les gamétocytes femelles en gamètes femelles par expulsion de corpuscules chromatiniens.

La fécondation de gamètes femelles donne un œuf mobile, l'ookinète qui traverse la paroi de l'estomac et se fixe au niveau de la face externe formant l'oocyste, dans lequel s'individualisent les sporozoïtes qui sont les formes mobiles du parasite ( sporogonie ). L'oocyste éclate et les sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle. De ce réservoir, ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante.

La durée de ce cycle est de douze jours en Afrique tropicale, mais elle peut varier en fonction de la température. Le cycle s'arrête lorsque la température moyenne est inférieure à 18°C.

#### 1-4 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques du paludisme, diverses dans leur expression et leur gravité, dépendent à la fois du parasite ( espèce plasmodiale et densité parasitaire ) et de son hôte ( réceptivité génétique et état immunitaire) (Danis, 1991; Gentilini, 1993).

1-4-1 Accès palustres simples : Les accès palustres simples comprennent la primo-invasion et les accès intermittents.

##### 1-4-1-1 Le paludisme de primo-invasion

Par définition, il apparaît chez un sujet neuf, non immun; c'est à dire chez l'enfant de 4 mois à 4 ans vivant dans une zone endémique, mais aussi à tout âge, y compris chez l'adulte.

La phase d'incubation dure au moins 7 jours et elle est cliniquement muette. La phase d'invasion est caractérisée par l'apparition d'une fièvre continue. Le tableau clinique est celui d'un embarras gastrique fébrile associé à des céphalées et des myalgies.

On peut en outre observer des nausées ou des vomissements et parfois une diarrhée. Le paludisme de primo-invasion peut évoluer vers l'accès pernicieux.

##### 1-4-1-2 Accès intermittent ou accès palustre à fièvre périodique

Il est caractérisé par des accès thermiques à des rythmes plus ou moins réguliers et des signes d'accompagnement. Cet accès dure une dizaine d'heures durant lesquelles se succèdent trois stades: stade de frissons, stade de chaleurs et stade de sueurs. Il débute brutalement en fin de journée ou la nuit. Cet accès palustre est accompagné par une splénomégalie et une anémie.

- **Stade de frissons:** Agité de violents frissons, le malade se plaint d'une sensation de froid intense, quelque soit la température extérieure. La fièvre s'élève à 39°C, la rate s'hypertrophie et la pression artérielle baisse. Ce stade dure une heure.
- **Stade de chaleurs:** Les frissons cessent, la peau devient sèche et brûlante; la température atteint 40 - 41°C. La rate, toujours palpable diminue de volume. Ce stade peut durer 3 à 4 heures.
- **Stade de sueurs :** Les sueurs abondantes baignent le malade, la température s'effondre brusquement avec une phase d'hypothermie. La pression artérielle remonte; ce stade dure 2 à 4 heures. Il est parfois suivi d'une singulière sensation d'euphorie ou de bien être.

### 1-4-2 Complications

1-4-2-1 Accès pernicieux: Encore appelé neuropaludisme, est caractérisé par une encéphalite aiguë. Il survient au cours d'un paludisme à *Plasmodium falciparum*, préférentiellement chez les enfants de moins de cinq ans en zone d'endémie. C'est un syndrome à début brutal ou progressif qui dans sa phase d'état se manifeste par une forte fièvre, des troubles neurologiques (troubles de la conscience, convulsions, troubles du tonus, troubles psychiques), des manifestations viscérales (hypoglycémie, ictère, anémie, œdème pulmonaire, insuffisance rénale fonctionnelle ...).

Non traité, cet accès pernicieux est fatal en deux ou trois jours. Correctement traité, la guérison peut se faire sans séquelle (Gachot et coll. 1998).

#### 1-4-2-2 Le paludisme viscérale évolutif : PEV.

Il survient en zone d'endémie chez les sujets soumis à des infestations palustres massives et répétées et ne se soumettant pas à une prophylaxie ou à un traitement efficace.

La symptomatologie du PEV est subaiguë ou chronique : elle associe une anémie avec pâleur, asthénie, anorexie, parfois une dyspnée, des œdèmes de membres inférieurs, des souffles systoliques anorganiques. La splénomégalie constante chez l'enfant est volumineuse et sensible.

Ce tableau d'évolution prolongé entraîne chez l'enfant un retard staturo pondéral parfois considérable. Chez l'adulte, l'anorexie est très marquée avec nausée, diarrhée, détermine un amaigrissement rapide (Danis, 1991).

#### 1-4-2-3 La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

Il s'agit d'un syndrome lié au paludisme à *Plasmodium falciparum* plus que d'une forme clinique de l'affection. Il survient chez des européens expatriés depuis plusieurs mois ou années en zone tropicale, ayant des antécédents d'accès à *Plasmodium falciparum*, et prenant irrégulièrement une prophylaxie et / ou des traitements par la quinine.

Le début est brutal avec lombalgies, pâleur, fièvre. Rapidement apparaissent un ictère, une chute tensionnelle, une oligurie avec urines rouges ou noires témoignant de l'hémolyse intravasculaire massive et confirmée par l'anémie, l'insuffisance rénale et l'hémoglobinurie. En revanche, la parasitémie est nulle ou modérée, ce qui distingue ce syndrome d'un accès pernicieux (Danis, 1991).

### 1-5 Diagnostic biologique (Malvy, 2000).

La mise en évidence du parasite se fait habituellement par l'examen microscopique d'un frottis mince ou d'une goutte épaisse colorés au Giemsa ou au Field. Dans cette dernière, les éléments du sang sont concentrés sur une surface beaucoup plus petite que dans le frottis, ce qui accélère la recherche. On peut estimer que l'examen de 100 champs microscopiques (grossissement 10 fois 100) correspond à un volume de 0,25 µl.

## **2 Rappels sur les antipaludiques**

### **2-1 Définition**

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale ou par voie parentérale, ou encore voie rectale, à dose unique ou à doses répétées permet de détruire le parasite ou bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir la maladie palustre ( Gentilini, 1993 ).

### **2-2 Classification**

Plusieurs critères sont utilisés pour classer les antipaludiques.

- Selon l'origine naturelle ou de synthèse du produit: Seule la quinine et les dérivés du qinghaosu sont extraits de plantes, tous les autres, en premier lieu les amino-4 -quinoléines sont des produits de synthèse.
- Selon le point d'impact du médicament sur l'un des stades du parasite.

Nous retiendrons la classification selon le point d'impact du médicament sur l'un des stades du parasite et leur origine ( Danis, 1991 ).

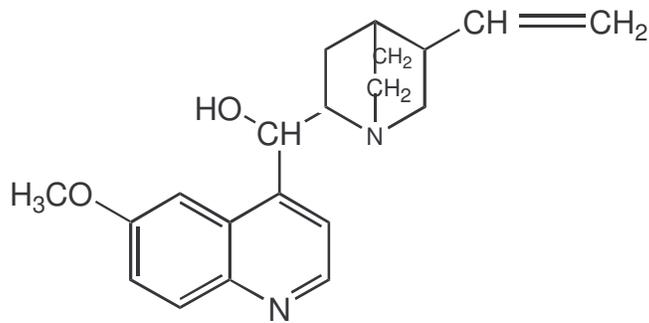
**Tableau N°I : Principaux antipaludiques**

<b>SCHIZONTICIDES</b>	<b>Antipaludiques naturels</b> <b>Alcaloïdes du quinquina</b> Quinine, Quinidine, Chinchonine, Chinchonidine. <b>Dérivés du qinghaosu (Armoise)</b> Artémisinine et ses dérivés: Artéméther, Artéether, Artésunate.
	<b>Antipaludiques de synthèse</b> <b>Amino-4-quinoléines</b> Chloroquine, Amodiaquine, Amopyroquine <b>Aryl-Amino-Alcools</b> Méfloquine, Halofantrine <b>Antifoliques, antifoliniques</b> Sulfamides, Sulfones, Pyriméthamine, Proguanil <b>Antibiotiques et divers</b> Cyclines, Macrolides, Fluoroquinolones, Hydroxynaphtoquinones
<b>GAMETO-CYTOCIDES</b>	<b>Antipaludiques de synthèse</b> Amino-8-quinoléines Primaquine

2-2-1 **Les antipaludiques naturels**

2-2-1-1 **La quinine**

**Structure chimique**



Quinine

**Pharmacocinétique et mode d'administration**

Par voie orale, la quinine est rapidement et presque ( 95 % ) complètement absorbée. Les concentrations plasmatiques maximales sont obtenues 1 à 3 heures après l'administration d'une dose unique. Elle pénètre bien dans les hématies mais s'y concentre peu. Pendant que 80 % de la dose absorbée de quinine sont métabolisées par le foie et éliminées par la bile dans les fecès, 20 % sont éliminées dans les urines sous forme inchangée.

## **Présentation**

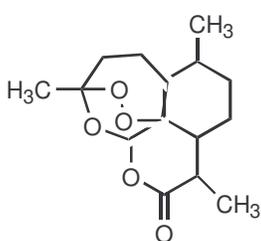
La quinine est une base bivalente faible, elle donne des sels basiques qui sont en fait des sels neutres et des sels qui sont des acides.

Les sels utilisés sont le chlorhydrate basique et le formiate basique. Le dichlorhydrate de quinine se présente en ampoules injectables par voie intraveineuse de 10 ml dosées à 0,10 g ou 0,30 g contenant 82 % de quinine base. Le formiate basique (quinoforme) est commercialisé en ampoules injectables de 2 ml ( 0,50 g ) dont 88 % de quinine base.

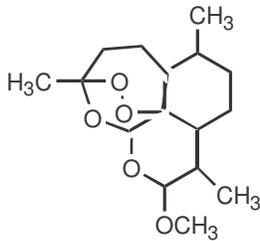
Il existe également un sel de quinine commercialisé sous le nom de quinimax<sup>R</sup>. Présenté en ampoules de 0,10 g ( 1ml ); 0,20 g ( 2ml ); 0,40 g ( 4 ml ); en comprimés dosés à 0,10 g et en suppositoires dosées à 0,15g ( enfants ) ou 0,25 g ( adulte ). Le quinimax contient 60 % de quinine.

## 2-2-1-2 Le qinghaosu artémisinine

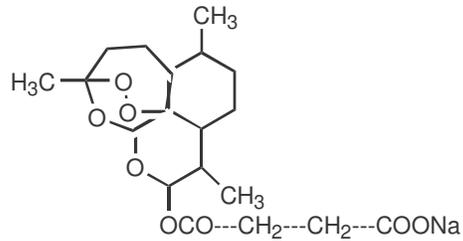
### Structure chimique



Artémisinine



Artéméthèr



Artésunate

### Propriétés pharmacologiques

Cette nouvelle famille d'antipaludéens est en fait une redécouverte des propriétés d'un arbuste chinois, le qinghaosu (*Artemisia annua* L. ), connues depuis vingt siècles (Imbert, 2000 ).

L'artémisinine, à l'état pur, est couramment utilisée comme médicament antipaludique en Chine sous forme de comprimés oraux ou des suppositoires. Deux dérivés sont à présent commercialisés et largement utilisés pour le traitement du paludisme: l'artésunate et l'artéméthèr. L'artéméthèr liposoluble est administré en injection intra-musculaire; l'artésunate, hydrosoluble, peut être injecté en intra-veineuse. La demi-vie d'élimination est courte ( 4 heures environ ) entraîne, en absence de relais thérapeutique, des rechutes à court terme. La tolérance clinique est relativement bonne ( Danis, 1991 ).

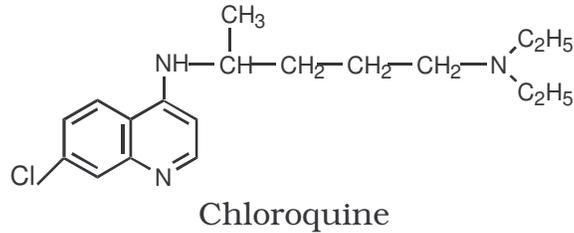
### 2-2-2 Les antipaludiques de synthèse

#### 2-2-2-1 Les dérivés de l' amino - 4 quinoléine :

Ce sont les molécules de synthèse les plus largement distribuées et la chloroquine représente assurément l'un des produits ayant été le plus utilisé au monde au cours de ces cinquante dernières années. La large diffusion de la résistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est hélas , devenue un facteur limitant leur emploi .

• La chloroquine

Structure chimique



Pharmacocinétiques et mode d'action :

Après administration par voie orale, l'absorption est rapide et quasi complète ( 80 % ). Elle apparaît dans le sang après une demi- heure et atteint son pic entre la 3<sup>ième</sup> et la 4<sup>ième</sup> heure un peu plus tardivement chez un sujet paludéen grave.

La chloroquine se fixe aux protéines plasmatiques dans la proportion de 50 %, à des protéines tissulaires de nombreux tissus: foie, rate, myocarde. La pénétration dans les hématies normales est très rapide aboutissant à une concentration de 3 à 6 fois celle du plasmas.

La chloroquine est un antipaludique schizonticide qui, comme la quinine, pénètre facilement dans les hématies parasitées, ce qui permet d'obtenir dans le minimum de temps, l'apyrexie et la baisse de la parasitémie. La chloroquine est éliminée lentement: une partie est éliminée dans les selles ( 10 % ), la majorité dans les urines dont 60 % sont intactes et 30 % sous forme métabolisée. Le principal métabolite est la monodéséthylchloroquine qui est active également sur les hématozoaires.

L'avantage de la chloroquine sur les autres antipaludiques est son efficacité en prophylaxie individuelle et collective et en traitement curatif. Elle est tolérée aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, et peut être administrée à la femme enceinte sans risque d'effets tératogènes.

## **Présentation**

Le sulfate de chloroquine ( Nivaquine<sup>R</sup> ) présenté sous forme de comprimés blancs dosés à 0,10 g ou 0,30 g ( Nivaquine forte<sup>R</sup> ), d'ampoules injectables dosées à 0,10 g, de sirop à 5 mg /ml.

Il existe d'autres formes commercialisées sous le nom de Résorchine, l'Aralen<sup>R</sup> et l'Avloclor<sup>R</sup> en comprimés dosés à 150 mg de base ( Danis, 1991 ).

### • **Amodiaquine**

L'amodiaquine est disponible en comprimés dosés à 150 mg de base ( flavoquine<sup>R</sup> ) ou 200 mg ( camoquine<sup>R</sup> ) et en poudre aromatisée dosée à 50 mg pour 5 ml ( flavoquine poudre ) ou suspension buvable dosée également à 50 mg pour 50 ml ( camoquine suspension ).

L'amodiaquine était utilisée pendant longtemps en traitement curatif et préventif. Depuis 1986, elle a été reconnue responsable d'effets secondaires redoutables, notamment d'agranulocytoses ainsi que d'hépatites mortelles chez les sujets sous prophylaxie. C'est la raison pour laquelle elle n'est plus utilisée qu'en traitement curatif.

2-2-2-2 **Les Aryls amino- alcools** ( Danis, 1991 ).

### • **La méfloquine** ( LARIAM<sup>R</sup> )

L'absorption orale, les taux sanguins efficaces apparaissent 4 à 8 heures plus tard. La demi- vie est longue ( 15 à 33 jours ). Elle reste contre indiquée chez la femme enceinte et les enfants de moins de 15 kg.

La méfloquine est disponible en comprimés dosés à 50 et 200 mg. Elle est utilisée aussi bien en prophylaxie qu'en traitement curatif.

### • **L'halofantrine** (HALFAN<sup>R</sup>)

Son absorption est rapide mais variable et la demi- vie est courte. Elle est contre indiquée chez la femme enceinte. Elle se présente en comprimés dosés à 250 mg et en sirop buvable de 30 ml à 2 %.

### 2-2-2-3 Antifoliques - Antifoliniques

Ce groupe d'antipaludiques connus depuis 1950, agit en bloquant la synthèse des acides nucléiques de l'hématozoaire. Il comprend des antifoliques ( sulfamides et sulfones ) et des antifoliniques ( biguanides et diaminopyrimidines).

#### ● Antifoliques

##### ▲ Sulfamides

Ils sont surtout représentés par la sulfadoxine. Ce sont des médicaments ayant une bonne absorption, une demi- vie d'élimination plasmatique de 7 à 8 jours. Leur activité schizonticide est bonne quoi qu'un peu lente. La tolérance des sulfamides est en général bonne, mais ils sont contre indiqués chez la femme enceinte au cours des 2 derniers mois, et surtout le nouveau né encore plus chez le prématuré

##### ▲ Sulfones

La seule sulfone utilisée est la DAPSONE ( Disulone<sup>R</sup> ) dont l'absorption est bonne et la demi- vie d'élimination de l'ordre de 28 jours. L'activité schizonticide est comparable à celle des sulfamides peut être plus lente encore. A forte dose, elle peut entraîner une méthémoglobinémie.

Actuellement, sulfamides et sulfones sont toujours utilisés en association avec un autre antimalarique en particulier avec un antifolinique.

#### ● Antifoliniques (ou inhibiteurs de la DIHYDROFOLATE REDUCTASE )

Deux médicaments sont utilisés: un biguanide ( proguanil ) et une diaminopyrimidine (pyriméthamine). Ils sont le plus souvent en association avec les antifoliques, leurs modes d'action respectifs étant synergiques.

##### ▲ Biguanides

Le proguanil a été obtenu en 1944 par CURD DAVEY. Il est utilisé en prophylaxie dès les années 1950. Ce sont des produits rapidement absorbés par la voie orale. Le pic sanguin du proguanil est de 4 à 5 heures après l'administration d'une dose unique et sa demi - vie d'élimination est d'environ 20 heures. Il est métabolisé dans le foie, très rapidement en cycloguanil dont la structure chimique est très proche de celle de la pyriméthamine, et qui en fait le composé ayant une activité antimalarique.

Le proguanil est commercialisé sous le nom de PALUDRINE<sup>R</sup> et de proguanil DCI. Il se présente sous forme de comprimés dosés à 100 mg.

### ▲ Pyriméthamine

La pyriméthamine est la plus efficace des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase utilisable. La pyriméthamine est absorbée lentement et presque totalement, elle s'accumule dans le foie. Le taux plasmatique efficace sur les souches sensibles est de 100µg / ml. L'élimination très prolongée se fait par voie urinaire et fécale sous forme métabolisée. La pyriméthamine passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire.

Les dérivés de la pyriméthamine les plus intéressants sont la Métoprime et Triméthoprime qui sont disponibles sous forme de comprimés dosés à 50 mg ( MALOCIDE<sup>R</sup> ) ou à 25 mg ( DARAPRIME<sup>R</sup> )

### 2-2-2-4 Antibiotiques

Plusieurs antibiotiques ont une activité antiplasmodique sur les modèles expérimentaux, animaux ou sur cultures *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Parmi les nombreux produits testés d'antibiotiques, 3 classes d'antibiotiques ont été essayées chez l'homme: les cyclines, les macrolides et les nouvelles fluoroquinolones.

#### • Cyclines

Les cyclines sont des schizonticides sanguins dont l'activité ne se manifeste qu'à partir du deuxième jour de traitement. Elles sont actives sur les souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux quinoléines. La tétracycline est utilisée en traitement curatif et la doxycycline ( vibramycine<sup>R</sup> ) en prophylaxie.

#### • Macrolides

Les macrolides ont été utilisés en association avec d'autres antimalariques (érythromycine, spiramycine ) ou isolément ( clindamycine ) en cas de chimio - résistance de *Plasmodium falciparum*. Leur activité est modeste avec les produits disponibles.

#### • Fluoroquinolones

Les nouvelles fluoroquinolones pourraient se révéler être des antipaludiques intéressants. La ciprofloxacine ( Ciflox<sup>R</sup> ), l'ofloxacine ( Oflocet<sup>R</sup> ), la norfloxacine ( Noroxine<sup>R</sup> ) et l'énoxacine sont à retenir compte tenu de leur caractéristique pharmacologique et de leur activité *in vitro*.

### 2-2-2-5 Associations

- **L'association Sulfadoxine-Pyriméthamine**

Cette association synergique agissant à deux niveaux sur la chaîne de synthèse des acides nucléiques du parasite, est présentée en comprimés dosés à 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine, ou en ampoules injectables par voie IM ( 400 mg de sulfadoxine + 20 mg de pyriméthamine) ( FANSIDAR<sup>R</sup> ). La pharmacocinétique des deux produits est assez homogène, la synergie d'activité prouvée entraîne en une prise unique une disparition de la fièvre et de la parasitémie en 2 à 3 jours sur les souches sensibles de *Plasmodium falciparum*. Malheureusement une résistance élevée à la pyriméthamine entraîne souvent un échec du traitement. Le problème de la tolérance déjà évoqué pour chacun des deux composants de l'association limite son utilisation, du moins en prophylaxie où le FANSIDAR<sup>R</sup> est contre indiqué (Danis, 1991).

- **L'association Sulfadoxine - Pyriméthamine - Méfloquine**

Cette triple association proposée dans les années 1950, sous le nom de Fansimef<sup>R</sup> associe dans un seul comprimé les composants du Fansidar<sup>R</sup> à 250 mg de Méfloquine. La synergie d'activité est peu probable.

### 2-3 **Traitement du paludisme au Mali**

Chaque cas du paludisme est un cas particulier. En zone d'endémie, les différents schémas thérapeutiques tiennent compte des facteurs cliniques et épidémiologiques de chaque pays (Traoré, 1999). Ainsi, au Mali le Programme National de Lutte contre le Paludisme ( PNLP ) recommande la stratégie suivante:

-L'antipaludique de première intension:

En cas de paludisme sans vomissement, la chloroquine est administrée par voie orale à raison de 25 mg / kg répartis en trois jours de 10 mg / kg le premier et le deuxième jour et 5 mg / kg le troisième jour. En plus du comprimé, il y'a le sirop diphosphate de chloroquine pour enfant dosé à 25 mg par cuillerée-mesure.

-L'antipaludique de deuxième intension: La sulfadoxine-Pyriméthamine sous le nom de Fansidar est utilisée à la dose de 1/ 2 comprimé pour 10 kg, soit 3 comprimés en seule prise chez un adulte.

-L'antipaludique de troisième intension: Les sels de quinine sont réservés en cas de paludisme grave et compliqué. La quinine, commercialisée sous le nom de quinimax<sup>R</sup> est la plus utilisée à la dose de 25 mg /kg et par jour pendant 5-7 jours. Elle doit être utilisée

par voie intraveineuse ou en perfusion d'une solution de serum glucosé hypertonique en cas d'hypoglycémie. La quinine base est utilisée à la dose de 8 mg /kg / 24 heures en prise espacée de 8 heures.

### 3 Molécules d'origines végétales à activités antiplasmodiques

Le premier antipaludique d'origine végétale est la quinine (alcaloïde) isolée de *Cinchona* (*Rubiaceae*) en 1820 par Pelletier et Caventou. La connaissance de la structure chimique de la quinine a permis le développement de molécules antipaludiques de synthèse.

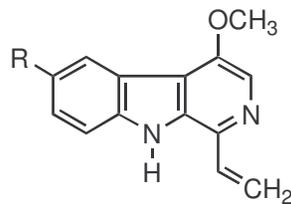
Les molécules antipaludiques d'origine végétale sont de trois types: les alcaloïdes, les terpènes et les quinones, les composés polyphénoliques et autres produits secondaires.

#### 3-1 ALCALOÏDES

##### 3-1-1 Les alcaloïdes indoliques

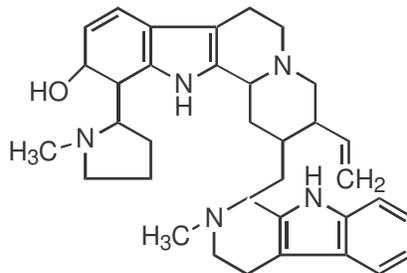
La 4-méthoxy-1-vinyl  $\beta$  carboline et la 6-hydroxy-4-méthoxy-1-vinyl  $\beta$  carboline ont montré une activité antiplasmodique *in vitro* sur certaines souches résistantes de *Plasmodium falciparum* (N'kunya,1992).

La strychnopentamine et la 3' 4'-dihydro usambarensine sont isolés chez *Strychnos usambarensis*. Elles ont une activité élevée sur *Plasmodium berghei* (Wright et al., 1991).



R = H la 4-méthoxy-1-vinyl- $\beta$ -carboline

R = OH la 6-hydroxy-4- méthoxy-1-vinyl- $\beta$ -carboline



Strychnopentamine

### 3-1-2 La fébrifugine - l'isofébrifugine

L'activité antiplasmodique de l'extrait de plante *Dichroea febrifuga* (*Saxifragaceae*) a été mise en évidence en 1947 par Spencer et *al.* La molécule active (la fébrifugine) a été isolée immédiatement en 1948. Cependant sa toxicité a limité son emploi et son développement (Bruneton, 1987).

### 3-1-3 Les bibenzylisoquinoléines

#### 3-1-3-1 La tétrandine:

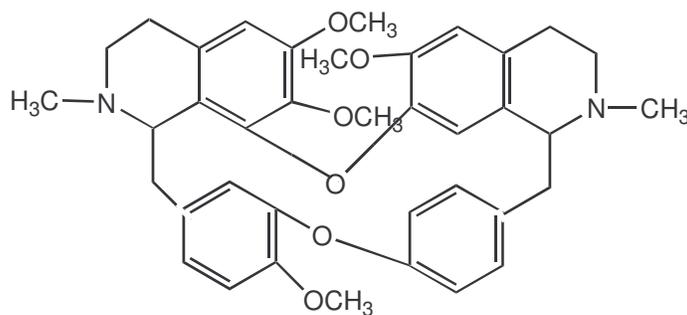
Elle a été isolée chez *Stephania tetrandra* S. Moore. La plante était utilisée pendant longtemps dans la médecine chinoise comme antirhumatismale ou analgésique.

La tétrandrine est un dérivé bibenzylisoquinoléine qui a une structure similaire à celle des amino - 4 et des amino -8-quinoléines .

Ye et Van Duke ( 1989 ) ont montré que la tétrandrine avait une efficacité plus importante sur les souches sensibles. Combinée à la chloroquine, elle préviendrait l'émergence de la chloroquinorésistance .

3-1-3-2 La phaeanthine : C' est un énantiomère de la tétrandrine. La phaeanthine a été isolée chez *Triclisia patence* ( *Menispermaceae*). Elle présente à peu près les mêmes effets que cette dernière.

Ekong et *al* (1991) ont montré que la phaeanthine était active *in vitro* sur *Plasmodium falciparum*.



phaeanthine

#### 3-1-4 La 7-O -diméthyltetrandrine et la limacine:

Elles ont été respectivement isolées chez *Strychnopsis thouarsu* et *Spirospermun penduliflorum* thou . Elles ont montré toutes les deux une activité antiplasmodique *in*

*vitro* (CL<sub>50</sub> similaires 740 nM et 789 nM contre 214 nM pour la chloroquine) (Ratsimamanga et *al.*, 1991).

### 3-1-5 **La berberine**

Elle est présente chez les *Annonaceae*, les *Berberidaceae* et les *Menispermaceae*. Son activité antiplasmodique a été démontrée *in vitro* mais pas *in vivo* (Phillipson et Wright, 1991).

## 3-2 **Les terpènes**

### 3-2-1 **Artémisinine ou qinghaosu:**

L'Artémisinine a été isolée en 1971 par des chimistes chinois à partir d'extrait de feuilles *Artemisia annua* (armoise). C'est une plante qui était utilisée traditionnellement pour ses vertus antipyrétiques et antipaludiques (Bougnoux et Ancelle, 1993).

La structure de l'artémisinine a été élucidée en 1973 par Jeremic et *al.*, suivie simultanément de sa synthèse par d'autres équipes. Il s'agit d'une sesquiterpène lactonique avec un pont endopéroxyde, indispensable à l'activité antimalarique. Le qinghaosu est peu soluble dans l'eau.

L'artémisinine et ses dérivés (arthéméther, arthééther, artésunate) constituent une nouvelle classe de molécules antiplasmodiques efficaces sur les souches résistantes de *Plasmodium falciparum* (Carvalho et *al.*, 1991).

### 3-2-2 **La parthénolide**

Elle a été isolée de *Parthenium hysterophorus* (*Asteraceae*). Son activité antiplasmodique a été démontrée *in vitro*.

### 3-2-3 **Les quassinoïdes** (triterpénoïdes).

Ce sont des principes actifs amers présents chez la plupart des *Simaroubaceae*. Des tests *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* ont été effectués sur 26 quassinoïdes ayant 8 structures différentes (Bryskier et Labro., 1988). Il a été démontré que les quassinoïdes sont des inhibiteurs potentiels de la synthèse protéique chez *Plasmodium falciparum* et ont un effet faible sur la glucoolyse.

Les triterpénoïdes, tingénone et pristimérine de certaines *Celastraceae* ont montré une activité *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* (Phillipson et Wright, 1991).

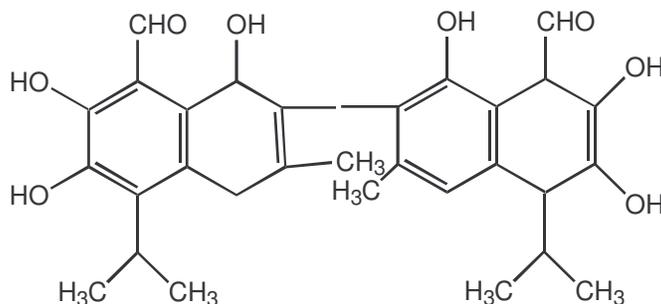
### 3-2-4 Les limonoïdes des Meliaceae :

Certaines limonoïdes ont été testées *in vitro*. C'est le cas de la gedunine, de la dihydrogedunine et de la nimbidine avec des CL<sub>50</sub> comprises entre 0,5 et 3 mcg /ml (Phillipson et Wright, 1991).

### 3-3 Les quinones, composés phénoliques et autres produits secondaires :

Les naphthoquinones sont actives *in vitro* sur *Plasmodium falciparum*. On peut citer le lapachol rencontré chez les *Bignoniaceae*. Les naphthoquinones sont désignées pour la production de nouvelles classes de molécules d'extraction végétale à cause de leur faible toxicité (N'kunya, 1992).

3-3-1 Le gossipol ( polyphénol ) isolé chez le cotonnier (*Gossypium* sp. ) a également été trouvé actif *in vitro* sur *Plasmodium falciparum*. Certains flavonoïdes (artémétine, casticine) ont une activité antiplasmodique mais à doses élevées (Phillipson et Wright, 1991).



gossipol

3-3-2 Les cynaropicrines (phénol simple) ont été isolées de *Vernonia glutinosa* (*Asteraceae*). Si l'activité antiplasmodique *in vitro* est prononcée, *in vivo* il n'en est rien (Bruneton, 1987).

### 3-4 Plantes antipaludiques

D'après la revue de la littérature plusieurs plantes médicinales sont utilisées dans le traitement du paludisme. Le tableau N°II présente quelques plantes médicinales utilisées au Mali dans le traitement du paludisme.

**Tableau N°II:** Liste de certaines plantes utilisées contre le paludisme.

Famille	Noms scientifiques	Parties utilisées	Formes d'utilisation	Références
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Sclerocarya birrea</i> (Hochst)	Ecorces du tronc	Décoction	Malgras, 1992
<i>Balanitaceae</i>	<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del.	Ecorces de racines	Macération	Diallo, 1999
<i>Bignoniaceae</i>	<i>Stereospermum kunthianum</i> (cham)	feuilles plus racines	Décoction	Malgras, 1992
<i>Caesalpinaceae</i>	<i>Burkea africana</i> (Hook.F)	Ecorces du tronc	Potion	
	<i>Cassia occidentalis</i> Linn)	feuilles	Décoction	
	<i>Cassia sieberana</i> (DC)	Racines	Décoction	
	<i>Tamarindus indica</i> (Linn)	Feuilles	Décoction	
<i>Combretaceae</i>	<i>Anogeisus leiocarpus</i> (Guill et perr.)	feuilles	Décoction	Diallo, 1999
	<i>Combretum glutinosum</i> (DC)	feuilles	Décoction	Malgras, 1992
	<i>Combretum micranthum</i> (G. Don)	Feuilles	Tisane	
	<i>Guiera senegalensis</i> (J.Fgmel)	Feuilles	Décoction	
<i>Meliaceae</i>	<i>Khaya senegalensis</i> (Juss)	Ecorces	Décoction	Malgras, 1992
	<i>Trichilia emetica</i> (Chiov.)	Feuilles	Décoction	Diallo, 2000
<i>Mimosaceae</i>	<i>Entada africana</i> (Guill et Perr.)	Racines	Décoction	Diallo, 1999
<i>Molluginaceae</i>	<i>Glinus oppositifolius</i> (L) ADC	Feuilles	Décoction	Diallo, 1999 Traoré, 1999
<i>Rubiaceae</i>	<i>Crossopteryx febrifuga</i> (Benth)	Rameaux feuillus	Décoction	Malgras, 1992
	<i>Gardenia ternifolia</i> (Schum)	Racines	Macération	
	<i>Mitragyna inermis</i> (O.Kuntze)	feuilles	Décoction Macération	Diallo, 1999 Kerharo, 1974 Traoré 1999
	<i>Nauclea latifolia</i> (Sm.)	Racines	Macération	Traoré, 1999

**Chapitre II**

**Etude monographique de *Spilanthes oleracea* Jacq.**

***Asteracea***

## 1 Aspect botanique

### 1-1 Synonymes

Le nom de *Spilanthes*, donné au genre que nous étudions possède six synonymes (Jellal et al., 1998 ):

*Acmella* **Rich .**

*Athronia* **Neck.**

*Ceruchis* **Gaertn .**

*Mendezia* **DC .**

*Pyrethrum* **Medic .**

*Spilanthus* **Linn .**

Le genre *Spilanthes* regroupe 35 espèces tropicales, réparties sur 3 continents: Asie, Afrique et Amérique. De nombreux auteurs ont donné des descriptions botaniques de cette plante sous différents noms, ce qui explique la présence de nombreux synonymes dans la littérature.

*Spilanthes africana* **DC**

*Spilanthes brasiliensis* Spreng.

*Spilanthes caulirhiza* **DC**

*Spilanthes debilis* H.B.α K.Nov.

*Spilanthes gandiflora* Turcz.

*Spilanthes lundii* **DC.**

*Spilanthes mariannae* **DC.**

*Spilanthes melampodioides* Gardn.

*Spilanthes oleracea* Linn

*Spilanthes pereguina* Blanco.

*Spilanthes salzmanni* **DC.**

*Spilanthes uliginosa* SW.

*Spilanthes arranaya* **Gardn.**

*Spilanthes calva* **DC.**

*Spilanthes costata* **Benth.**

*Spilanthes fusca* **Hort.**

*Spilanthes lobata* **Blanco.**

*Spilanthes macroglossa* F. **Muell.**

*Spilanthes mauritania* **DC.**

*Spilanthes melissaeflora* **Salib.**

*Spilanthes paniculata* **Wall.**

*Spilanthes pseudoacmella* **Murr.**

*Spilanthes tenella* **H.B. α K.Nov.**

Nom local en bamanan : **Farimani .**

**Figure No 1:** Plan de *Spilanthes oleracea* Jacq.

## 1-2 Systématique

**Tableau N°III** Position systématique de *Spilanthes oleracea*

Embranchement	Spermaphytes
Sous - embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous - classe	Gamopétales
Ordre	Synanthérales
Famille	<i>Asteraceae</i>
Série	Helianthées
Sous - série	Ecliptinées
Genre	<i>Spilanthes</i>
Espèce	<i>oleracea</i>

### 1.3. Description botanique ( Jellal et *al.*, 1998 )

#### 1.3.1 Appareil végétatif

C'est une plante ( **Figure N° 1** ) herbacée annuelle rameuse, touffue, rampante étalée à la base car s'enracinant au niveau des noeuds inférieurs, puis ascendante, atteignant jusqu'à 50cm de haut. Les tiges et les branches sont cylindriques et pubérulentes. Les feuilles opposées, sont simples, glabres, triangulaires et irrégulièrement crénelées ou dentées mais quelques fois entières. Le limbe mesure de 2,5 à 5cm de long, sur 1 à 4cm de large et est pratiquement glabre sur les deux faces.

#### 1.3.2. Appareil reproducteur

##### ❖Inflorescence:

De longs pédoncules axillaires ou terminaux portent des capitules solidaires constituant des inflorescences. Les capitules au départ hémisphériques et jaunes vifs, deviennent cylindro- ovoïdes, arrondis ou obtus et jaune sale à maturité, ils sont polygones ou homogones et disciformes.

##### ❖La fleur:

En général, les fleurs périphériques sont femelles et fertiles, disposées sur un seul rayon. Les fleurs centrales sont hermaphrodites.

les fruits sont des akènes qui sont de deux sortes: les akènes issus des fleurs périphériques sont triangulaires ou dorsalement comprimés et les akènes issus des fleurs centrales sont latéralement comprimés et habituellement ciliés aux bords et aux angles.

#### 1.4. Habitat et distribution géographique

Le genre *Spilanthus* est largement distribué partout dans les tropiques et les subtropiques et peut être trouvé dans les zones chaudes et humides des deux hémisphères.

Il semblerait que, selon le continent où l'on rencontre la plante, une des trois dénominations suivantes soit préférentiellement utilisée:

*Spilanthus acmella* Murr. En Asie: Indochine, Philippines...

*Spilanthus uliginosa* SW. en Afrique: Mali, Soudan, Niger, Camérout...

*Spilanthus oleracea* Linn. En Amérique du sud: Brésil, Chili, Pérou...

La grande diversité des noms serait due aux nombreuses localisations de l'espèce, mais aussi à quelques variations morphologiques de la plante (différences de couleur et de taille des organes). De plus, on distingue à l'intérieur de l'espèce des races chimiques; ainsi, *Spilanthus mauritania* DC ne contient pas de spilanthol mais une isobutylamide voisine (Jellal et al., 1998).

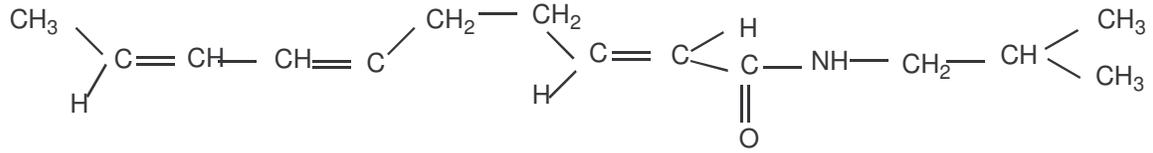
## 2. CHIMIE

Le spilanthol brut est le principe actif contenu dans l'ensemble de la plante qui agit sur le parasite responsable du paludisme ( Jellal et al., 1998 ).

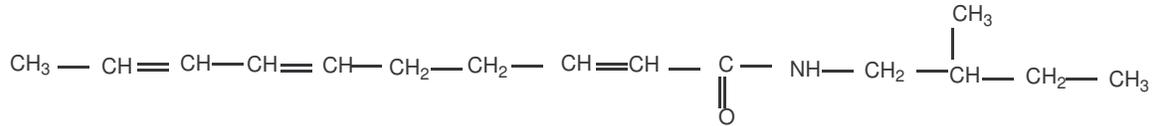
Le spilanthol a été isolé pour la première fois en 1903 par un chercheur allemand, E. Gerber. Par la suite plusieurs équipes scientifiques ont étudié la structure et la technique d'extraction du spilanthol ( Nagashima et Nakatani, 1992; Jellal et al., 1998 ). En 1930, Asano et Kanematsu ont revendiqué l'extraction du spilanthol pur à partir des capitules de *Spilanthus oleracea*. Le spilanthol ainsi identifié était de couleur jaune pâle, âcre, bouillant à 165°C dont la formule brute est C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO ( Jacobson, 1957 ).

**- Structures chimiques de quelques composés isolés de *Spilanthes oleracea***

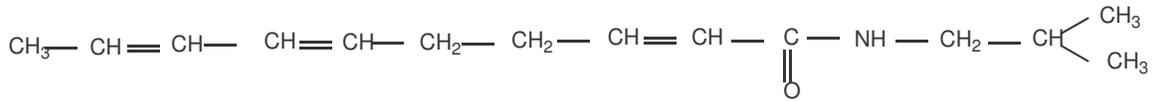
**Amides**



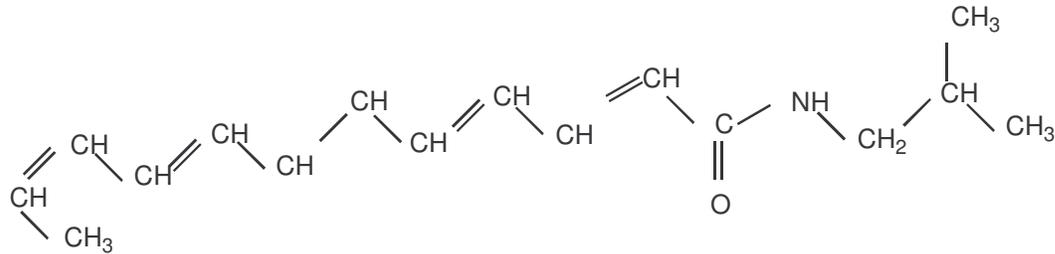
Spilanthol: N - isobutyl - 2, 6, 8 decatriénamide



N - 2- méthylbutyl deca - 2, 6, 8 triénamide

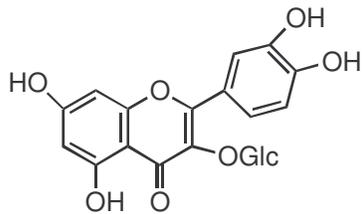


N - isobutyldeca - 2 - ène - 6, 8 diynamide

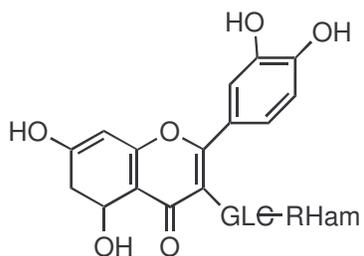


N - isobutyl dodeca - 2, 4, 8, 10 tetraénamide

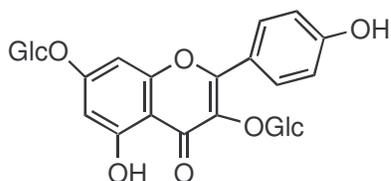
**Flavonoïdes**



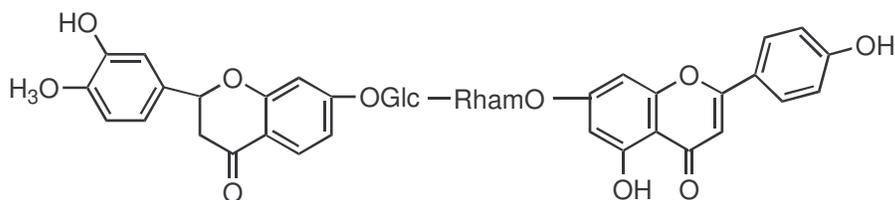
Quercetine - 3 - glucoside



quercetine - 3 - rhamnoglucoside

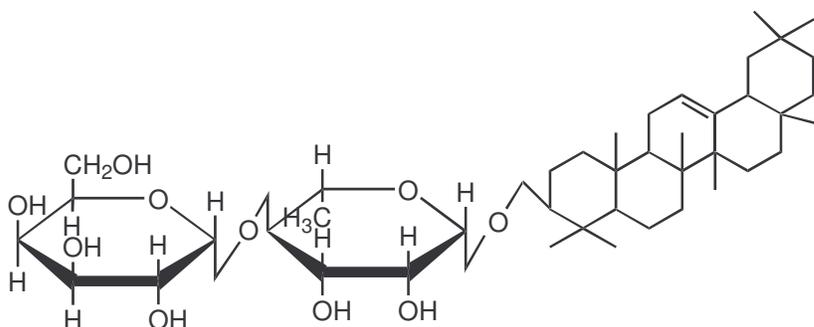


Apigénine-7-glucoside



Apigénine-7-néohespéridoside

### Triterpenoïdes



Saponoside

### 3. Utilisations en Médecine Traditionnelle :

*Spilanthes* n'est pas une plante très connue dans le milieu médical. On le retrouve cependant dans certaines herboristeries américaines où il est vendu pour ses multiples propriétés: odontalgique, antifongique, antivirale, immunologique. En Allemagne il est utilisé pour ses propriétés antifongiques et antibactériennes (Jellal et *al.*, 1998).

*Spilanthes oleracea* est largement utilisé en Afrique, en Asie et Amérique du sud pour ses propriétés odontalgique, analgésique, hémostatique et cicatrisante. Le tableau suivant montre les diverses utilisations du *Spilanthes* sur ces continents.

**Tableau N°IV** Utilisations du *Spilanthes* à travers les continents (Jellal et al. 1998).

Parties utilisées	Mode d'administration	Utilisation	Lieux
Capitules seuls	Mastication	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calme les maux de dents (la mastication provoque des picotements et un engourdissement de la bouche qui disparaissent au bout de 20 minutes sans que la douleur ne réapparaisse).</li> <li>• Provoque une légère anesthésie lors de l'arrachage d'une dent.</li> <li>• Propriétés de tonique digestif (car il provoque une hypersalivation).</li> </ul>	Afrique Inde
	Infusion	• Traitement du paludisme.	Mali
	Mâchés puis appliqués en cataplasme	• Favorise la cicatrisation des plaies (lors de la circoncision par exemple).	Afrique de l'ouest

**Tableau N°IV:** ( Jellal et *al.*, 1998 ) suite

Parties utilisées	Mode d'administration	Utilisation	Lieux
Feuilles seules	Décoction	· Lotion contre les rhumatismes.	Philippines
	Poudre humide	· Traite les inflammations buccales (lèvres et gencives).	Afrique
		· Effet diurétique et antilithiasique.	
	Friction	· Calme les éruptions prurigineuses.	Inde
		· Entre dans la composition de collutoires proposés dans le traitement des maux de gorge.	Afrique
Racines seules	Décoction	· Lotion contre la gale et le Psoriasis.	Philippines
		· Effet purgatif.	
Feuilles et capitules	Mastication	· Propriétés antiscorbutiques (la plante est riche en vitamine C).	Madagascar
Plante entière	Décoction	· Effet vermifuge (contre oxyuroses et ascarioses).	Madagascar
		· Contre la dysenterie	Afrique et Indochine
		· Propriétés fébrifuges.	Afrique
		· Calme les douleurs de l'accouchement. · Traitement des cystites, néphrites, leucorrhées et aménorrhées. · Contre le bégaiement.	Inde
	· Contre les morsures du serpent.	Cameroun	
	Friction	· La plante entre dans la composition d'une dentifrice.	Amérique du sud, Madagascar
Spilanthol	Extrait éthéré	· Propriétés piscicides et insecticides.	Inde

#### 4. **PHARMACOLOGIE** ( Doumbia, 1997; Bocoum, 2001 ).

##### 4.1. **Activité insecticide du Spilanthol**

Après plusieurs travaux, l'équipe de Trevisson a constaté que le spilanthol a un pouvoir insecticide proche de celui du DDT, avec un long délai d'action.

##### √. **Action sur le charançon du haricot *Acanthoscelides obtectus***

L'activité insecticide de spilanthol 4mg / ml est comparable à celle de 6mg / ml de DDT.

##### √. **Action sur la blatte américaine et la punaise de laitron**

La même équipe a mené des expérimentations sur la blatte américaine et la punaise de laitron. Elle a démontré qu'un extrait MeOH des capitules, à la concentration de 0,05mg / ml entraîne 100 % de mortalité des blattes américaines, de même que l'extrait CHCl<sub>3</sub> à la concentration de 10<sup>-4</sup> mg / ml. Le spilanthol purifié a les mêmes effets à la dose de 5 - 10 mg / ml.

##### √. **Action sur la mouche domestique *Musca domestica***

La mouche domestique transporte des germes responsables de maladies infectieuses graves comme le trachome, la fièvre typhoïde, la tuberculose, la lèpre.

Une solution de spilanthol, naturel ou synthétique, à une concentration de 2mg / ml induit la paralysie de tous les insectes en dix minutes. 26 % de mortalité sont obtenus en 24heures.

##### √. **Action sur les larves d'anophèles et de culex**

L'extrait éthéré des feuilles et des fleurs de *Spilanthus oleracea* est toxique envers les larves d'anophèles et de *culex*, quand il est testé dans un mélange alcool- savon, par exemple à une concentration de 1 / 10000.

##### 4.2. **Activité molluscicide**

L'addition de spilanthol à des concentrations différentes dans des boîtes de pétri contenant 5 mollusques ( *Physa occidentalis* ).

TREVISSON et *Coll.*, ont démontré que le spilanthol a une activité cercaricide avec une DL<sub>50</sub> = 50 ppm. Les résultats sont obtenus par l'observation visuelle des boîtes de pétri à des temps différents.

→ Pour une concentration de 50 mg / litre dans l'eau à 21°C on note:

- l'inactivité des mollusques après 60 minutes.

- la mort des mollusques dans les 18heures.
- Pour une concentration de 250 mg / litre (solubilité maximum du principe actif dans l'eau) on note:
- L'immobilité des mollusques après 30 minutes;
  - L'absence d'émergence de cercaires;
  - Le fait que les cercaires placées dans les boîtes cessent de se mouvoir après 5 secondes et se convulsent après une minute.

L'expérience montre l'intérêt prophylactique du spilanthol dans la lutte contre les bilharzioses, par son activité molluscicide avec une  $DL_{50} = 50$  ppm ainsi que par son activité cercaricide. Cependant, des difficultés apparaissent quant à l'application de ces données en raison d'une toxicité élevée sur les poissons d'eau douce.

#### 4.3. Activité antipaludéenne

L'activité antipaludéenne du *Spilanthus* est très peu reconnue dans les pays occidentaux. En effet, ces derniers ne sont pas confrontés directement au problème du paludisme, ce qui explique qu'ils ne recherchent pas de façon traditionnelle de lutter contre cette maladie.

Cependant Richard dans un article consacré au *Spilanthus* publié en 1996 sur site internet de Horizon Herb (herboristerie de l'Oregon), cite les propriétés antipaludéennes du *Spilanthus*. Il conseille même les personnes qui vont séjourner dans les zones impaludées de se munir d'une bouteille d'infusion de *Spilanthus* voire de cultiver la plante (Richard, 1996; Jellal et al., 1998). On retrouve quelques fois cette activité du *Spilanthus* citée dans la littérature. L'activité antipaludéenne du *Spilanthus* est donc connue par delà des frontières maliennes.

Au Mali, des études expérimentales sur l'activité antipaludéenne de *Spilanthus* ont été effectuées au DMT. Ses propriétés sont traditionnellement connues et reconnues. Le spilanthol extrait de *Spilanthus oleracea* qui entre dans la composition d'un Médicament Traditionnel Amélioré antipaludéen : le Malarial 5. Deux tests ont été effectués pour évaluer l'activité schizonticide du Malarial 5.

- Un test *in vitro* sur deux lignées de *Plasmodium falciparum*: une lignée FCC2 chloroquino-sensible provenant du Niger et une lignée FZR chloroquino-résistante provenant des Comores.
- Un test *in vivo* sur des souris expérimentalement infectées par *Plasmodium berghei* (Gasquet et *al.*, 1993).

## **Chapitre III METHODOLOGIE**

## **1 Matériel végétal**

La drogue était constituée par les capitules de *Spilanthus oleracea* J. et les feuilles de *Lippia chevalieri* M.

### **Collecte**

La drogue constituée par les capitules de *Spilanthus oleracea* et les feuilles de *Lippia chevalieri* a été récoltée dans le jardin expérimental du DMT en Décembre 2001. Un spécimen est déposé à l'herbier du DMT.

### **Séchage et pulvérisation**

Les capitules de *Spilanthus oleracea* de même les feuilles de *Lippia chevalieri* ont été émondés et séchés à l'air libre, à l'abri de la lumière sur des claies de séchage. Les capitules et les feuilles ainsi séchés ont été pulvérisés pour obtenir une poudre fine à l'aide d'un broyeur ( RETSCH SM 2000 ). Ces poudres ont été utilisées pour les différentes extractions.

## **2 Extractions**

### **2 - 1 Extractions aqueuses**

Nous avons réalisé des différentes extractions dans le but d'en avoir une méthode standard.

- **Décoction à 10 % ( m / v )**: 150 g de drogue sont mis dans 1,5 litres d'eau distillée. Nous avons fait bouillir pendant 10 minutes. Après filtration sur papier filtre, le volume a été réduit avec un évaporateur rotatif à pression réduite à une température comprise entre 45-50°C ( **Figure N° 2** et **Figure N° 3** ) . Ces extraits ont été lyophilisés puis stockés dans les flacons en verre avec bouchon.

- **Décoction à 2 % ( m / v )**: 6 g de drogue sont mis dans 300 ml d'eau distillée puis bouillis pendant 10 minutes. Après filtration sur papier filtre, le volume a été réduit à l'aide d'un évaporateur rotatif à pression réduite à une température comprise entre 45-50°C ( **Figure N° 2** et **Figure N° 3** ). Ces extraits ont été lyophilisés puis stockés dans les flacons en verre avec bouchon.

- **Décoction à 1, 2 % ( m / v )** : 6 g de drogue sont mis dans 500 ml d'eau distillée et l'extraction a été faite comme précédemment avec les 2 %.

Cet extrait aqueux à 1, 2 % nous a servi de réaliser la chromatographie sur couche mince et l'étude de la toxicité.

## **2 - 2 Extraction des huiles essentielles de *Lippia chevalieri***

Les huiles essentielles de *Lippia chevalieri* ont été extraites par un système d'entraînement à la vapeur.

Il s'agit d'une distillation continue en circuit fermé pendant un temps suffisant pour entraîner la totalité de l'huile essentielle contenue dans la drogue. L'huile volatile est entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'essence surnage l'eau et on procède à une mesure volumétrique dans un tube gradué ( Bruneton, 1993 ).

**PE** = 50g

**Duré de l'opération** = 4heures.

**Figure No 2 et No 3**

### **3 CARACTÉRISATION**

#### **3 - 1 Réactions en tubes**

Les études analytiques ont été faites à partir des techniques standards du Département de Médecine Traditionnelle (DMT) de l'INRSP.

##### **3 -1 -1 Alcaloïdes**

###### **√ Solution à analyser**

Introduire 10g de poudre dans un erlenmeyer de 250 ml sur lesquels nous avons ajouté de l'acide sulfurique dilué avec 50 ml d'eau distillée. Agiter et laisser en macération pendant 24heures à la température du laboratoire. Filtrer sur papier filtre et laver à l'eau de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

###### **√ Réaction de précipitation**

Pour cette caractérisation nous avons opéré avec un témoin: la strychnine.

Prendre 4tubes à essai et introduire 1ml de filtrat dans les tubes n°1 et n°2, 1ml de strychnine dans le tube n°3 et 1ml d'eau distillée dans le tube n°4. Ajouter dans chaque tube 5gouttes de réactif de Dragendorff.

Prendre une autre série de 4 tubes à essai, introduire 1ml de filtrat dans les deux premiers tubes, 1ml de strychnine dans le tube n°3 et 1ml d'eau distillée dans le tube n°4. Ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans chaque tube. En laissant réposer pendant 10 minutes, les résultats ont été évalués comme suite:

Précipité abondant	+++
Précipité moyen	++
Précipité louche	+
Test négatif	0

###### **√ Extraction**

Introduire 25ml de filtrat dans une ampoule à décanter, le filtrat est alcalinisé avec l'ammoniaque dilué (1:1) jusqu'à pH= 8 à 9. Ajouter du chloroforme dans un volume égal à la solution alcaline.

Cette opération a été reprise 3fois au total, réunir les phases organiques et secher sur du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis filtrer et partager en deux parties égales dans deux capsules.

Evaporer à sec; reprendre le résidu de la première capsule par 2ml d'acide chlorhydrique dilué à 1/10. La solution obtenue a été partagée entre deux tubes à essai et utiliser de nouveau les réactifs généraux des alcaloïdes ( Mayer et Dragendorff ).

√ **Alcaloïdes des solanacées mydriatiques**

Le résidu sec contenu dans la deuxième capsule a été repris par 1ml d'acide nitrique fumant. Evaporer au BM bouillant jusqu'à sec. Après refroidissement, introduire dans la capsule 10ml d'acétone goutte à goutte et la solution de KOH à 5 % dans l'éthanol fraîchement préparée. En présence d'alcaloïdes des solanacées mydriatiques (extrait de l'acide troponique et du troponol), il se développe une coloration violette (réaction de Vitali - Morin).

**3 - 1 - 2 Tétrahydrocannabinol ( THC = Stupéfiant ) : Réaction de Beam**

Peser 0,5 g de poudre et introduire dans un tube à essai.

Ajouter 5 ml d'éther de pétrole et agiter pendant 15minutes.

Décanter la phase éthero-pétrolique dans une capsule.

Evaporer à sec au BM.

Reprendre le résidu sec par 3 à 4 gouttes de KOH à 5 % dans l'éthanol. La coloration violette indique une réaction de Beam positive.

**3 - 1 - 3 Substances polyphénoliques**

**Solution à analyser**

Introduire 5g de poudre dans 100ml d'eau bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250 ml. Arrêter l'ébullition, refermer l'erlenmeyer d'un verre de montre ou le surmonter d'un entonnoir et laisser infuser pendant 15 minutes. Ensuite filtrer sur papier filtre et rincer avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat.

**Caractérisation**

√ **Tanins**

Introduire 5ml d'infusé dans un tube à essai. Ajouter 1ml de FeCl<sub>3</sub> à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu- noirâtre. La présence de tanins catéchiques est caractérisée par addition à 5ml d'infusé d'un ml d'acide chlorhydrique concentré. Porter à l'ébullition pendant 10minutes, il apparaît un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique. La différenciation des tanins catéchiques et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny. A 30ml d'infusé à 5 %, ajouter 15 ml de réactif de

Stiasny (10 ml de formol à 40 % + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré), puis chauffer au BM pendant 15 à 30 minutes. L'obtention de précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer 10ml de filtrat avec l'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1ml d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1 %.

Le développement d'une teinte-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny. Les tanins peuvent être également précipités par addition de gélatine à 1% à l'infusé.

#### √ **Flavonoïdes**

A 5ml d'infusé, ajouter 15ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10% puis 5ml de NH<sub>4</sub>OH dilué au demi. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu-violacée en milieu basique, nous pouvons conclure à la présence d'anthocyanes.

#### - **Réaction à cyanidine**

Introduire dans un tube à essai 5ml d'infusé, ajouter 5ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°C, eau distillée, acide chlorhydrique concentré à partie égale = 5ml), puis quelques copeaux de magnésium et 1ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavonones) ou rouge (flavonol, flavononol) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique, indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).

**NB:** Les colorations sont intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aures, la cathéchine et les isoflavonones.

Effectuer la réaction de la cyanidine sans ajouter de copeaux de magnésium et chauffer pendant 10 minutes au BM. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge- cerise ou violacée. Les cathéchols donnent une teinte brun rouge.

### **3 - 1 - 4 Dérivés anthracéniques**

#### √ **Solution à analyser**

#### - **Extrait chloroformique**

A 1g de drogue en poudre, ajouter 10ml de CHCl<sub>3</sub> et chauffer au BM. Filtrer à chaud et compléter à 10ml.

#### - **Hydrolysats**

A une partie du résidu de poudre épuisée par le chloroforme ajouter 10ml d'eau distillée, plus HCl concentré puis maintenir le tube à essai dans un BM bouillant pendant 15minutes. Laisser refroidir sous un courant d'eau et filtrer.

### √ Caractérisation

#### - Anthracéniques libres Réaction de Borntrager

Introduire dans un tube à essai 1ml d'extrait chloroformique préparé, ajouter 1ml de NH<sub>4</sub>OH dilué au demi puis agiter. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

#### - Anthracéniques combinés

##### **0-hétérosides**

Prélever 5ml d'hydrolysate préparé ci dessus et agiter avec 5ml de CHCl<sub>3</sub>. Soutirer la phase organique puis l'introduire dans un tube à essai et garder la phase aqueuse. Ajouter 1ml de NH<sub>4</sub>OH dilué au demi et agiter.

La présence d'antraquinones est révélée par l'apparition d'une coloration plus ou moins rouge. Si la coloration est négative ou faiblement positive, rechercher les :

##### **0-hétérosides à génines réduites**

Prélever 5ml d'hydrolysate et ajouter 3 à 4gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10 %. Chauffer pendant 5 minutes au BM. Refroidir, agiter avec 5ml de CHCl<sub>3</sub>. Soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1ml de NH<sub>4</sub>OH dilué au demi et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthranones, la coloration devient plus intense que précédemment.

##### **C-hétérosides**

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée par 10ml d'eau distillée ajouter 1ml de FeCl<sub>3</sub> à 10 %. Maintenir le tube à l'ébullition pendant 30 minutes, puis refroidir sous un courant d'eau et agiter avec 5ml de CHCl<sub>3</sub>. Soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1ml de NH<sub>4</sub>OH dilué au demi et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génine de C-hétérosides.

### **Réaction de Brissemoret et Combes: (Differentiation des quinones)**

Introduire 1g de poudre de plante dans un erlenmeyer de 250 ml, humecter avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué à 10 %. Ajouter 20ml d'un mélange à volume égal d'éther et de chloroforme pendant 24heures; filtrer et placer 5ml de filtrat dans une capsule puis évaporer à sec. Reprendre le résidu par quelques gouttes d'alcool à 95°. Ajouter une solution d'acétate de Nickel à 5%. Selon la nature de la quinone, il apparaît:

benzoquinones: coloration bleue et précipité

naphthoquinones: coloration violette et précipité

anthraquinones: coloration rouge sans précipité.

### **3 - 1 - 5 Stérols et triterpènes**

#### **√. Extraction**

Introduire dans un tube à essai 1g de poudre et 20ml d'éther. Boucher et agiter, laisser en contact pendant 24heures puis filtrer et compléter à 20ml par de l'éther.

#### **√ Caractérisation**

#### **Stérols et triterpènes: Réaction de Libermann- Buchard**

Evaporer à sec dans une capsule 10ml d'extrait, dissoudre le résidu dans 1ml d'anhydrique acétique plus 1ml de CHCl<sub>3</sub> et recueillir dans deux tubes à essai (l'un servira de témoin et le second pour la caractérisation). Déposer 1 à 2ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à l'aide d'une pipette, ne pas agiter. A la zone de contact des liquides il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et triterpènes.

#### **√ Caroténoïdes**

Evaporer à sec 5ml d'extrait éthéré dans une capsule, ajouter 2 à 3 gouttes de solution saturée de chlorure d'antimonieux (SbCl<sub>3</sub>) dans du chloroforme ou dans le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>). Il se développe en présence de caroténoïdes une coloration bleue devenant rouge par la suite.

### **3 - 1 - 6 Hétérosides cardiotoniques**

#### **√ Solution à analyser**

Introduire 1g de poudre dans un tube à essai, puis ajouter 10 ml d'éthanol à 10%. Ensuite porter au BM bouillant pendant 10minutes, filtrer sur coton.

### √ Caractérisation

Agiter le filtrat avec 10ml de  $\text{CHCl}_3$  sans formation d'émulsion. Laisser décanter; soutirer la phase chloroformique et partager entre 3 tubes à essai dans le:

**tube n°1** 1ml de réactif de Baljet

**tube n°2** 1ml de réactif de Kedde

**tube n°3** 1ml de réactif de Raymond- Marthoud.

Puis introduire dans chaque tube 4 gouttes de KOH à 5 % dans l'éthanol fraîchement préparé. En cas de réaction positive, il se développe les colorations suivantes:

**tube n°1:** orangée

**tube n°2:** rouge- violacée

**tube n°3:** violet fugace.

### **3 - 1 - 7** Saponosides

Faire un décocté à 1 % , filtrer et ajuster à 100ml après refroidissement. Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, répartir successivement 1, 2 .....10 ml de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée .

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de deux (2) agitations par seconde. Laisser reposer 15mn et mesurer la hauteur de la mousse de chacun des tubes. Le tube dont la hauteur est de 1cm indique la valeur de l'indice de mousse.

1000

Indice de mousse =  $\frac{1000}{\text{N}^\circ \text{ du tube à 1cm de hauteur de mousse}}$

### **3 - 1 - 8** Autres caractérisations

#### **3 - 1 - 8 - 1** Composés réducteurs

Introduire 5ml de décocté aqueux à 10 % dans une capsule et évaporer à sec au BM . Ajouter au résidu 1ml de réactif de Fehling ( 0,5 ml de réactif A + 0,5 ml de réactif B). L'obtention d'un précipité rouge - brique indique la présence de composés réducteurs .

### **3 - 1 - 8 - 2 Oses et holosides**

Introduire 5ml de décocté à 10 % dans une capsule et évaporer à sec au BM . Ajouter au résidu 2 à 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Après 5 minutes ajouter 3 à 4 gouttes d'alcool saturé avec du thymol. Le développement d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et d'holosides .

### **3 - 1 - 8 - 3 Mucilages**

Introduire 1ml de décocté à 10 % dans un tube à essai, ajouter 5ml d'alcool absolu. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilages.

### **3 - 1 - 8 - 4 Coumarines ( Fluorescences UV 366 nm )**

Evaporer 5ml d'extrait éthérique par macération pendant 24 heures dans une capsule et à l'air libre. Ajouter au résidu 2ml d'eau chaude. Partager la solution entre 2 tubes à essai et ajouter au contenu de l'un des tubes 0,5ml de NH<sub>4</sub>OH à 25 %, mélanger et observer la fluorescence sous UV 366nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de NH<sub>4</sub>OH indique la présence de coumarines.

### **3 - 1 - 8 - 5 Hétérosides cyanogénétiques**

Introduire dans un tube à essai environ 1g de poudre, puis 5ml d'un mélange à volume égal d'eau et de toluène. Bien agiter et nettoyer la partie supérieure du tube à laquelle est fixé un papier picrosodé à l'aide d'un bouchon (sans tremper dans la solution).

La coloration rouge plus ou moins rapide du papier picrosodé indique la présence d'hétérosides cyanogénétiques.

## **3 - 2 Dosage de quelques substances**

### **3 - 2 - 1 Dosage de l'eau :**

#### **3 - 2 - 1 - 1 Méthode pondérale :**

C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

#### **- Mode opératoire**

Introduire 1 à 2g de poudre, dans les verres de montre préalablement tarés. Placer les verres contenant la poudre à l'étuve de 100°C pendant 24heures, puis peser de nouveau après refroidissement.

Masse drogue essai = Masse totale avant étuve - Tare

Masse eau = Masse totale avant étuve - Masse totale après étuve

Nous avons effectué cinq prises d'essai et considéré la teneur moyenne.

### **3 - 2 - 1 - 2 Méthode volumétrique**

C'est le dosage de l'eau par entraînement azéotropique. L'eau est entraînée par distillation avec un solvant qui ne lui est pas miscible. Le solvant utilisé ici a été le toluène . La réaction azéotropique se fait à une température d'ébullition constante . Après condensation par réfrigération des vapeurs de l'azéotrope, l'eau se sépare et est mesurée en volume.

#### **- Mode opératoire**

Introduire dans un ballon de 250ml, 100ml de toluène et 1ml d'eau distillée. Distiller pendant une heure de temps pour bouillir l'eau contenue dans le toluène puis laisser refroidir pendant 30 minutes. Lire le volume ( Vi ) de l'eau avec précision de 0,05ml près. Ensuite introduire de nouveau dans le ballon une prise d'essai ( P.E ) de 5g de poudre et distiller pendant une heure de temps pour entraîner l'eau. Laisser refroidir pendant 30 minutes, puis lire le volume d'eau ( Vf ).

La teneur en eau est exprimée en % par la formule suivante :

$$\% \text{ en eau} = \frac{V_f - V_i}{PE} \times 100$$

PE = Prise d'essai

Vi = volume initial

Vf = volume final

### **3 - 2 - 2 Dosage des cendres**

#### **3 - 2 - 2 - 1 Cendres totales**

Consiste à incinérer la poudre de drogue puis calciner jusqu'à l'obtention des cendres blanches .

#### **- Technique**

5 creusets préalablement portés au rouge sont refroidis et tarés. Dans chacun des creusets est introduite une prise d'essai de 1 à 5g . Il s'agit des prises d'essai ayant servi de dosage de l'eau. Ensuite, ces creusets sont mis en incinération dans le four à 800 ° C pendant 4 à 6 heures. Refroidir dans un dessiccateur avant leur pesée. Cette quantité est rapportée à 100g de substance par la formule suivante :

$$\% \text{ cendres totales} = \frac{\text{Masse des cendres}}{\text{Masse drogue essai}} \times 100$$

Masse cendres = Masse Totale après calcination - Tare

Masse drogue essai = Masse Totale avant calcination - Tare

### **3 - 2 - 2 - 2 Cendres sulfuriques à 50%**

- **Principe** . Résulte de la calcination au contact de l'air après attaque par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les carbonates, les oxalates et les oxydes sont convertis en sulfates non volatiles dont le résidu est pesé.

#### **Mode opératoire**

Porter au rouge pendant 10 minutes un creuset de platine ( silice ). Laisser refroidir et tarer. Introduire la PE de 2 à 3g dans le creuset de silice, mouiller avec une quantité suffisante d'acide sulfurique à 50 % d'eau . Chauffer au BM jusqu'à évaporation à sec puis le placer au four à 800°C. Maintenir la calcination jusqu'à disparition des particules noires . Laisser refroidir et ajouter une quantité suffisante de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué à 1/2 puis évaporer et calciner comme précédemment après refroidir dans un dessiccateur . Le taux des cendres sulfuriques ainsi calculé est rapporté à 100 g de substance .

### **3 - 2 - 2 - 3 Cendres insolubles dans HCl à 10%**

Ce sont des résidus obtenus après traitement des cendres totales par l'acide chlorhydrique à 10 %

#### **Mode opératoire**

Ajouter aux cendres totales 20ml de HCl à 10% puis porter à l'ébullition au BM pendant 15minutes. Le décocté est filtré à chaud sur un filtre sans cendre et le résidu insoluble est rincé par l'eau chaude. Dans un creuset préalablement taré, transférer le papier filtre contenant le résidu insoluble dans l'acide chlorhydrique à 10 % et faire secher à l'étuve pendant 24heures. Introduire ce papier filtre et résidu séché dans le four à 800°C pendant 4 à 6 heures puis incinérer et peser de nouveau après refroidissement . Ainsi nous avons déduit la quantité par différence de deux pesées. La teneur des cendres totales insolubles dans l'acide chlorhydrique à 10 % est donnée par la formule :

$$\% \text{ cendres insolubles dans HCl à 10 \%} = \frac{\text{Masse cendres}}{\text{Masse drogue essai}} \times 100$$

### **3 - 2 - 3 Détermination des substances extractibles par l'eau**

Faire la décoction de 1g de poudre dans 20ml d'eau pendant 15minutes puis laisser refroidir pendant 20minutes et filtrer. Mettre le filtrat dans une capsule de masse connue ( n ). évaporer à sec puis repeser la capsule ( n' ) . La teneur des substances extractibles par l'eau est rapportée à 100g de substance par la formule suivante:

$$\% \text{ des SEE} = ( n - n' ) \times 100$$

### **3 - 2 - 4 Détermination du pourcentage des alcaloïdes**

3g de poudre plus 25ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10 % puis 5ml d'eau distillée, mélanger et agiter avec un agitateur magnétique. Filtrer et compléter à 50ml avec de l'eau distillée. Alcaliniser avec NH<sub>4</sub>OH jusqu'à pH : 8 - 9. Faire l'extraction avec 50 ml de CHCl<sub>3</sub>, recueillir le filtrat de chloroforme dans l'erlenmeyer et secher sur sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Filtrer l'extrait dans une capsule déjà pesée, évaporer au BM puis repeser la capsule après refroidissement.

S ( masse d'alcaloïdes ) = Masse de la capsule + substance - Masse de la capsule vide

PE ( prise d'essai ) = 3g . Le pourcentage des alcaloïdes est donnée par la formule suivante:

$$\% \text{ des alcaloïdes} = \frac{S \times 100}{PE}$$

### **3 - 2 - 5 Dosage du spilanthol**

Dans le but d'améliorer l'efficacité de *Spilanthos oleracea* dans le Malarial 5, nous avons dosé le spilanthol contenu dans les capitules par différentes techniques.

#### **3 - 2 - 5 - 1 Technique d'extraction du spilanthol du DMT**

Percolation à froid (1heure 45 minutes) des capitules (10g de drogues) par 100ml de l'éther diéthylique dans une ampoule à décantier.

Evaporer à sec jusqu'à l'obtention d'une masse verdâtre.

Ajouter au résidu 3 fois 10ml d'une solution hydroalcoolique (60 % éthanol et 40 % eau distillée) puis concentrer au rotavapor afin d'éliminer l'alcool.

Extraire la phase aqueuse résiduelle par 100ml d'hexane puis concentrer au rotavapor jusqu'à l'obtention d'une huile jaune pâle. Le produit ainsi obtenu est considéré comme étant du spilanthol.

#### **3 - 2 - 5 - 2 Extraction au soxhlet par l'hexane**

Peser 2 échantillons de 6,24g et 7,00g de capitules (frais ou broyés). Introduire dans les cartouches de papier filtre puis fermer à l'aide de coton de verre.

Placer ces cartouches dans le soxhlet puis remplir celui-ci avec de l'hexane (300ml).

Laisser distiller pendant 8 heures puis concentrer au rotavapor jusqu'à l'obtention d'une masse verdâtre.

### **3 - 2 - 5 - 3 Extraction par l'éther diéthylique**

#### **Percolation**

Peser exactement 10g d'un mélange homogène de capitules. Introduire dans une ampoule à décanter puis extraire avec 100ml de l'éther diéthylique. Après la première percolation (1heure 10 minutes), l'extrait obtenu a été repassé deux fois successivement 2heures 43 minutes et 2heures 7 minutes dans une ampoule à décanter. Evaporer au rotavapor puis ajouter 3 fois 10ml d'un mélange hydroalcoolique (60 % éthanol et 40 % eau distillée).

Concentrer au rotavapor jusqu'à l'élimination de l'alcool.

Extraire la phase aqueuse résiduelle avec 300ml d'hexane puis concentrer l'extrait hexanique au rotavapor jusqu'à l'obtention d'une masse verdâtre.

#### **Extraction au soxhlet**

Le marc épuisé par l'éther diéthylique a été repris par l'acétate d'éthyle selon le même protocole que l'extraction au soxhlet par l'hexane. La durée de l'opération est de 3heures.

### **4 Chromatographie**

#### **4 - 1 Chromatographie sur couche mince: CCM**

C'est une méthode physico-chimique de contrôle dont l'adsorbance (phase stationnaire) utilisée durant nos travaux a été le silicagel 60 F254 Merk sur feuille aluminium. Elle comprend essentiellement trois phases:

#### **Dépôt**

Nous avons mis 10 mg d'extrait à séparer dans 1ml de mélange Méthanol-Eau à volume égal. Après dissolution nous avons déposé 5 à 10 µl à l'aide d'une micropipette. Les dépôts ont été faits sur la plaque à 1cm du bord inférieur et 1,5cm des bords latéraux. Le solvant a été évaporé après chaque dépôt à la température ambiante du laboratoire ou à l'aide d'un séchoir électrique.

#### **Migration**

Placer les plaques dans une cuve à chromatographier dans laquelle se trouve un solvant approprié, pour permettre d'observer le déplacement de la phase mobile le long de la plaque. Après migration, le front du solvant est marqué avec le crayon et la plaque est séchée de nouveau puis elle est prête pour la révélation.

### **Révélation**

La révélation a été faite à 254nm, 366nm et avec le réactif de Godin, réactif polyvalent. Chaque spot était caractérisé par sa couleur, sa fluorescence et par son Rf qui doit être compris entre 0 et 1.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

## **4 - 2 Chromatographie sur colonne**

Nous avons utilisé une colonne en verre dont les dimensions sont les suivantes:

Longueur de la colonne: 30 cm

Diamètre de la colonne: 2 cm

Support: charbon actif

Masse du support: 30 grammes.

### **Montage de la colonne**

Après le nettoyage de la colonne, nous avons introduit un coton hydrophile au fond à l'aide d'une baguette de verre.

Mélanger le support avec le système de solvant d'élution dont le robinet est bien fermé.

### **Injection**

Nous avons mélangé 5grammes d'extraits avec 100 ml d'éther de pétrole. Le mélange est introduit dans la colonne à l'aide d'une pipette de pasteur.

Débit de la colonne est: 1 ml / minute. Les fractions ainsi obtenues ont été regroupées en fonction de leur similitude en CCM puis concentrées. Chaque étape a été observée à l'UV comme solvant de migration Lignoïne- Acétate d'éthyle ( 1 : 1).

## **5 Evaluation de la toxicité aigue: détermination de la DL50**

### **5 - 1 Principe**

Il consiste à administrer à l'animal une dose unique de produit à tester. L'observation dure en général 14jours. Ces essais doivent être menés habituellement chez la souris et le rat, par deux voies d'administration: voie orale et voie intrapéritéonale. (Traoré, 1999).

## **5 - 2 Matériel**

Nous avons travaillé sur des souris femelles OF1 (Oncins France Souche 1) de masse comprise entre 20 et 25 g, provenant de l'animalerie du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie ( CNAM ) à Djikoron Para. Les souris ont été préalablement mises à jeûn pendant 18 heures et sont reparties en 4lots de six, dont un lot témoin qui ne reçoit que de l'eau distillée.

## **5 - 3 Administration du produit**

Les voies d'administration sont au nombre de deux: la voie orale semblable à celle préconisée chez l'homme et la voie intra - péritonéale susceptible d'assurer la résorption rapide du produit. L'extrait est dissout dans l'eau distillée ( 0,025 ml pour la voie orale et 0,005 ml pour la voie IP. ).

Les différents animaux ont reçu les doses suivantes: 5000, 3330 et 2220 mg / kg de souris pour la voie orale et 500, 333 et 222 mg / kg de souris.

## **5 - 4 Suivre des animaux**

Après l'inoculation du produit, le comportement des animaux a été observé pendant 2 heures. Ils sont ensuite remis dans les cages et portés en animalerie où l'on observe la mortalité pendant 24 - 48 - 72 heures et après 14 jours.

## **Chapitre IV RESULTATS**

## Résultats

### 1 Extractions

#### 1 - 1 Décoctions

Le tableau suivant donne le rendement des différentes extractions effectuées sur la poudre des capitules de *Spilanthes oleracea*.

**Tableau N°V** Résultat des extractions aqueuses de *Spilanthes*.

Extraits	Masse Extraits (g)	Rendement %
10%	16,31	10,87
2%	1,60	26,66
1,2%	1,94	32,33

L'extrait obtenu était dense, sa couleur est brune sombre et sa saveur est très amère.

L'extraction à 1,2 % nous a donné le grand rendement avec plus de 32,33 % d'extraits aqueux lyophilisés par contre l'extrait à 2 % qui constitue la forme d'utilisation traditionnelle du Malarial 5 n'a donné que 26,66 %.

#### 1 - 2 Extraction des huiles essentielles

L'extraction d'huile essentielle de *Lippia chevalieri* nous a fournis un rendement de 0,2%.

## 2 Caractérisation

### 2 - 1 Les réactions en tubes

**Tableau N°VI** Présence de substances chimiques.

RECHERCHES		RESULTATS
Alcaloïdes	Base	+++
	Sel	+++
Flavonoïdes	Génines	++ jaune
	Hétérosides	++ jaune
Tanins	Réaction avec FeCl <sub>3</sub>	+++ bleu - noir
	Réaction avec HCl	+++ précipité rouge
	Catéchiques	+++ bleu - noir
	Galliques	+++ bleu - noir
Hétérosides cardiotoniques	Réactif de Keedde	+++ rouge-violacé
	Réactif de Baljet	+++ orangé
	Réactif de Raymond	+++ violet fugace
Coumarine	fluorescence (UV 366nm)	+++fluorescence intense
Stérols et triterpènes	Hétérosides-Stéroïdes	++++ vert
Composés réducteurs		++++ rouge-brique
Oses et holosides		++++ rouge
Mucilages		++++ flocons
Leuco-anthocyanes		++ rouge-cérise

9 groupes chimiques ont été détectés par le screening phytochimique. La drogue ne contient pas de dérivés anthracéniques mais une forte présence de composés réducteurs, des oses et holosides, d'hétérosides cardiotoniques et de mucilages.

### 2 - 2 Dosage des substances

## 2 - 2 - 1 Dosage de l'eau

### -Méthode pondérale

**Tableau N°VII** Teneur en eau de la poudre de capitules de *Spilanthes oleracea*

N°	Tare (g)	MT avant étuve (g)	MT après étuve (g)	Masse Drogue Essai (g)	Masse Eau (g)	% en eau
1	13,1413	14,6177	14,5223	1,4764	0,0954	6,4616
2	13,1853	14,6233	14,5363	1,4380	0,0870	6,0501
3	12,9251	14,2065	14,1314	1,2814	0,0751	5,8607
4	12,7973	14,6703	14,5521	1,8730	0,1182	6,3107
5	13,3663	14,7883	14,6943	1,4220	0,0940	6,6104

La teneur en Eau est donnée par:

$$\frac{6,4616 + 6,0501 + 5,8607 + 6,3107 + 6,6104}{5} = 6,25 \%$$

### -Méthode volumétrique

La teneur en eau est = 7 %.

## 2 - 2 - 2 Dosage des cendres

√ **Cendres totales Tableau N°VIII** Teneur en cendres totales de la poudre des capitules de *Spilanthes oleracea*.

N°	Tare (g)	MT avant calcination (g)	MT après calcination (g)	Masse Drogue Essai (g)	Masse Cendres (g)	% Cendres
1	28,8617	30,2403	29,0643	1,3786	0,2026	14,6960
2	24,1833	25,5253	24,3813	1,3420	0,1980	14,7540
3	17,1813	18,3843	17,3573	1,2030	0,1760	14,6300
4	16,9093	18,6697	17,1723	1,7604	0,2630	14,9397
5	17,5714	18,8983	17,7683	1,3269	0,11969	14,8390

La teneur est calculée selon la formule suivante:

$$F = \frac{14,6960 + 14,7540 + 14,6300 + 14,9397 + 14,8390}{5} = 14,77\%$$

**Tableau N<sup>o</sup>IX** Récapulatif des teneurs de certaines substances.

Substances		Pourcentage %
Eau	Méthode pondérale	6,25
	Méthode volumétrique	7
Alcaloïdes		0,23
Cendres	totales	14,77
	sulfuriques (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 50%)	16
	chlorhydriques (HCl à 10%)	25
Substances extractibles par l'eau		20

### **3 Dosage du spilanthol**

Le dosage a concerné des différentes méthodes à partir des capitules secs et frais.

**Tableau N<sup>o</sup>X** Récapulatif des teneurs en spilanthol

Méthodes	Rendement %	
	Capitules frais	Capitules secs
DMT	1,40	1,55
Extraction par l'éther diéthylique	1,20	10,10
Extraction au soxhlet par l'hexane	0,64	11,00
	0,77	11,83

Les capitules secs sont plus élevés en spilanthol que les capitules frais. La technique d'extraction au soxhlet par l'hexane nous a donné un rendement de 11, 83 % par les capitules secs et 0, 77 % des capitules frais. Une technique propre du DMT n'a donné que 1,55 et 1, 40 % respectivement les capitules secs et frais.

## **4 Chromatographie**

### **4 - 1 Chromatographie sur couche mince**

Les extraits aqueux de *Cassia*, *Lippia* et de Malarial ont été utilisés dans le but de différencier le Malarial du *Spilanthes oleracea*.

**Systèmes de solvants:** BAW (60: 15: 25 ),

CHCl<sub>3</sub>-MeOH- H<sub>2</sub>O ( 65:35:5 ).

**Dépôts:** 5 µl

**Révéléteur:** Réactif de Godin

Les Tableaux suivants donnent les références frontales des spots obtenus.

**Tableau N°XI** Résultat de Rf et des couleurs des extraits aqueux dans le système de solvant BAW à 366nm avant et après révélation au Godin.

Nature	Rf avant révélation	couleur avant révélation	Rf après révélation	couleur après révélation		
<i>Cassia occidentalis</i>	0,00	jaune	0,40	jaune		
	0,40	grise				
	0,46	grise				
	0,59	grise				
	0,68	verte				
	0,79	grise				
<i>Lippia chevalieri</i>	0,00	jaune	0,30	jaune		
	0,30	grise				
	0,41	bleue				
	0,50	bleue	0,50	verte		
	0,59	bleue	0,59	jaune		
	0,70	grise	0,80	verte		
	0,80	jaune				
<i>Spilanthes oleracea</i>	0,00	jaune	0,51	verte		
	0,31	grise				
	0,40	grise				
	0,51	bleue				
	0,69	bleue			0,69	jaune
	0,82	grise			0,79	verte
Malarial 5	0,00	jaune	0,41	jaune		
	0,38	grise				
	0,46	grise				
	0,58	grise	0,50	jaune		
	0,64	bleue	0,78	verte		
	0,78	bleue				

A 366nm, nous constatons que tous les extraits présentait le même nombre de spots et la majorité avait une coloration grise. La coloration jaune (Rf = 0,00) n'a pas migré.

**Tableau XII** Résultat CCM UV 366nm CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O

Nature	Rf avant révélation	Couleur avant révélation	Rf après révélation	couleur après révélation
<i>Cassia occidentalis</i>	0	jaune	0,31	jaune
	0,21	verte		
	0,62	jaune	0,55	jaune
	0,89	verte		
<i>Lippia chevalieri</i>	0,28	grise	0,44	jaune
	0,56	verte	0,56	verte
	0,92	bleue	0,92	verte
<i>Spilanthes oleracea</i>	0,00	bleue		
	0,25	jaune	0,42	jaune
	0,59	jaune	0,59 verte	
	0,89	bleue		
	0,95	jaune	0,95	verte
Malarial 5	0,00	jaune	0,45	jaune
	0,28	grise	0,55	jaune
	0,55	grise	0,61	jaune
	0,66	jaune	0,66	verte
	0,95	bleue	0,95	verte

A 366nm, l'extait de *Lippia chevalieri* présente moins de tâches que les autres.

A 254nm dans les deux systèmes de solvants, les spots apparaissent une coloration noire.

## Les huiles essentielles

**Tableau N°XIV** Résultat de Rf et de couleur des HE de *Lippia chevalieri* dans Ligroïne-ETOAc (2 : 1) après révélation au Godin .

Nature	Rf	Couleur
HE <i>Lippia chevalieri</i>	0,22	violette
	0,37	violette
	0,47	violette
	0,57	rouge
	0,70	violette
	0,73	violette

Après révélation la majorité des tâches apparaissent des couleurs violettes.

### **4 - 2 Chomatographie sur colonne**

La Chomatographie sur colonne nous a permis d'avoir quatre fractions avec un rendement:

$$\text{Rendement de l'extraction} = \frac{0,01 + 0,03 + 0,02 + 0,01}{4} \times 100 = 1,75 \%$$

### **5 Toxicité aiguë: dose létale 50 (DL<sub>50</sub>)**

Par la voie orale, il n'y a pas eu de mortalité jusqu'à la dose de 5000 mg / kg . Donc la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5000 mg / kg pour la voie orale. Mais aux 72 heures, il y'a eu une mortalité à la dose de 500mg / kg pour la voie intra-péritonéale. Le pourcentage de mortalité se situe à 16,66 % pour cette voie.

## **ANALYSES et DISCUSSIONS\_**

## Analyses et Discussions

A l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle, le paludisme reste l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité de l'enfant. Des progrès importants ont été enregistrés à la fin du siècle précédent dans la compréhension et la prise en charge des formes graves. Ces avancées se heurtent à des difficiles problèmes thérapeutiques liés à l'extension des chimio-résistances. Plus que jamais faire reculer le paludisme, un objectif prioritaire de l'OMS, repose sur plusieurs axes de lutte notamment l'utilisation des moustiquaires imprégnées et le développement de nouveaux traitements accessibles aux populations (Malvy, 2000). La phytothérapie, traitement des maladies par des plantes a, depuis quelques années quitté le stade de la médecine des tisanes pour devenir une méthode thérapeutique utile, équilibrée. Les plantes médicinales constituent un élément important dans la politique de notre pays. Telles sont quelques réalités qui nous obligent à améliorer et à utiliser efficacement nos ressources locales disponibles en grandes quantités et à peu de frais. Le DMT qui, de nos jours produit sept MTA dont fait partie le **MALARIAL5**.

Les études expérimentales réalisées par le DMT (Gasquet et coll., 1993) pour déterminer l'efficacité du Malarial 5 ont surtout porté, d'une part, sur des essais cliniques visant à comparer l'effet du Malarial 5 et de la chloroquine et, de l'autre, sur des expériences *in vitro et in vivo* destinées à mesurer l'efficacité du Malarial 5 et des plantes qui le composent. Ces études ont permis de démontrer les effets bénéfiques du Malarial 5 dans le traitement du paludisme et de prouver que l'activité antiparasitaire *in vitro* du Malarial 5 est surtout due à *Lippia chevalieri* et à *Spilanthes oleracea*. Ces études aboutissent aux mêmes conclusions : la quantité de *Spilanthes oleracea* présente actuellement dans le Malarial 5 n'est pas suffisante pour permettre une action schizonticide réellement efficace.

Il faudrait donc pouvoir augmenter la dose de *Spilanthes oleracea*. Cela s'avère difficile compte tenu de son goût piquant et âcre (picotements et engourdissement de la bouche) et surtout des propriétés anesthésiques locales du Spilanthol. Pour améliorer l'efficacité thérapeutique du Malarial 5 par augmentation de la quantité de *Spilanthes*, il y a donc lieu de changer de forme galénique en masquant ce goût, par exemple en proposant un extrait concentré sous forme de gélules.

Dans le cadre de nos travaux personnels nous avons effectué une série d'extractions aqueuses, puis confirmé la présence de certains constituants chimiques de la plante et de connaître sa teneur en eau, en cendres et en spilanthol.

Les différentes extractions aqueuses réalisées ont fourni des rendements de 10,87; 26,66 et 32,33 % respectivement des décoctés à 10; 2 et 1,2 %. La meilleure technique d'extraction semble être la décoction à 1,2% qui a donné le plus grand rendement. L'extraction d'HE nous a donné 0,2 % comme rendement.

Les essais préliminaires ont révélé:

La présence à des proportions variables des tanins, des flavonoïdes, des composés réducteurs, des oses et holosides, des alcaloïdes, des coumarines, et des mucilages; l'absence des dérivés anthracéniques, des saponosides et des hétérosides cyanogénétiques. La présence d'alcaloïdes a été confirmée par un dosage quantitatif qui a donné 0,23 %. Ceci est confirmé par les travaux de Greger (1985) qui a trouvé un taux de 0,13 % dans les racines, par contre une absence a été notée par Raszeja (1975) dans la partie aérienne de la plante. Cela peut s'expliquer par la différence de l'origine de l'organe à étudier.

La détermination de la teneur en eau par les méthodes pondérale et volumétrique nous a donné respectivement 6,25 et 7 %. Ces taux inférieurs à 10 % permettent une bonne conservation des matières végétales. Les cendres totales représentent 14 % dont  $\frac{1}{4}$  est insoluble dans l'acide chlorhydrique à 10 %. Cela se traduit par la présence d'éléments siliceux. La teneur en substances extractibles par l'eau environ 20 % explique la présence dans la drogue de beaucoup de substances hydrosolubles: les tanins, les flavonoïdes et les alcalamides comme le spilanthol.

Les composés terpéniques confèrent à la plante des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques et vermifuges. De nombreux flavonoïdes sont capables en raison de leur richesse en groupes phénols de se fixer sur certaines protéines en enzymes et modifier les équilibres enzymatiques.

Les tanins possèdent des propriétés astringentes et antidiarrhéiques. Ils sont aussi anti-inflammatoires dans les brûlures (Paris, 1965).

Les alcaloïdes possèdent des propriétés antiparasitaires, antispasmodiques et antidiarrhéiques. Ils ne peuvent conférer à la plante des propriétés antimicrobiennes qu'à des doses très élevées (Paris, 1965).

Les coumarines ont surtout la propriété vitaminique P. Les holosides possèdent les propriétés hémostatiques.

Les teneurs des capitules secs sont beaucoup plus élevées en spilanthol que les capitules frais. Cet état de fait peut s'expliquer par l'hydrosolubilité des principes actifs comme le spilanthol. Le meilleur rendement obtenu avec l'hexane confirme des études antérieures menées par Jellal et *al.* (1998 ) qui avaient trouvé par la technique de l'extraction au soxhlet par l'hexane des teneurs en spilanthol de 12, 02 et 11, 00 % respectivement pour l'échantillon 6, 24 et 7, 00 grammes.

Les méthodes d'extraction du spilanthol préconisées par les différents auteurs nous ont été utiles pour un contrôle de qualité des capitules de *Spilanthus oleracea*. Pour un contrôle de qualité de routine, il est nécessaire de le faire par rapport à un témoin pur. Ceci est très important pour mieux différencier le Malarial du *Spilanthus*, qui est une plante cultivée, donc difficile à trouver pour les productions.

Par la voie orale jusqu'aux doses de 5000 mg / kg nous n'avons observé aucune mortalité, donc la DL<sub>50</sub> est supérieure à 5 g/kg. Par contre pour la voie intra-péritonéale nous avons eu 16, 66 % de mortalité à la dose de 500 mg / kg.

Dhar et *coll.* ont montré que la dose minimum tolérée par voie intra-péritonéale chez la souris était de 100 mg / kg (Kerharo et Adams, 1974).

## **Conclusion**

## Conclusion

Notre étude sur *Spilanthes oleracea* s'est déroulée au laboratoire du Département Médecine Traditionnelle (DMT) de l'Institut National de la Recherche en Santé Publique (INRSP) courant 2001-2002.

Ainsi dans la perspective de la mise au point d'un médicament traditionnel à base de cette plante, il nous est apparu nécessaire d'approfondir les recherches sur sa composition chimique notamment la mise en évidence du principe actif: le spilanthol responsable de l'activité antipaludique. La revue de la littérature nous a permis dans un premier temps de collecter des informations sur le paludisme et les travaux antérieurs sur les données botaniques, chimiques, pharmacologiques et les utilisations en médecine traditionnelle. Les différentes extractions effectuées nous ont été utiles pour le choix d'une méthode de préparation de ce produit. Les éléments du contrôle de qualité identifiés ont été pour les capitules secs:

la teneur en eau est  $\leq 7 \%$

la teneur en cendres totales  $\geq 14 \%$  dont  $\frac{1}{4}$  est insoluble dans l'acide chlorhydrique à  $10 \%$ ;

La teneur en spilanthol  $\geq 11 \%$

la teneur en substances extractibles par l'eau environ  $20 \%$ .

La chromatographie sur couche mince effectuée nous a permis d'avoir des spots qui servent de référence. L'étude de la toxicité nous a permis de situer la  $DL_{50}$  supérieure à  $5.000 \text{ mg / kg}$  pour la voie orale, ce qui constitue la forme d'utilisation traditionnelle du produit. Au vue de ces résultats, d'autres études beaucoup plus approfondies seraient nécessaire au plan clinique et galénique avant de mettre à la disposition des populations des gélules à base de l'extrait de Malarial ou de *Spilanthes oleracea*.

Nous espérons par ce travail avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la médecine traditionnelle, car nous pensons qu'à long terme le spilanthol composera un médicament, aussi efficace contre le paludisme que la chloroquine.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOUGNOUX M.E., ANCELLE T. 1993.** Place de l'artéméthér parmi les dérivés de qinghaosu. *Cah.Santé*, Vol.3 no4 Juil-Août, PP308-313.
- BRUNETON J. 1987.** Elements de phytochimie et de pharmacognosie\_ Lavoisier éd. Paris, P 522. **BRUNETON J. 1993** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2 e éd. Paris, P.416.
- BRYSKIER A., LABRO M.T. 1988.** Paludisme et médicaments\_ Arnette éd., Paris n°3742 PP.276.
- CAMUS D., SLOMIANNY C., SAVEL J. 1997.** Biologie du *Plasmodium* Encycl. *Méd.Chir.*(Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, **8-507-A-10**, 7P.
- CARVALHO L.H., KRETTLE A.U. 1991.** Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Méd. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, **Vol. 86**, Supp.**11**, 181-184.
- DAMIS M., MOUCHET J., 1991.**Paludisme. Paris; Ellipses; N° **6672**, 240P. 26cm. Médicaments antipaludiques.
- DIALLO D., 2000** Ethnopharmacological survey of medicine plants in Mali and phytopharmaceutical study of four of thème: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Thèse de Doctorat, Fac.Sci. de Univ. de Lausanne.
- DIALLO D., BRITT HVEEM, MOHAMED AG MAHMOUD, GUMNVOR BERGE, BERIT SMESTAD PAULSEN AND ABOUBACAR MAIGA, 1999**  
An Ethnobotanical survey of drugs of Gourma District, Mali. *Pharmaceutical Biology*, **Vol. 37**, N°1, PP. 80-91.
- Doumbia S. L. 1997** Etudes des plantes réputées antipaludiques au Mali , These de Médecine, Faculté FMPOS. MALI (Bamako) 71p. N° **44**.
- EKONG R., PARTRIDJE S.J., ANDERSON M.M., KIRBY G.C., WARHUST D.C., RUSSELL P.F.,PHILLIPSON J.D. 1991.** *Plasmodium falciparum* = effect of phaenthine a naturally occuring bisbenzylisoquinoline alkaloid, on chloroquine resistant and sensitive parasites in vitro, and its influence on chloroquine activity. *Annals of Tropical Médecine Pharmacol.*, **Vol. 85**, N°2, PP. 205-213.

**GACHOT BERNARD, RINGWALD PASCAL 1998** Paludisme pernicioso. *La Revue du praticien*, 48, 273-278.

**GASQUET M., DELMAS F., TIMON DAVID P., KEITA A., GUINDO M., KOITA N., DIALLO D., DOUMBO O., 1993.** Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, *Malaria* 5. *Fitoterapia* **64** 5: 243.

**GENTILLINI M., ERIC CAUMES, BERNARD DUFLO et coll. 1993.** Médecine Tropicale. Médecine-Sciences 5e ed. Flammarion Paris 928P.

**GREGER HARALD, HOFER OTMAR, WERMER ANDREAS, 1985.** New amides from *Spilanthes oleracea*. *Inst. bot., Austria. Monatsh. Chem.*, 273-277.

**JACOBSON M., 1957.** The structure of spilanthol. *Chem. & Ind. (London)*, pp 50-51. 16.

**JELLAL A., LEMERRE S., MICHOT P., OGER R. RABILLER P., 1998** Le *Spilanthes* Projet de recherche ENESAD, UFITAFI 2<sup>ème</sup> année de Dijon – Promotion 1996 – 1999.

**IMBERT P., BANERJEE A., 2000.** Paludisme de l'enfant. *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, Paris), Pédiatrie, 4-320-A-20, maladies infectieuses, 8-507-A-30, 24 P.

**Kerharo, J. , Adams, 1974** , La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle : Plantes médicinales et toxiques , édition Vigot , 230 , 695

**Malgras, Denis 1992** Arbres et arbustes guérisseurs des savannes maliennes. Editions Karthala, Paris, pp

**MALVY D., DJOSSOU F., THIEBAUT R., LE BRAS M., 2000.** Plasmodies-Malaria. Formes cliniques- diagnostic. *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses, 8-507-A-20, 16P.

**NAGASHIMAM., NAKATANI N., 1992.** LC-MS analysis and structure determination of pungent alkaloids from *Spilanthes acmella* L. *Fac. sci. Living, Osaka City Univ., Osaka Japan. Food sci., Technol., (London)*, **25** (5), 417-421.

**NKUNYA M.H.H. 1992.** Progress in the search for antimalarials. Published by NAPRECA, Addis Ababa univ. P 35.

**OMS. 1998.** Aide Mémoire: Paludisme n°94.

**OMS. 2000.** Comité d'expert du paludisme **25ème** Rapport, Genève.

- Paris R. et Moÿse M.**, 1965 Précis de matière médicale, **13**, Masson édit. Paris pp<sub>450</sub>
- PELLETIER P., CAVENTOU J. 1820.** Recherches phytochimiques sur les *Quinquinas*. *Ann. Chim. Phys.*, **15**, PP289-318 et 337-367.
- PHILLIPSON J.D., WRIGHT W.C. 1991.** Antiprotozoal agents from plant sources. *PLanta Méd.* **57**, 53-59.
- SHIMIDA TOSTA, GOMI TETSUO, 1995.** Spilanthol-rich essential oils for manufacturing toothpastes or other oral compositions. *Jnp. Kokai tokkyo koho*, 6PP.
- RATSIMAMANGA-URVERG S., RASOANAIVO P., RAMIARAMANANA L., et al. 1991.** *In Vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermum penduliflorum*. *Planta Méd* **1**, P4.
- RICHARD A. 1996** *Spilanthos* [http//b-and-t-world-seeds. Com / horizon.htm](http://b-and-t-world-seeds.Com/horizon.htm).
- TOUZE JEAN-ETIENNE, HENO PHILIPPE, FOUCARDE LAURENT N'GUYEN HAI 1998.** Accès palustre simple. *La Révue du praticien*, **48**, 268-272.
- TRAORE FANTA 1999.** Evaluation de l'activité antimalarique de *Glinus oppositifoluis* (L).A.D.C., *Nauclea latifolia* (SM)., *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Kuntze, trois plantes utilisées en médecine traditionnelle au Mali. Thèse de Doctorat Univ. Médit. Aix Marseille PP199.
- WRIGHT W.C., BRAY H.D., O'NEIL J.M., WARHUST D.C., et al., 1991.** Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usembarensis*. *Panta Méd.* **57**, 337-340.
- YE Z.G., VAN DUKE K. 1989.** Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquino-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biomedical and biophysical research communication*. **Vol. 159, N°1**, 242-248.

## ANNEXES 1

### Composition des réactifs:

→Liquueur de Fehling:

#### Réactif à chaud

##### Solution A

CUSO<sub>4</sub> .....35 g

Eau distillée .....500 cc contenant 5 cc d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Laisser refroidir puis compléter au litre avec l'eau distillée

##### Solution B

Sel de Seignette .....150 g

Eau distillée .....500 cc

Refroidir puis ajouter 300 cc de lessive de soude non carbonaté, compléter au litre avec l'eau distillée.

**NB:** mélanger les 2 solutions à volume égal au moment de l'emploi

→Réactif de Baljet:

Acide picrique .....1 g

Ethanol 50° qsp ....100 cc

→Réactif de Dragendorff:

Nitrate de Bismuth pulvérisé .....20,80 g

Iode .....38,10 g

Iodure de sodium anhydre .....200 g

Eau distillée .....600 cc

Agiter pendant 30 mn

→ Réactif de Godin:

##### Solution A

Vanilline 1 g + 1000 ml d'éthanol

##### Solution B

Acide perchlorique 3 cc + eau distillée 100 c c

Mélanger les 2 solutions au moment de l'emploi

Ensuite pulvériser les plaques avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %

**→Réactif de Guignard:**

préparation papier picrosodé

Acide picrique .....1 g

Carbonate de sodium ...10 g

Eau distillée .....100 cc

**→Réactif de Keede:**

Acide dinitro 3-5 benzoïque .....1 g

Ethanol 96° qsp .....100 cc

**→Réactif de Raymond Marthoud:**

1-3 m dinitrobenzène .....1 g

Ethanol 96° qsp .....100 cc

**→Réactif de Valsér - Meyer**

Iodure de potassium .....25 g

Chlorure mercurique .....6,77 g

Eau distillée .....250 cc

## ANNEXES 2

### MATERIELS TECHNIQUES

#### Extraction

Ballons

Balance analytique de précision de type SAUTER

Bain - Marie

Coton Entonnoir

Lyophilisateur Heto- Drywinner, Model DW 1,0 - 60<sup>E</sup>

Flacons

Papier filtre

Rotavapor BUCHI R- 200

#### Dosage du spilanthol

##### Pour la percolation

Une ampoule à décanter

un erlenmeyer de 250 ml

##### Pour l'extraction du spilantol

Un appareil de soxhlet

un ballon à distiller

des cartouches en papier filtre

un chauffe ballon

Une colonne de vigreux

coton de verre

système réfrigérant

##### Pour l'extraction du solvant

Bain- Marie thermostaté

Rotavapor BUCHI R- 200

#### CCM

Pipette pasteur

Plaque de silicagel G<sub>60</sub> F<sub>254</sub>

Règle graduée

Les Révélateurs

Séchoir

UV 3666 et 254 nm

### **Toxicité**

Balance analytique de type SAUTER pour la pesée des poudres

Balance électronique de type SARTORIUS pour peser les souris

Cages

Seringue à insuline de 1 ml facilitant l'administration par voie IP

Seringue en verre pour la voie orale

# **RESUME**

Nom: DIARRA

Prénom: Makan Négué

Titre de la thèse: Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali:

*Spilanthus oleracea* Jacq.

Année: 2002 - 2003

Ville de soutenance: Bamako

Pays d'origine: Mali

Lieu de Dépôt: Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS), Bamako- Mali.

Secteur d'intérêt: Médecine traditionnelle.

**RESUME:** Notre travail est une contribution à l'étude phytochimique d'une plante utilisée dans le traitement du paludisme. Nous avons effectué des recherches phytochimiques sur les capitules de *Spilanthus oleracea* Jacq. Cette étude nous a permis de procéder à une technique d'extraction et de contrôle de qualité. Nous avons réalisé une étude de toxicité qui nous a montré que la DL<sub>50</sub> était supérieur à 5000 mg / kg de masse corporelle de souris.

**Mots clés:** *Spilanthus oleracea* Jacq. Extractions aqueuses, Spilanthol