



FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2008 – 2009



THÈSE

N° ...

ÉTUDE DE LA PHYTOCHIMIE ET DES ACTIVITÉS LARVICIDE, ANTICHOLINESTERASIQUE ET ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE QUATRE PLANTES DU MALI : *Acacia nilotica* Guill. et Perr. (Mimosaceae), *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (Asclepiadaceae), *Euphorbia sudanica* A. Chev (Euphorbiaceae) ET *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae).

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10 MARS 2009 À LA
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE PAR :

M. DAHAFOLO KONE

POUR OBTENIR LE GRADE DE **DOCTEUR EN PHARMACIE**
(DIPLÔME D'ÉTAT)

JURY

PRÉSIDENT :	PR. BOUBACAR S. CISSE
MEMBRE :	DR. SEKOU BAH
CO-DIRECTEUR :	PR. DRISSA DIALLO
DIRECTEUR :	PR. ABABACAR I. MAÏGA

Table des matières

DEDICACES	IX
REMERCIEMENTS	XIII
MENTION SPECIALE.....	XV
HOMMAGES AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY	XVI
SIGLES ET ABREVIATIONS.....	XIX
LISTE DES TABLEAUX	XXI
LISTE DES FIGURES	XXII
INTRODUCTION	1
PARTIE 1: GENERALITES	5
I) RAPPEL SUR LE PALUDISME	6
1) <i>Le vecteur</i>	6
2) <i>Le parasite</i>	8
II) RAPPEL SUR LES INSECTICIDES	10
1) <i>Description des insecticides</i>	10
2) <i>Classification des insecticides</i>	10
3) <i>Les analogues des hormones d'insectes</i>	13
III) RAPPEL SUR LES METHODES DE LUTTE ANTI-VECTORIELLE DANS LE CONTROLE DU PALUDISME	13
1) <i>Lutte biologique</i>	13
2) <i>Lutte chimique</i>	14
3) <i>Lutte génétique</i>	14
4) <i>Lutte mécanique</i>	14
5) <i>Lutte physique</i>	14
IV) RAPPEL SUR LES RÉSISTANCES.....	15
V) RAPPEL SUR QUELQUES SUBSTANCES A ACTIVITE LARVICIDE	16
1) <i>Nicotinoïdes</i>	16
2) <i>Conchosine A et Conchosine B</i>	16
3) <i>Glaucolide A</i>	16
4) <i>Hymendine</i>	16
VI) RAPPEL SUR LE SYSTEME CHOLINERGIQUE	17
1) <i>Les parasymphomimétiques indirects</i>	18
2.1) <i>Quelques structures chimiques d'anticholinestérasiques</i>	19
VII) RAPPEL SUR LES ANTIOXYDANTS.....	20
1) <i>Réactions d'oxydoréduction</i>	20
2) <i>L'oxydation</i>	20
3) <i>Les radicaux libres</i>	20
3.1) <i>Origines</i>	20

3.2) Rôles des radicaux libres	21
4) Les antioxydants	22
4.1) Définition.....	22
4.2) Les différents types d'antioxydants.....	22
4.3) Méthodes d'étude des antioxydants.....	24
VIII) MONOGRAPHIES DES PLANTES	25
1) <i>Acacia nilotica</i> var. <i>adansonii</i> (Guill. et Perr.) O. Ktze	25
1.1) Systématique.....	25
1.2) Description botanique.....	25
1.3) Habitat et répartition géographique	25
1.4) Usages.....	26
1.5) Chimie	28
1.6) Activités biologiques	29
2) <i>Calotropis procera</i> (Ait.) Ait.f.	29
2.1) Systématique	29
2.2) Description botanique.....	30
2.3) Habitat et répartition géographique.....	31
2.4) Usages.....	31
2.5) Chimie.....	32
2.6) Activités biologiques	32
3) <i>Euphorbia sudanica</i> A.Chev.....	32
3.1) Systématique.....	32
3.2) Description botanique.....	33
3.3) Habitat et répartition géographique	33
3.4) Usages.....	34
3.5) Chimie.....	34
3.6) Activités biologiques	34
4) <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	34
4.1) Systématique.....	34
4.2) Description botanique.....	35
4.3) Habitat et répartition géographique	35
4.4) Usages.....	35
4.5) Chimie.....	37
4.6) Activités biologiques	37
PARTIE 2: METHODOLOGIE	38
I) MATERIEL	39
1) Lieu d'étude.....	39
2) Matériel végétal	39
2.1) Préparation des poudres	39
2.2) Préparation des différents extraits.....	40
3) Matériel et réactifs pour l'étude phytochimique.....	42
4) Matériel pour l'activité larvicide	43

5) Matériel pour l'activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase	44
6) Matériel pour l'activité antioxydante.....	45
II) METHODES D'ETUDES	46
1) Etudes phytochimiques.....	46
1.1) Dosage de certaines substances.....	46
1.2) Calcul de rendement des extraits.....	50
1.3) Réactions en tube: caractérisation des groupes chimiques	50
1.4) Chromatographie sur couche mince (CCM)	56
2) Détermination de l'activité larvicide.....	57
3) Détermination de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase	59
4) Détermination de l'activité antioxydante	60
PARTIE 3: RESULTATS.....	61
I) TENEURS DE CERTAINES SUBSTANCES DOSEES	62
II) EXTRACTIONS.....	62
III) REACTIONS DE CARACTERISATIONS.....	63
1) Les réactions en tube.....	63
2) Chromatographie sur couche mince	63
IV) ACTIVITE LARVICIDE	73
V) DETERMINATION DES CL ₅₀	75
1) <i>Acacia nilotica</i>	75
2) <i>Calotropis procera</i>	75
3) <i>Euphorbia sudanica</i>	76
4) <i>Hyptis suaveolens</i>	77
VI) ACTIVITE INHIBITRICE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE	78
VII) ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	81
VIII) ANALYSES ET DISCUSSION.....	83
CONCLUSION.....	91
REFERENCES.....	XXII
FICHE SIGNALETIQUE	XXXI
RESUME	XXXII

DEDICACES

Je Dédie Ce Travail à :

ALLAH

« Au nom de Dieu Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Louange à Dieu, Seigneur de l'univers. Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Maître du Jour de la Rétribution.

C'est Toi (seul) que nous adorons et c'est Toi (seul) dont nous implorons secours. Guide-nous dans le droit chemin. Le chemin de ceux que Tu as comblés de bienfaits, non pas de ceux qui ont encouru Ta colère, ni des égarés.»

Mon Dieu la grâce infinie est à Toi qui m'as permis d'arriver à ce stade. Ne m'oublie pas pour le reste afin que ma vie aie tout son sens car Tu nous as créés dans le seul but de T'adorer.

Reprends, ô mon Dieu, Ta grâce infinie, Ta miséricorde incalculable, Ta clémence inestimable sur l'humanité pour éradiquer le paludisme.

Amine !

Mon père FATIAGA KONE

Papa, tu nous as inculqué le sens du travail bien fait, de l'honneur, de la dignité, de la rigueur, du courage, de la persévérance et surtout du respect de soi et d'autrui.

Tu nous as toujours assisté dans les épreuves difficiles, tu n'as ménagé aucun effort pour que nous accédions à une instruction meilleure.

Tu ne t'es jamais lassé de nous dire ceci « maintenant est le moment où l'on est maître de faire aussi bien que possible ce que l'on veut de manière à être libre avec sa conscience ».

Cher PERE, saches que tu as toujours fait notre fierté.

Puisse ce travail soit une grande satisfaction pour toi, l'accomplissement d'une mission du bordereau de devoirs que tu as assignés à tes enfants.

Papa, nous avons infiniment besoin de tes bénédictions pour atteindre tous nos objectifs qui sont aussi les tiens.

Puisse Dieu t'accorder une bonne santé et longue vie (Amine).

Ma mère DIENIMBOU FOFANA

Attentive, modeste, généreuse, Maman par Amour pour nous, tu as enduré l'inacceptable, tu as sacrifié l'inséparable, tu as compris l'inimaginable, tu as incarné la sérénité là où le trouble régnait, tu as passé des nuits blanches à prier et nous bénir quand le repos était impérieux. Maman, par mon biais, tous tes enfants te disent merci en sachant que nous ne pourrons jamais assez te remercier. Aujourd'hui, Maman, nous souhaitons que tu sois comblée de joie.

Une bataille est gagnée certes, mais tes bénédictions sont encore indispensables pour gagner la lutte.

Que dieu te prête longue vie parmi nous dans la santé parfaite (Amine).

Je t'aime MAMAN.

FOFANA NAHON AMADOU

Sois fier Bâhâ car l'homme que je suis aujourd'hui, tu en es le principal formateur. Ce travail est d'abord le tien et le diplôme te revient en premier lieu. Puisse ALLAH te permettre de bénéficier des retombées de ce succès autant que tu voudras (Amine).

Feue MAMAN RODRIGUE MICHELLE MARCEL

Sois animée par des sentiments de joie et de satisfaction immenses par ce travail qui te fait aussi honneur. Saches que tu restes gravée dans nos cœurs et ta place demeure indélébile en nous. Nous te prions de bien vouloir nous assister inlassablement avec tout l'amour qui te caractérise dans l'accomplissement de la

mission que nous nous sommes confiée. L'énormité de la fondation plaide la participation de tous et tu occupes l'un des premiers rangs. MAMAN, THERESE et MOI t'aimons et t'aimerons éternellement. Prière ALLAH te faire bénéficiaire de SA GRACE DIVINE afin que TON AME repose en paix à l'au-delà.

Mes frères et soeurs

J'espère que malgré le temps que m'a pris la préparation de cette thèse, j'ai su vous donner l'attention que vous méritez. Que ce travail vous serve d'exemple.

Je souhaite plein succès à tous dans toutes vos entreprises.

Mes grands-pères : feus KONE FABAMA et KONIBA PLEAH

« Promesse tenue, promesse due ». Soyez comblés de joie car l'un de vos désirs a été atteint. De là haut bénissez-moi afin que le reste du chemin me soit très praticable.





Que le Miséricordieux vous pardonne et vous gratifie de sa bonté inestimable à l'au-delà.

Mes grands-mères : feues FOFANA KARIDIA, KONE FOPANHOUAN et KADIDIATOU BALDE

Vous qui m'avez adopté de ma tendre enfance jusqu'à vos derniers souffles, sachez que cela n'a pas été fortuit car l'un de vos soucis vient de s'estomper. Ce travail est avant tout le vôtre. Je vous aime et que ALLAH LE TOUT PUISSANT vous pardonne et vous gratifie de sa bonté inestimable à l'au-delà.

TRES SENTIMENTALEMENT A MON AMOUR : KONE FATOUMATA THERESE

Par ALLAH :

-  Nous nous sommes très sincèrement aimés
-  Nous nous sommes acceptés
-  Nous nous sommes réunis
-  Nous formons une famille

- ✚ Nous surmonterons les obstacles ensemble
- ✚ Nous vivrons éternellement l'AMOUR VRAI
- ✚ Nous sommes unis pour le meilleur et le pire

Que ALLAH soit L'UNIQUE GUIDE de notre union afin que nous jouissions de SA CLEMENCE, SES BENEDICTIONS et SA PROTECTION (AMINA).

IN'CHALLAH je serai à la hauteur de ton attendement.

JE T'AIME et JE T'AIMERAI ETERNELLEMENT.

REMERCIEMENTS

- ✎ Au grand-père TOURE Bazoumana et la grand-mère COULIBALY Mahata ainsi qu'à toute la famille TOURE à Korhogo. Au-delà du statut de tuteurs, vous avez été et vous demeurerez des parents pour moi. Puisse ALLAH vous récompenser pour tout ce que vous avez fait pour moi.
- ✎ A toute l'équipe du MRTC/DEAP/FMPOS.
- ✎ Aux aînés Dr Mory MARIKO et Bréhima DIAKITE pour leur contribution franche et sans réserve à la réalisation des tests biologiques.
- ✎ Au Dr DEIDIA Mahamane KATTRA pour sa modestie et son sens élevé d'écoute et de compréhension de son prochain.
- ✎ A tout le personnel de la Pharmacie « LES HIRONDELLES » pour l'ambiance familiale et l'entraide mutuelle qui prévalent.
- ✎ A mon Père Cheick Abdoul PLEAH.
- ✎ **Aux familles** Diarra et Coulibaly à Kalabancoro, Dembélé à Kati.
- ✎ **A mon amie** Dr MARIKO Aïcha, l'amitié vraie nous la vivons. Puisse ALLAH renforcer davantage nos liens et qu'IL demeure notre Guide éternel.
- ✎ **A mes camarades de promotion internes au DMT :** DIARRASSOUBA Mamadou Lamine, DAGNOKO Saly, Dr Philipe TRAORE, Esther COULIBALY, Dr Caleb GUIROU, Ouassa DEMBELE.
- ✎ **A mes cadets internes du DMT :** beaucoup de courage et tenez bon.
- ✎ **A mes maîtres depuis le primaire jusqu'à la FMPOS :** on ne peut avoir les mots propices pour récompenser celui qui nous a transmis ses connaissances mais permettez moi de vous dire infiniment merci et soyez tous fiers de ce travail car c'est le fruit de vos efforts consentis à mon apprentissage. Que DIEU vous en soit reconnaissant.
- ✎ **A mes camarades de promotion numerus clausus de la FMPOS :** pour ces années de travail, pour tous les moments de joie et de peine passés ensemble. Puisse le Seigneur nous permettre d'œuvrer pour la paix, la santé et le développement dans nos différents pays et dans le monde.

✂ **A tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail.**

✂ **A tous ceux qui seront frustrés quand ils ne verront pas leurs noms. Ce travail est aussi le vôtre.**

MENTION SPECIALE

- ✂ A Maman Aïssata et Papa Babany PLEAH. Vous qui n'avez jamais failli à votre rôle de parents, je vous suis reconnaissant. Que ALLAH vous donne longue vie et vous récompense pour tous vos bienfaits. Ce travail est aussi le vôtre.
- ✂ Au couple DOUMBIA à Paris. Que DIEU veille sur vous.
- ✂ A Mme DICKO Maïmouna SOUMARE pour son engagement sans réserve à la réalisation de ce travail. Tu as été en amont et en aval de cet ouvrage. Je ne peux trouver les mots adéquats pour te remercier. Puisse ce document te combler de joie.
- ✂ A Mme DIAWARA Mariam KEBE pour son plein engagement en faveur de ma réussite et son sens sociable inestimable. Puisse ALLAH te prêter longue vie en parfaite santé et renforce davantage nos liens. Merci TANTE.
- ✂ Au Dr Zantigui KEITA qui n'a cessé de m'encadrer depuis mon entrée à la FMPOS. Aujourd'hui, je souhaite que tu sois fier de ce travail.
- ✂ Au Pr Rokia SANOGO pour ses critiques et conseils ainsi que son apport matériel à la bonne réalisation de ce travail. Au delà du cadre didactique, tu es une mère pour moi. Puisse encore bénéficier de tes connaissances en travaillant à tes côtés.
- ✂ Au Dr Chaka DIAKITE pour son soutien moral et sa disponibilité inconditionnée. Ton sens d'écoute et ta volonté de satisfaire autrui te caractérisent. Ton apport m'est toujours nécessaire pour réussir.
- ✂ Au Dr Adjaratou TOGOLA pour sa pleine collaboration et son dévouement pour le travail bien fait. Former une équipe de travail avec toi est un souhait. Grand sœur, prière bien m'accepter.
- ✂ Au personnel du Département de Médecine Traditionnelle (DMT) de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) :
- ✂ Aux familles PLEAH à Bamako, Kati, Mopti, Djénné
- ✂ A tonton Fagna Sanogo, tanti Tapa
- ✂ L'équipe de production : Mr Camara Adama, l'Imam Fousséiny Koné,
- ✂ Aux agents comptables : Mme Diarra Fatoumata, Mme Saoulata Mahane Maiga
- ✂ Aux Secrétaires : Rokia Sylla, Kadi, Aissata.
- ✂ Aux techniciens forestiers N'Golo et Oueleguem.
- ✂ Aux gardiens du DMT.

HOMMAGES AUX HONORABLES MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAÎTRE ET PRESIDENT DE JURY, Professeur

Boubacar Sidiki CISSE

Professeur honoraire de toxicologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Ancien Recteur de l'Université du Mali,

Correspondant Membre Etranger de l'Académie de Pharmacie de France,

Chévalier de l'ordre National.

Honorable maître, vous nous faites ce jour, un honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Votre grande sagesse, vos qualités humaines, sociales et scientifiques font de vous un éminent homme de science respecté de tous.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect.

A NOTRE MAÎTRE ET CO-DIRECTEUR, Professeur

Drissa DIALLO

Professeur agrégé en Pharmacognosie,

Chef du Département de la Médecine Traditionnelle de l'INRSP,

**Premier assesseur de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie
(FMPOS)**

**Responsable de l'enseignement de la Pharmacognosie et de la Phytothérapie à la faculté
de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**

Cher maître, vous nous faites en ce jour un grand honneur en acceptant de diriger cette thèse malgré vos multiples occupations.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement de qualité incontestable dans cette faculté.

Votre simplicité, votre humeur joviale, vos qualités pédagogiques et scientifiques font de vous un maître hors du commun et respecté de tous.

Cher maître, suivre vos traces en assurant la bonne continuation de votre mission est un désir ardent. Puisse beaucoup bénéficier encore de votre savoir-être et de votre savoir-faire.

Veillez croire cher maître à l'expression de notre profonde admiration.

A NOTRE MAÎTRE ET MEMBRE DU JURY, Docteur

Sékou BAH

**Docteur en Pharmacologie,
Maître assistant en Pharmacologie à la FMPOS,
Chargé des cours de Pharmacologie à la FMPOS,
Pharmacologue à la pharmacie du CHU du Point G,
Spécialiste en santé communautaire Internationale.**

Cher maître, merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Vous nous avez impressionnés par votre constante disponibilité, votre modestie et votre souci pour le travail bien fait

Nous vous prions d'agréer, cher maître, l'expression de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

A NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THESE, Professeur

Ababacar I. MAÏGA

**Maître de conférences en toxicologie,
Chargé de l'enseignement de la toxicologie à la FMPOS,
Directeur adjoint de la Direction de la Pharmacie et du Médicament,**

La qualité exceptionnelle de votre enseignement nous a beaucoup marqué.

Vous avez su nous montrer l'exemple par votre modestie, votre rigueur dans le travail et votre souci du travail bien fait.

Encadrer n'est pas une tâche facile, cher professeur ;

Lorsqu'on sait qu'il faut gérer talents et faiblesses.

Nous avons, avec intérêt, apprécié votre rigueur

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail.

Veillez recevoir ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

SIGLES ET ABREVIATIONS

μ

μg

Microgramme · 30, 74, 75, 77, 79, 86, 87, 88

μm

Micromètre · 8, 9

A

ADN

Acide DésoxyriboNucléique · 9, 22

ATCI

Acétylthiocholine iodide · 45, 60

C

CCM

Chromatographie sur couche mince · 25, 45, 57, 58, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 80, 92, XXXII

D

D M T

Département de la Médecine Traditionnelle · 40

DCM

Dichlorométhane · 61, 66, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 81, 83

DDT

Diphenyl-Dichloro-Trichloroéthane · 10, 11, 12, 16

CL50

Concentration Létale 50 · 11, 12, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 88, XXXII

DMSO

Diméthylsulfoxyde · 44, 45, 59, 61

DTNB

Acide Dinitrobenzoïque · 45, 60

E

EtOH

Ethanol · 77, 78, 86

F

FMPOS

Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie · XII, XIV, XVI, XVII, 40, XXXI

G

g

Gramme · 41, 48, 51, 55, 56, 57, 60

G.R.I.P.T

Groupe de Recherche et d'Information sur la Pharmacopée et l'environnement Tropical · 32

H

HCH

Hexachlorocyclohexane · 11

HCl

Acide Chlorhydrique · 45, 52, 53

HIV

Virus Immuno-déficient Humain · 30, XXVI

I

INRSP

L'Institut National de Recherche en Santé Publique · XIV, XVI, 40, 93

K

kg

Kilogramme · 11, 12

L

LASU

Campus of Lagos State University · 38, 85

M

MeOH

Méthanol · 61, 68, 74, 75, 76, 77, 78, 81, 82, 83, 86

mg

Milligramme · 11, 12, 25, 46, 58, 59, 61, 86, 87, 88

mL

Millilitre · 30, 41, 44, 46, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 88

mn

Minute · 43, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 74, 75

MRTC

Malaria Research and Training Center · XII, 40, 44

O

OAU

Obafémi Awolowo University · 38

OMS

Organisation Mondiale de la Santé · 1, 2, 10,
12, 59, XXV, XXVII

P

PNLP

Programme National de Lutte contre le
Paludisme · 1, 2, XXVIII

S

SN

Système Nerveux · 15

SNA

Système Nerveux Autonome · 18

SNC

Système Nerveux Central · 18

U

UV

Ultra-violet · 25, 44, 45, 57, 58

V

Vit

Vitamine · 45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Récapitulatif des concentrations et des volumes d'essai	45
Tableau 2: Teneurs (en %) de certaines substances dosées dans les poudres des parties utilisées des différentes plantes	62
Tableau 3: Caractéristiques des extraits des différentes plantes étudiées.....	62
Tableau 4: Groupes chimiques caractérisés dans les poudres des différentes plantes	63
Tableau 5: Facteurs de rétention des substances des extraits ayant réagi avec l' $AlCl_3$ après migration dans le B:A:W (60:15:25)	64
Tableau 6: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits DCM ayant réagi avec l' $AlCl_3$ après migration dans le système de solvants Ligroïne:Acétate d'éthyle (1:1) :	65
Tableau 7: Extraits de Ether de pétrole ayant réagi avec l' $AlCl_3$ après migration dans le système de solvant Ligroïne:Acétate d'éthyle (2:1)	67
Tableau 8: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits avant et après révélation par le Godin après migration dans le B:A:W (60:15:25) :	68
Tableau 9: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits DCM ayant réagi avec le Godin après migration dans le système de solvants Ligroïne-Acétate d'éthyle (1-1) :	70
Tableau 10: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits Ether de pétrole ayant réagi avec le Godin après migration dans le système de solvants Ligroïne:Acétate d'éthyle (2:1) :	72
Tableau 11: Taux de mortalité (en %) des larves de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> après exposition au décocté de <i>Acacia nilotica</i>	73
Tableau 12: Taux de mortalité (en %) des larves de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> après exposition aux extraits organiques de <i>Acacia nilotica</i>	73
Tableau 13: Taux de mortalité (en %) des larves de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> après exposition aux extraits organiques de <i>Calotropis procera</i>	73
Tableau 14: Taux de mortalité (en %) des larves de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> après exposition aux extraits organiques de <i>Euphorbia sudanica</i>	74
Tableau 15: Taux de mortalité (en %) des larves de <i>Anopheles gambiae s.l.</i> après exposition aux extraits de <i>Hyptis suaveolens</i>	74
Tableau 16: Activité larvicide (en % et CL_{50}) de l'extrait DCM de <i>Acacia nilotica</i>	75
Tableau 17: Activité larvicide (en % et CL_{50}) des extraits de <i>Calotropis procera</i>	75
Tableau 18: Activité larvicide (en % et CL_{50}) des extraits de <i>Euphorbia sudanica</i>	76
Tableau 19: Activité larvicide des extraits de <i>Hyptis suaveolens</i>	77
Tableau 20: Récapitulatif des CL_{50} de l'activité larvicide des différents extraits des plantes	77

LISTE DES FIGURES

Fig.1: Photos des fruits de <i>Acacia nilotica</i>	25
Fig.2: Photos de <i>Calotropis procera</i>	30
Fig.3: Photo de <i>Euphorbia sudanica</i>	33
Fig.4: Photos de <i>Hyptis suaveolens</i>	34
Fig.5: Schéma d'extraction par les solvants à polarité croissante	41
Fig.6: Schéma de l'extraction par la décoction	42
Fig.7: Plaque CCM révélée par l' $AlCl_3$	64
Fig.8: Plaque CCM des extraits DCM révélée par l' $AlCl_3$	65
Fig.9: Plaque CCM des extraits Ether de pétrole révélée par l' $AlCl_3$	66
Fig.10: Plaque CCM des extraits MeOH et Décocté révélée par le Godin	67
Fig.11: Plaque CCM des extraits DCM révélée par le Godin.....	69
Fig.12: Plaque CCM des extraits Ether de pétrole révélée par le Godin.....	71
Fig.13: Relation concentration-activité larvicide de l'extrait DCM.....	75
Fig.14: Relation concentration-activité larvicide des extraits DCM, et EtOH 70 % de <i>Calotropis procera</i>	76
Fig.15: Relation concentration-activité larvicide des extraits Ether de pétrole, MeOH de <i>Euphorbia sudanica</i>	76
Fig.16: Relation concentration-activité larvicide de l'extrait Ether de pétrole de <i>Hyptis suaveolens</i>	77
Fig.17: Graphique des DL 50 des différents extraits des plantes.....	78
Fig.18: Extraits d'Ether de Pétrole	79
Fig.19: Extraits DCM.....	80
Fig.20: Extraits MeOH	80
Fig.21: Activité antioxydante des extraits MeOH et Décocté des quatre plantes	81

INTRODUCTION

Les moustiques sont les vecteurs de certaines maladies telles que la dengue hémorragique, la fièvre jaune et le paludisme. Parmi celles-ci, le paludisme se caractérise par son aspect fatal pour la population humaine avec un taux de mortalité élevé (OMS, 1995). En effet, le paludisme (du mot latin palus ou paludis = marais) appelé aussi malaria (de l'italien mal'aria = mauvais air) est une érythrocytopathie fébrile et hémolysante due à un protozoaire transmis lors de la piqûre d'un moustique femelle, l'anophèle (genre *Anopheles*), provoquant des fièvres intermittentes. Quatre espèces plasmodiales sont responsables du paludisme: *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* et *P.malariae*.

Au Mali, environ 95% des cas de paludisme sont dus à *P.falciparum* (Doumbia, 1989) et les principaux vecteurs du paludisme sont *Anopheles gambiae s.l* et *Anopheles funestus* (Touré, 1979).

Avec 300 à 500 millions de malades et 1,5 à 2,7 millions de décès par an, le paludisme demeure la parasitose tropicale la plus importante. 80 % des cas sont enregistrés en Afrique Sub-saharienne où ils concernent majoritairement les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes (OMS, 2005).

Au Mali particulièrement, 36 % des cas de fièvre sont d'origine palustre chez les enfants de moins de 10 ans pendant la saison des pluies; le paludisme étant la première cause de mortalité et de morbidité avec des taux respectifs de 26,13 % et 27,16 % (PNLP-Mali 2004).

Pour lutter contre ce fléau, l'OMS a mis en place plusieurs stratégies dont la lutte antivectorielle sélective et durable (OMS, 1993) par l'utilisation générale des matériaux imprégnés d'insecticides telles que les moustiquaires imprégnées (OMS, 1993). L'usage abusif de ces insecticides a provoqué l'apparition de résistance des vecteurs cibles (*Anopheles gambiae s.l* et *Anopheles funestus*). Ainsi en Côte d'Ivoire (Elissa et coll., 2000), au Bénin (Akégbeto et coll., 1999) et au Cameroun (Etong et coll., 2000) des tests de sensibilité réalisés ont permis de déterminer la résistance des moustiques à la perméthrine parmi les populations d'anophèle.

Confrontée à l'expansion de la résistance aux insecticides, l'OMS a proposé de nouvelles stratégies basées sur quatre approches techniques (OMS, 1994) à savoir:

- le diagnostic précoce et le traitement rapide des cas de fièvres;
- la planification et la mise en œuvre des mesures de prévention sélective et durable y compris la lutte antivectorielle;
- la détection précoce, l'endiguement ou la prévention des épidémies;
- la prise en charge des cas de paludisme par l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) ;
- le renforcement des capacités locales en matière de recherche fondamentale et appliquée pour permettre et favoriser une évaluation régulière de la situation du paludisme dans les différents pays.

Alors que d'une part le Mali par le PNL (Programme National de Lutte contre le Paludisme) a adopté la stratégie de l'OMS préconisant l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides et d'autre part que ces vecteurs adultes (moustiques) devenaient de plus en plus résistants à ces insecticides, il devient donc important voire impérieux de réorienter cette lutte antivectorielle vers les stades évolutifs du vecteur tel que le stade larvaire.

Ainsi, en attendant que la recherche développée par les organismes publics et au sein des laboratoires pharmaceutiques concrétise les espoirs de vaccins et de traitement efficaces, nous estimons que l'usage de nos ressources locales (faune et flore) jadis et même de nos jours utilisées à des fins thérapeutiques serait d'un apport salutaire.

C'est dans ce cadre que nous avons entrepris d'étudier la sensibilité des larves de *Anopheles gambiae s.l* aux extraits de quatre plantes médicinales du Mali.

MOTIVATION

Couplé à l'instinct scientifique que nous nourrissons en nous, le maintien de la population en bon état de santé est une condition sine qua non au développement de tout pays.

Pour ce travail, nous avons été motivés par :

- la gravité du paludisme dans le monde et particulièrement au Mali où il est la première cause de mortalité et de morbidité avec des taux respectifs de

26,13 % et 27,16 % et occupe 48 % des consultations quotidiennes des centres de santé;

- la curiosité scientifique: notre amour pour la médecine traditionnelle et l'étude des plantes médicinales;
- le coût très élevé du traitement antipaludique;
- l'importance de l'action préventive;
- le fait que les plantes pourraient fournir des substances à fort potentiel insecticide;
- le souci de contribuer au maintien de la population en état de bonne santé.

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

➤ Objectif général

Evaluer l'activité des extraits de *Acacia nilotica*, *Calotropis procera*, *Euphorbia sudanica* et *Hyptis suaveolens* sur les larves de *Anopheles gambiae s.l.*

➤ Objectifs spécifiques:

- Identifier les différents groupes chimiques des extraits des quatre plantes;
- Déterminer l'activité larvicide des différents extraits des plantes et leurs concentrations létales 50 (CL₅₀) sur les larves de *Anopheles gambiae s.l.*;
- Déterminer l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des extraits des quatre plantes;
- Déterminer l'activité antioxydante des extraits des quatre plantes.

PARTIE 1: GENERALITES

I) Rappel sur le paludisme

1) Le vecteur

Le vecteur du paludisme est un moustique du genre *Anopheles*. Son développement comprend quatre phases successives: l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago (adulte). Les stades d'œuf, larve, et nymphe sont aquatiques, tandis que les adultes sont aériens.

➤ Systématique

Les anophèles sont des diptères nématocères appartenant à la famille des *Culicidae* ou moustiques vrais, à la sous famille des *Anophelinae* et au genre *Anopheles* (Hamon et coll., 1961). Seules les femelles sont hématophages, les mâles quant à eux, sucent le suc des plantes. Les mâles fécondent les femelles qui prennent un ou plusieurs repas de sang (selon les espèces) et vont pondre dans les gîtes les plus proches. Après éclosion, il faut environ 7 à 12 jours pour *Anopheles gambiae* et 3 semaines pour *Anopheles funestus*, à la température de 27 °C pour effectuer la totalité du cycle de l'œuf à l'imago.

❖ Oeufs

Les anophèles pondent généralement leurs oeufs séparément à la surface de l'eau. Chaque œuf est muni de flotteurs latéraux remplis d'air qui l'empêche de couler (Traoré, 1986). L'éclosion se produit généralement 24 à 36 heures après la ponte mais elle peut être retardée par des baisses de températures (Holstein, 1949). Les oeufs restent à la surface de l'eau durant l'embryogenèse.

❖ Larve

A la sortie de l'œuf, la larve mesure à peine 1mm. Les larves jeunes sont noires et présentent une colorette claire très nette qui persiste jusqu'au 3ème stade (Holstein, 1949). Les larves subissent trois mues consécutives qui, par des modifications morphologiques qu'elles engendrent, les conduisent au 4ème stade ou stade de larve adulte ou encore exovue larvo-lymphale. La morphologie externe des larves diffère selon que l'on s'adresse aux *Anophelinae*, *Culicinae* et *Aedinae*. Le corps de la larve est divisé en trois parties: tête, thorax et abdomen. La tête est une structure plus ou moins globulaire fortement chitinisée (larve encéphale) et plus ou moins aplatie dorsalement. Les pièces buccales sont constituées de longues soies courbées (Holstein, 1949).

Le thorax est globuleux et porte de très nombreuses soies. La durée du stade larvaire, très variable, peut aller de six à vingt-quatre jours. Les facteurs de variation de cette durée sont très nombreux : alimentation, concurrence vitale, température, Ph, salinité.

L'abdomen est composé de 9 segments apparents. Les 7 premiers sont à peu près semblables entre eux, le huitième porte les deux stigmates (spiracle) respiratoires. Il n'y a pas de siphon; ainsi la larve se tient à la surface de l'eau pour respirer. De part et d'autre des stigmates, il existe une paire de plaques bordées distalement d'épines. On les appelle peignes ou "combs". Le neuvième segment est réduit en une plaque dans la zone spiraculaire. Le dixième segment est le segment anal.

❖ Nymphe

A la fin du stade larvaire, la larve, parvenue à son complet développement, cesse de se nourrir. Elle subit alors sa quatrième mue en donnant une nymphe. Son aspect général est celui d'une « virgule » à corps ou de point d'interrogation. Le corps correspond au céphalothorax, il est muni d'une paire de trompettes respiratoires, tandis que la pointe correspond à l'abdomen qui se termine par des palettes natatoires (Mattingly, 1969).

On peut distinguer la nymphe des *Anophelinae* de celle des *Culicinae* et *Aedinae* par la position de la soie latérale du segment qui, chez les *Anophelinae*, se trouve à l'angle inférieur du segment et, chez les *Aedinae* et *Culicinae*, se trouve reportée au-dessus de l'angle inférieur du segment. La durée de la vie nymphale est également variable oscillant entre un et six jours suivant les espèces.

❖ Adultes ou imagos

Les imagos de *Anopheles gambiae* se posent obliquement au support, la trompe dans l'axe du corps ainsi *Anopheles funestus* se distingue morphologiquement de *Anopheles gambiae* s.l par sa taille plus petite, sa couleur plus sombre. La morphologie comprend trois parties distinctes: tête, thorax et abdomen:

▪ Tête

Elle porte deux yeux composés, une paire d'antennes de quinze (chez la femelle) à seize (chez le male) segments porteurs de verticilles de soies plus longues chez la femelle (Holstein, 1949). Les palpes maxillaires sont constitués de 5 articles de même longueur que la trompe.

- Thorax

Il est constitué de 3 parties:

- le prothorax réduit;
- le mésothorax formant à lui seul presque le thorax, porte dorsalement la paire (antérieure) d'ailes fonctionnelles;
- le mésothorax est réduit dans sa partie dorsale, sa partie pleurale étant mieux développée. Il porte la paire d'ailes vestigiales ou haltères.

Chaque segment thoracique porte en position ventrale une paire de pattes formée chacune de neuf articles. Elles peuvent préserver des ornements variés, formés d'écailles et de soies colorées. Les ailes des *Anophelinae* de la région afro-tropicale présente en général divers motifs se distinguant par l'existence de régions claires et de régions foncées (Hamon et coll, 1961).

- Abdomen

L'abdomen des anophèles est constitué de dix segments. Les huit premiers sont nettement visibles, les 9ème et 10ème segment peu visibles et rétractiles sont des segments génitaux. Ils forment les genitalia ou terminalia ou encore hypopygium (Hamon et coll., 1961). L'hypopygium montre chez le mâle une structure complexe d'une importance taxonomique considérable (Roth, 1980).

2) Le parasite

Le cycle du plasmodium exige deux hôtes pour accomplir son développement, un hôte définitif invertébré (le moustique) et un hôte intermédiaire vertébré (l'homme).

- Cycle biologique du Plasmodium

Le cycle s'effectue en deux phases:

- ❖ Chez l'homme

Il se déroule le cycle asexué ou schizogonie. En effet, au cours du repas de sang l'anophèle femelle infecté inocule à l'homme les sporozoïtes, forme parasitaire de 15 µm de long sur 1 à 2 µm de large, qui demeurent libres pendant environ 1/2 heure puis pénètrent dans un hépatocyte (début du cycle intra hépatique). Après 40 à 50 heures, les plasmodia (cryptozoïtes) subissent une multiplication asexuée (schizogonie intrahépatique) aboutissant à la formation du « corps bleu » schizonte de 30 à 70 µm de diamètre et déformant l'hépatocyte. Les

schizontes murs contiennent 10.000 à 30.000 noyaux autour desquels s'individualisent des fragments de cytoplasme aboutissant à la formation de mérozoïtes qui sont libérés dans la circulation sanguine par éclatement des hépatocytes infectés. Un stade hypnozoïte (cycle exo érythrocytaire) résultant de la pénétration dans un hépatocyte de certains mérozoïtes particuliers a été décrit chez *P. vivax* et *P. ovale*. Ces formes restent quiescentes pendant des périodes variables selon les souches et expliqueraient les rechutes cliniques possibles avec *P. vivax*. et *P. ovale*.

Dans la circulation sanguine, les mérozoïtes provenant du foie ont une vie libre de quelques minutes et doivent rapidement pénétrer dans un globule rouge. Dans l'hématie, le mérozoïte se transforme en anneau de 1 à 2 μm qui se développe progressivement pour donner le stade trophozoïte. Celui-ci augmente de taille et accroît son contenu en ADN (Acide DesoxyriboNucleique) pour aboutir à des schizontes. Ces derniers divisent leur noyau 3-5 fois et progressivement s'individualisent 8 à 32 mérozoïtes qui se disposent en rosace. Le globule rouge éclate et libère des mérozoïtes qui peuvent de nouveau pénétrer dans un nouvel érythrocyte pour poursuivre un cycle schizogonique ou (endoérythrocytaire).

La durée de maturation au cours du cycle endoérythrocytaire est une caractéristique de chaque espèce plasmodiale.

Après un ou plusieurs cycles érythrocytaires, des stades sexués apparaissent les gamétocytes dont le développement est bloqué chez l'homme.

❖ Chez l'anophèle femelle

Il se déroule la sporogonie ou cycle sexué. 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 ex-flagellation. Les gamétocytes femelles se transforment en gamètes femelles par expulsion de corpuscules chromatiniens.

La fécondation de gamète femelle donne un œuf mobile, l'ookinète qui traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle et se fixe au niveau de la face externe formant l'oocyte, dans lequel s'individualisent les sporozoïtes qui sont les formes mobiles du parasite (sporogonie).

L'ooocyte 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 12 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.

II) Rappel sur les insecticides

1) Description des insecticides

➤ Définition

Selon l'OMS (1995), un insecticide est une substance ou préparation destinée à lutter contre les insectes et les êtres vivants voisins des insectes. Un insecticide idéal pour la lutte contre les vecteurs des maladies doit avoir les propriétés suivantes (Mc Gregor, 1988):

- une grande efficacité sur les vecteurs cibles;
- une efficacité à faible dose, sans provoquer de résistance;
- une grande activité sur les autres insectes nuisibles de la maison ;
- une faible toxicité sur l'homme et les autres mammifères ;
- des effets minimes sur l'environnement ;
- une stabilité dans le milieu extérieur mais se dégradant dans la nature quand son activité disparaît.

2) Classification des insecticides

➤ Insecticides minéraux

- L'acétoarséniate de cuivre (Vert de Paris®) est connu depuis longtemps pour ses propriétés larvicides (Gentilini, 1993).
- Les huiles minérales dérivées du pétrole sont employées depuis longtemps sur les gîtes larvaires de moustiques où elles forment un film qui empêche aux larves de respirer (Gentilini, 1993).
- Les sels de Thallium et de Barium sont aussi des insecticides.

Bien qu'il n'y ait pas de résistance développée aux insecticides minéraux, leur utilisation a été réduite avec l'introduction des insecticides résiduels comme les organochlorés mais surtout à cause de leur toxicité (Mc Gregor, 1988).

➤ Les insecticides végétaux

Ce sont les pyréthrinés qui ont une activité insecticide très élevée et elles existent sous deux formes: pyréthrinés naturels et pyréthrinés de synthèse.

▪ Pyréthrinés naturels :

Elles sont issues principalement de la plante *Chrysanthemum cinerariaefoliae*.

Les principaux constituants sont les pyréthrinés I et II et les cinérinés I et II.

▪ Pyréthrinés de synthèse :

Elles sont obtenues par hémisynthèse à partir de l'acide chrysanthémique et elles agissent par perturbation de la conduction nerveuse en agissant sur la fermeture des canaux sodiques ce qui entraîne un blocage de l'influx nerveux. Il existe deux classes :

-Classe I: Alléthrine ; Bioperméthrine ; Perméthrine ; Cisméthrine ; Resméthrine.

-Classe II: Cyperméthrine (RIPCORDER[®]) ; Décaméthrine (DECIS[®]) ; Tétraméthrin ou Phtaltrin (NEOPYNAMIN[®])

➤ Les insecticides de synthèse

❖ Les organochlorés

Ce sont des insecticides qui constituent un poison de nerf des arthropodes. Les principaux utilisés sont:

- le DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroéthane) ou Zeidane[®] avait marqué le début d'une nouvelle ère dans la lutte contre les insectes;
- le HCH (Hexachlorocyclohexane) et son isomère δ (gamma) (Lindane[®], Gammexane[®]) ont pratiquement les mêmes utilisations que le DDT, mais sont deux fois plus toxiques et deux fois moins rémanents;
- la Dieldrine est un cyclodiène toxique (Dose Létale 50=40-80mg/kg de rats) jadis utilisé en poudre mouillable pour le traitement mural des habitations dans la lutte antipaludique mais actuellement

abandonné en raison de la résistance développée par les insectes (Hamon et Sales, 1970).

❖ Les organophosphorés

Les organophosphorés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Gentilini, 1993). Les premiers composés comme le Parathion (Paraphos[®]) étaient très toxiques, mais les dérivés modernes ont une toxicité faible pour les vertébrés tout en restant de bons insecticides. Nous pouvons citer:

- Le Malathion (Carbophos[®]) peu toxique ($DL_{50} = 1500-3000$ mg/kg de rats), est utilisé en traitements pariétaux (poudre mouillable), en nébulisation aérienne à faible volume (produit technique pur), ainsi qu'en poudre contre les ectoparasites.
- Le Fenitrothion (Folithion[®]) peu toxique ($DL_{50} = 250-500$ mg/kg de rat), est utilisé comme larvicide en concentré émulsionnable ou granulé, et comme imagocide, en poudre mouillable dans les campagnes antipaludiques.
- Le Fenthion (Baytex[®]) et le Chlorpyrifos éthyle (Dursban[®]) de toxicité moyenne (DL_{50} respectivement 200 et 150 mg/kg de rat) sont les produits de choix pour les luttés contre les larves de moustiques dans les eaux polluées, où ils gardent une forte rémanence.
- Le Téméphos (Abate[®]) est essentiellement un larvicide des eaux claires et même des eaux de buisson. Il peut être toxique pour les vertébrés et les invertébrés d'eau douce. Le Téméphos est utilisé dans la lutte contre les larves de simulies (*Simulium nebulosum*) et de *Aedes aegypti*. Il est très actif contre les larves de *Anopheles gambiae s.l* (Touré, 1979 et 1982).

❖ Les carbamates

Les carbamates sont des insecticides qui agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase.

Les principaux composés sont:

- Le Propoxur (Baygon[®]) est le composé le plus utilisé dans les campagnes de lutte contre les vecteurs et en agriculture. Il est peu toxique (DL_{50} par voie orale = 1000 mg/kg de rat) et est très efficace contre les insectes domestiques, en particulier les blattes; il peut remplacer le DDT dans la lutte antipaludique.

- Le Bendiocarb (Ficam[®]) a le même usage que le Propoxur.
- Le Carbofuran (Furadan[®]) est à la fois imagocide et larvicide (OMS, 1984; Gentilini, 1993).

3) Les analogues des hormones d'insectes

Les juvenoïdes (Méthoprène, Pyriproxyfen) inhibent la nymphose (Diflubenzuron) et la synthèse de la chitine. Ils sont chimiostérilisants chez les femelles adultes.

Leur toxicité est faible pour les mammifères, mais leur mode d'action est lent chez les insectes cibles. Ils sont peu utilisés en santé publique du fait de leur coût élevé (Tabachnick, 2003).

➤ Bactéries entomopathogènes

Leur spécificité est plus ou moins grande selon les espèces ciblées. Une ou plusieurs toxines sont associées dans un cristal protéique. Cette association de molécules, est toxique par ingestion, sa pathogénicité mal connue entraîne une lyse des cellules intestinales. Elle n'a aucune toxicité sur la faune.

❖ *Bacillus thuringiensis*

Cette bactérie peut produire plusieurs toxines et son spectre d'action englobe moustiques, simules et insectes agricoles.

Dans les milieux ensoleillés et pollués, cette bactérie peut être rapidement dégradée.

❖ *Bacillus sphaericus*

Cet agent bactérien généralement utilisé dans la lutte contre les culex ne peut produire qu'une seule toxine.

III) Rappel sur les méthodes de lutte anti-vectorielle dans le contrôle du paludisme

Basées sur le contrôle des moustiques, elles sont constituées des luttés mécanique, génétique, biologique, chimique et physique.

1) Lutte biologique

Il s'agit d'introduire dans le biotope des moustiques des espèces d'organismes différents constituant leurs ennemis. Il s'agit du poisson larvicide *Gambusia affinis* dont l'action est limitée aux eaux permanentes et de la bactérie *Bacillus sphaericus* qui provoque une mortalité chez les larves de moustique des genres

Culex et *Anopheles* à degré moindre sur les *Aedes*. Les poissons herbivores (carpes) sont utilisés en Chine pour dévorer les herbes qui servent d'abris aux larves de moustiques (Wu et coll., 1991).

2) Lutte chimique

L'essentiel des mesures prises contre les moustiques repose sur la lutte chimique par l'utilisation d'insecticides. Suivant les cas, on peut adopter des mesures antilarvaires (dispersion d'insecticides dans les gîtes) ou des techniques adulticides (pulvérisation intra domiciliaire (Nosais, 1996).

La lutte chimique se fait par l'emploi des produits synthétiques ou végétaux qui tuent les insectes par ingestion ou par contact. Le mode d'application des produits est fonction de l'écologie du vecteur et du stade visé.

3) Lutte génétique

Elle consiste à la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement (Tabachnick, 2003).

Les manipulations intéressent également les plantes telles les algues qui se reproduisent dans les gîtes larvaires. Ces algues génétiquement modifiées par intégration de gènes de toxines bactériennes agissent sur les larves de moustiques.

4) Lutte mécanique

Elle a pour but de limiter la prolifération des insectes vecteurs et de réduire le contact homme-moustique. Elle se fait par l'élimination des gîtes larvaires potentiels de moustiques autour des habitations humaines (l'assèchement et le remblaiement des marins, le creusement de dépression etc...), l'utilisation des moustiquaires imprégnées, l'entretien des habitats (Carnevale et Mouchet, 1999).

5) Lutte physique

C'est une modification intentionnelle du biotope, qui vise à faire disparaître ou réduire par des moyens physiques les nappes d'eau de surface dans lesquelles les moustiques se développent (www.malaria.tun). On distingue :

- le drainage ;
- la mise en boîte ;
- le captage des résurgences ;

- le comblement ;
- le boisement.

IV) Rappel sur les résistances

➤ La résistance des vecteurs du paludisme aux insecticides

❖ Définition

La résistance peut être définie comme la faculté pour un organisme donné de survivre à des doses de produit toxique qui auraient dû normalement le tuer. Il s'agit d'un caractère héréditaire sous la dépendance de gène qui se transmet de génération en génération et évolue au cours du temps (Guillet, 1996). Cette résistance est dite croisée lorsqu'elle touche plusieurs insecticides n'appartenant pas à la même famille (Guillet, 1999).

❖ Mécanismes de résistance

Les insecticides agissent en se fixant ou en bloquant des cibles physiologiques présentes chez l'insecte (récepteurs du SN, récepteurs hormonaux...).

Pour agir, l'insecticide doit arriver au contact de l'insecte avant de pénétrer dans l'organisme de l'insecte où il va être transformé éventuellement en composé actif. Il est ensuite transporté jusqu'à sa cible. Chacune de ces étapes est sous la dépendance d'un ou plusieurs gènes. La survenue d'une mutation au niveau d'un de ces gènes peut conduire à l'apparition de résistance (Guillet, 1999).

▪ Résistance comportementale

Dans ce cas l'arthropode évite tout contact avec l'insecticide. Ce type de comportement est très souvent dû à l'effet excito-répulsif de l'insecticide et n'a pas de rapport avec une modification génétique (Soderlund et Bloomquist, 1990).

▪ Résistance par modification de l'absorption et de l'excrétion des insecticides

Il s'agit ici d'une augmentation de l'activité catalytique et/ou de la quantité des enzymes intervenant dans la dégradation normale des insecticides (Soderlund et Bloomquist, 1990).

▪ Résistance par modification du site d'action

Cette dernière semble être plus fréquemment rencontrée surtout en Afrique Subsaharienne (Guillet, 1995).

La modification peut concerner la transmission de l'influx nerveux au niveau des nerfs eux-mêmes. C'est le cas de la résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT. Cette résistance est due à la fois à la modification des canaux sodiques voltages dépendants et à la réduction de leur nombre.

Ce type de résistance est sous la dépendance d'un gène baptisé « gène kdr », car il confère une résistance à l'effet « knock-down » aux individus qui le portent. Ce gène est fréquemment rencontré chez la mouche domestique sous le nom de « super gène ». Le gène kdr se caractérise par une diminution de l'affinité entre les canaux sodiques et les insecticides.

Le DDT et les pyréthrinoïdes agissent sur les insectes en ralentissant l'inactivation des canaux et induisent une décharge répétitive de potentiel d'action entraînant une paralysie des nerfs.

Le site cible de la mutation kdr est la partie du gène codant le domaine IIS4-IIS6 du canal sodique. La mutation kdr la plus courante en Afrique de l'Ouest est la substitution de la Leucine par la phénylalanine. Une autre substitution concerne la leucine par la sérine rencontrée en Afrique de l'Est.

V) Rappel sur quelques substances à activité larvicide

1) Nicotinoïdes

Le genre *Nicotiana* (Solanaceae) comprend plusieurs espèces dont la plus connue est *Nicotiana tobacum* L.. La nicotine est un alcaloïde contenu dans cette plante qui est reconnue pour ses activités insecticides. La nornicotine et l'anabasine en possèdent aussi (Bettelo et Galeffi, 1988).

2) Conchosine A et Conchosine B

Construites autour d'un noyau pseudoguaiinolide, elles sont extraites de la plante *Parthenium confertum* et présentent des effets toxiques sur le développement des larves de certains insectes (Harbone, 1995).

3) Glaucolide A

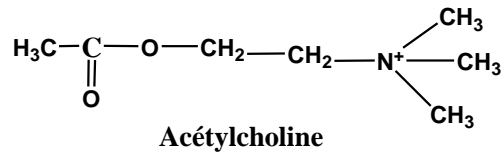
Structurée autour d'un noyau germacranolide, elle est extraite de nombreuses espèces de *Vernonia*. Elle affecte le développement des larves de certains insectes (Harbone, 1995).

4) Hymendine

De noyau pseudoguaiinolide, elle est extraite de *Hymenodae salsola* L. (compositae) et est toxique pour les larves d'*Aedes atrophalus* (Harbone, 1995).

VI) Rappel sur le système cholinergique

Les parasymphomimétiques (qui reproduisent les effets de la stimulation du système nerveux parasymphatique) sont des cholinomimétiques ou agonistes cholinergiques. Ils peuvent être directs (quand ils agissent directement sur les récepteurs des fibres lisses musculaires innervées par le système parasymphatique) ou indirects (en augmentant la teneur locale en acétylcholine, neuromédiateur parasymphatique par inhibition de l'acétylcholinestérase).



L'acétylcholine est un médiateur du système nerveux. Elle est libérée dans les synapses centrales, médullaires, dans la plaque motrice, à l'extrémité de la fibre post- ganglionnaire courte parasymphatique.

Injectée à faible dose, elle reproduit les effets de la stimulation du système parasymphatique (effet muscarinique); à forte dose et en présence d'atropine, elle agit comme un stimulant ganglionnaire (effet nicotinique) (Couhen, 1994).

➤ Les récepteurs cholinergiques (cholinorecepteurs)

On admet l'existence de deux types de récepteurs que sont les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques.

Les récepteurs muscariniques sont couplés à une protéine G et ils sont dans les synapses neuro-neuroniques (SNC, ganglions du SNA), placés sur les effecteurs, le cœur, le tube digestif, l'œil, les bronches, et sur les bronchioles.

Les récepteurs nicotiniques sont constitués d'un canal ionophore qui permet le passage des ions sodium à travers la membrane cellulaire, ces récepteurs nicotiniques se trouvant dans la plaque motrice, les neurones du SNC, les ganglions du SNA (Richard et coll. 2006).

➤ Indications et contre-indications des parasymphomimétiques directs

Ils ont été utilisés dans l'artérite oblitérante ou syndrome de Raynaud, dans l'atonie gastrique, dans l'atonie vésicale postopératoire ou du post-partum avec rétention d'urine. En collyre, ils servent dans le glaucome. Ils présentent des effets secondaires: nausées, vomissements, défécations involontaires et syncope avec arrêt cardiaque. Les effets muscariniques sont antagonisés par l'atropine.

1) Les parasymphomimétiques indirects

Les parasymphomimétiques indirects sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et de la pseudocholinestérase, enzymes responsables de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique. Ils sont dits anticholinérasiques.

Certains anticholinérasiques utilisés en thérapeutique ont une action réversible (esérine, néostigmine). D'autres sont des pesticides, des insecticides ou des toxiques de guerre très dangereux (Le tabum et le sarin) à action irréversible ou très lentement réversible.

Les organophosphorés (parathion et le paroxon), en outre, entraînent une paralysie progressive

➤ Action sur l'acétylcholinestérase

Ils agissent par compétition avec l'acétylcholine, occupent le site actif de l'enzyme de façon lente réversible ou irréversible

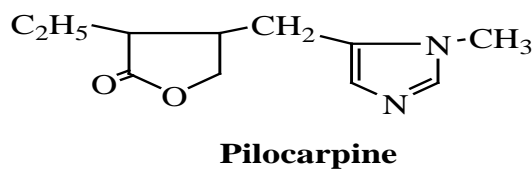
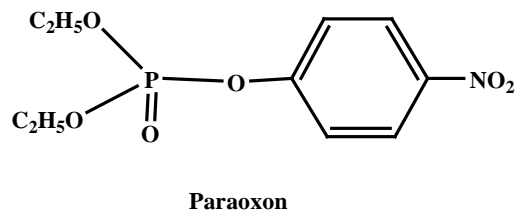
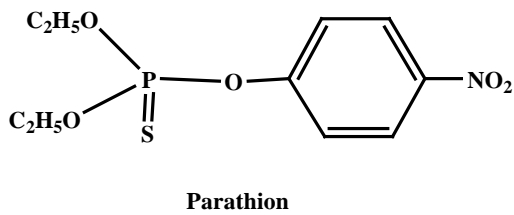
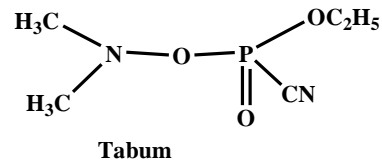
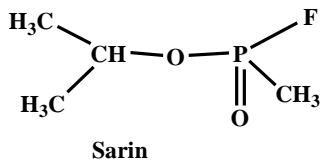
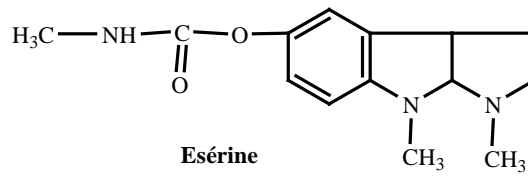
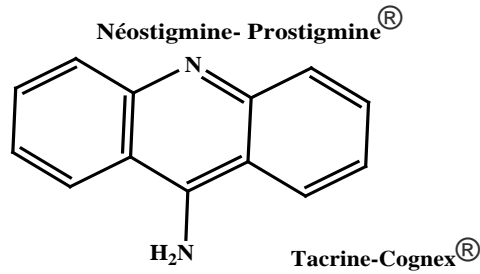
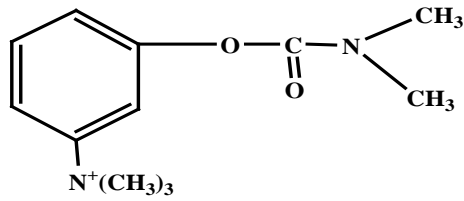
Les carbamates (esérine et néostigmine) présentent une analogie de structure avec l'acétylcholine.

- Effets muscariniques: Les anticholinérasiques provoquent la bradycardie, l'hypotension, l'augmentation du péristaltisme intestinal, la bronchoconstriction, le myosis, la sudation et la salivation.
- Effets nicotiques: Les effets nicotiques sont révélés en présence d'atropine. On observe une accélération cardiaque, une diminution du tonus intestinal, une légère hypertension par action sur la médullosurrénale qui sécrète de l'adrénaline.

La tacrine, aminotétrahydroacridine, est un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase. D'abord proposée comme antagoniste des pachycurares elle est maintenant indiquée dans la maladie d'Alzheimer qui est caractérisée par une aphasia, une agnosie et une apraxie, survenant chez le vieillard par dégénérescence des neurones centraux avec déficit de l'acétylcholine (Couhen, 1994).

De nos jours cette tacrine est de plus en plus abandonnée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer au profit de certains alcaloïdes d'origine végétale telle que la galanthamine (Fulton et Benfield, 1996).

2.1) Quelques structures chimiques d'anticholinestérasiques



VII) Rappel sur les Antioxydants

1) Réactions d'oxydoréduction

➤ Définition

Toute réaction chimique au cours de laquelle il y a transfert d'électrons d'un corps (oxydant) à un autre (réducteur) est appelée réaction d'oxydoréduction. Dans ce cas le réducteur est oxydé et l'oxydant est réduit.

2) L'oxydation

Si la place indispensable qu'occupe l'oxygène pour la vie est connue de tous, il n'en est pas de même pour la source d'agression qu'il peut constituer à l'égard de tous les êtres vivants.

En effet étant le récepteur final des électrons dans l'organisme, l'oxygène se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne mitochondriale. Cette réaction est très importante car elle génère de l'énergie par la production de molécules d'adénosine triphosphate (ATP) qui sont des réservoirs d'énergie. Mais cette réduction de l'oxygène n'est pas totale car une partie non négligeable est transformée en espèces réactives (ERO) appelées autrement radicaux libres.

En effet, une oxydation se fait en trois phases: une phase d'initiation, une phase de propagation et une phase d'arrêt.

➤ Le stress oxydant

En situation physiologique il y a un équilibre parfait entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défenses antioxydants. On parlera de stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre profond entre antioxydants et radicaux libres en faveur de ces derniers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Pincemail et coll.1999).

3) Les radicaux libres

3.1) Origines

Les radicaux libres sont générés par plusieurs phénomènes parmi lesquels nous pouvons citer:

- La pollution de l'environnement (automobiles, industries, feux de brousse et autres);

- Le tabac (une bouffée de cigarette contient environ 1014 radicaux et aussi des traces d'ions métalliques pouvant réagir avec le peroxyde d'hydrogène);
- Le VIH (l'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme. En effet, le VIH endommage l'intestin de sorte qu'il soit moins apte à dégrader et à absorber les nutriments présents dans les aliments).

3.2) Rôles des radicaux libres

Les radicaux libres sont caractérisés par leur grande réactivité chimique et leur courte durée de vie (Allain, 1996).

D'une part, la production de radicaux libres est utile car ces derniers aident les cellules phagocytaires de l'organisme (les macrophages du système immunitaire) à combattre les tumeurs, les bactéries et les virus.

Mais d'autre part, la production d'une grande quantité de radicaux libres sur une période prolongée risque de causer des problèmes pour l'organisme.

Ainsi de par leur nature instable les radicaux libres (ERO) sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation de glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Pincemail et Coll. 2002).

C'est ainsi que certains radicaux libres semblent jouer un rôle dans les phénomènes de vieillissement, qui pourraient être la conséquence des dommages oxydants irréversibles accumulés tout au long de l'existence. En effet ces radicaux libres sont des substances fortement néfastes pour l'organisme car ce sont elles qui vont oxyder les divers constituants de la cellule en particulier sa membrane et conduire à son vieillissement précoce donc à sa lyse (Ames, 1983 ; Prior, 1982 ; Prior et coll, 1983).

4) Les antioxydants

4.1) Définition

On entend par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable retarde ou prévient de façon significative l'oxydation de ce substrat (Cavin, 1999).

4.2) Les différents types d'antioxydants

Il existe deux types d'antioxydants suivant leurs mécanismes d'action:

➤ Types I

Ce sont des substances qui vont interrompre la chaîne de propagation de peroxyde. Ils sont appelés les phagocytes de radicaux libres.

Comme exemple, on cite le gallate de propyl, le terbutyl hydroxy-anisol (BHA) et la vitamine E ou Tocophérol.

➤ Types II

Ils empêchent ou diminuent la formation des peroxydes. Ils sont aussi nommés les séquestrants de métaux. Ils précipitent les métaux en inhibant leur réactivité par occupation de tous leurs sites de coordination.

Lorsque des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites en grande quantité *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Ce sont:

▪ Les polyphénols

Ces composés phénoliques ont la particularité de piéger certains radicaux libres et certains possèdent des propriétés d'inhibition de la peroxydation des lipides (Anderson et coll. 1996).

▪ Les flavonoïdes

Ils agissent comme chélateurs des métaux (Quercétine) ou comme capteurs des radicaux hydroxyles super oxydes, alkyles et peroxydes (Mandavi et coll., 1996).

▪ Les xanthones

Ce sont des inhibiteurs de la monoamine oxydase (Hostettman, 1989).

▪ Les coumarines

Ce sont des molécules capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

- Les caroténoïdes

Ils réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoyles en capturant les radicaux libres (Krinsky, 1989).

- Les tanins

Ils inhibent aussi bien l'auto-oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate ainsi que la peroxydation des lipides des mitochondries du foie et des microsomes.

Les tanins agissent en donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. Des radicaux plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique. Ils sont par conséquent de très bons capteurs de radicaux libres. L'exemple du thé vert est régulièrement cité.

D'autres substances thérapeutiques comme les anti-inflammatoires stéroïdiens, les antihyperprotéiniques, les β -bloquants révèlent aussi des propriétés antioxydantes. En exemples, nous pouvons citer:

- Le probucol

Il diminue non seulement le taux de cholestérol dans le sang mais aussi supprime l'oxydation des lipoprotéines de faible densité et prévient ainsi l'athérogénèse.

- La N Acétyl-Cystéine

C'est un précurseur du glutathion (Tripeptide composé de cystéine, d'acide glutamique et de glucine) qui transporte l'hydrogène dans l'organisme et guérit en plus les affections des poumons dues à des espèces réactives de l'oxygène.

- L'acide ascorbique (vitamine C)

En plus de ses propriétés antiasthéniques, l'acide ascorbique est aussi un puissant réducteur et intervient dans la régénération de la vitamine E.

- Le tocophérol (vitamine E)

Cette vitamine de la reproduction prévient la peroxydation des lipides membranaires par capture des radicaux.

- Le sélénium

Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure) et prévient le vieillissement des cellules. Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers (Martine, 2002).

4.3) Méthodes d'étude des antioxydants

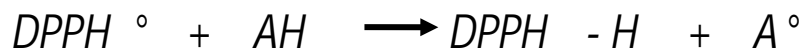
- Test mesurant l'activité antioxydante sur le lysosome

- ❖ Principe

Ce test consiste en la détection de l'activité antioxydante d'une substance par oxydation des lysosomes par le 2, 2'-azobis, 2-amidinopropane (Amadou, 2004).

- Réduction du radical 1,1'-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)

- ❖ Principe



La réduction du DPPH° s'accompagne du passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Il consiste à déposer les produits à tester sur des plaques de CCM en aluminium recouvertes de gel de silice et à les développer dans des systèmes de solvants appropriés. Après séchage, les plaques sont révélées avec une solution méthanolique de DPPH à 2mg/ml. Les activités antiradicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet (Cavin, 1999).

- Test mesurant l'activité antioxydante au moyen des caroténoïdes

- ❖ Principe

les plaques CCM sont préparées de la même manière que pour le test du DPPH, puis giclées avec une solution chloroformique à 0,5 mg/ml de β - carotène. La plaque CCM est ensuite exposée sous une lampe UV à 254 nm. Les zones antioxydantes apparaissent en jaune sur fond blanc. Il faut faire particulièrement attention aux substances déjà colorées en jaune, car elles peuvent donner de faux positifs (Cavin, 1999).

VIII) Monographies des plantes

1) *Acacia nilotica* var. *adansonii* (Guill. et Perr.) O. Ktze

1.1) Systématique

Famille : Mimosaceae

Sous-famille : Mimosoïdeae

Genre : *Acacia*

Espèce : *nilotica*



Fig.1: Photos des fruits de *Acacia nilotica*

1.2) Description botanique

Pouvant atteindre 20 m de haut, l'arbre est épineux avec un tronc droit, cylindrique à écorce brun foncée parfois noire profondément fissurée et striée. Les feuilles bipennées, alternes ont des folioles très fines. L'inflorescence se présente en glomérules sphériques de couleur jaune d'or, axillaire, ou en verticilles successifs au sommet des rameaux pédonculés. Le fruit est une gousse pubescente large, étranglée entre les graines, mais simplement à bords sinueux de couleur gris cendre à la maturité.

1.3) Habitat et répartition géographique

Acacia nilotica se rencontre dans le domaine sahélien, soudanien et le secteur soudano-guinéen. *Acacia nilotica* est épars dans la zone sahélienne ou dans les steppes à épineux entre les savanes soudanaises et la végétation désertique. Il se trouve à l'état dispersé sur les sols argileux ou silico-argileux du domaine soudanien. En particulier au Sénégal et en Mauritanie, le long de la vallée du

fleuve Sénégal; il est très commun sur ce type de terrain. Au Mali (de Kayes à Nioro) il est répandu partout d'une manière spontanée dans les villages.

1.4) Usages

Etude des propriétés thérapeutiques des tanins:

Les utilisations des plantes à tanins en médecine traditionnelle sont dominées par les propriétés antiodysentérique et antiseptique. Ces plantes sont douées également de propriété vitaminique P dues à des formes moins condensées comme les flavonoïdes.

Les drogues à tanins sont utilisées en thérapeutique:

- à l'extérieur pour leurs propriétés astringentes et cicatrisantes.

Appliquées sur les muqueuses et la peau, il y a une sorte de tannage. Il s'y ajoute une action vasoconstrictrice sur les petits vaisseaux qui complètent cette activité.

Cette propriété explique leur emploi contre les hémorroïdes et les blessures superficielles. Les tannins exercent une action anti-inflammatoire dans les brûlures.

- à l'intérieur, les tanins sont des antidiarrhéiques.

Ils exercent une action antiseptique dans les infections pulmonaires grâce à une action inhibitrice sur la croissance des champignons, des bactéries et des virus.

❖ Etude de l'emploi des tanins dans l'industrie

- les tanins sont essentiellement utilisés dans l'industrie du cuir. Ils se combinent sous forme de complexe aux protéines et rendent imputrescibles les peaux;
- à cause de leur nature polyphénolique, les tanins sont des antifongiques et antibactériens utilisés pour la protection des filets de pêche contre la prolifération des germes producteurs de cellulases qui sont des enzymes responsables de la destruction de la cellulose des filets;
- ils sont employés pour la fabrication des adhésifs et des plastiques.

❖ Formes d'utilisation de *Acacia nilotica*:

Acacia nilotica est une espèce très utilisée en médecine traditionnelle au Sénégal, au Mali et en Mauritanie pour ses propriétés anti-diarrhéiques, anti-dysentériques, anti-odontalgiques et cicatrisantes.

❖ Usage interne

Dans le traitement de la dysenterie amibienne, on donne au malade une infusion réalisée avec les écorces seules ou en association avec les fruits (Valette, 1964).

- Dans le traitement de la blennorragie

"Prendre sous forme de boisson à jeun, un litre d'eau contenant des gousses séchées et pilées de *Acacia nilotica*. Répéter l'opération trois fois pour obtenir une guérison complète".

- Diurétique

Au Sénégal dans le Cayor, *Acacia nilotica* est utilisé comme diurétique. Les racines sont associées à celles de *Leptadenia hastata*, *Securinega virosa* et aux feuilles de *Arachis hypogea* (arachide).

- Contre la toux

Les gousses mâchées seraient antitussives. Elles peuvent être également utilisées sous forme de décoction chaude dans cette infection.

❖ Usage externe

- Scorbut et plaies buccales

La partie utilisée est le rameau feuillé.

- Ulcères et plaies

- Les gousses pulvérisées sont utilisées pour activer la cicatrisation des ulcères syphilitiques.
- Saupoudrer la plaie proprement lavée d'une poudre obtenue en pulvérisant des gousses de *Acacia nilotica* et des écorces de *Stereospermum kinthianum*.

- Plaies des circoncis

- Le jus de jeunes gousses et l'écorce est employé pour arrêter les saignements des plaies de la circoncision.
- Asperger la blessure d'une poudre composée de fruits secs de *Acacia nilotica*, d'écorces et de racines pilées de *Heeria insignis* et *Ximenia americana*.

Au Sénégal, dans le Cayor, Kerharo et Adam (1974) signale l'emploi d'une poudre hémostatique et cicatrisante préparée à partir des fruits de *Acacia nilotica* et des écorces de *Pilostigma reticulata* et de *Tamarindus indica*.

- Dans le traitement des ophtalmies

La décoction des feuilles est utilisée sous forme de bain oculaire. Le jus obtenu après mâchage des feuilles est appliqué en collyre dans le traitement de certaines ophtalmies appelées "sotiètes" en Wolof.

- Autres usages

- *Acacia nilotica* est employée comme plante fourragère. Les feuilles et les jeunes gousses servent d'aliments de bétail;
- Les gousses sont utilisées dans l'industrie artisanale pour le tannage des peaux;
- Le bois est d'une bonne qualité. Il résiste à l'eau et aux termites à cause de la présence de résine. Il est utilisé pour la fabrication de mortiers, d'outils agricoles.

1.5) Chimie

Les extraits aqueux des feuilles de *Acacia nilotica* sont riches en polysaccharides et pectines (Sawadogo et coll., 1988).

La teneur en tanins est très forte (Kerharo et Adam, 1974) et selon Henry et Amman (1974), les petites branches et les racines contiennent 18-20 % de tanins tandis que le tronc possède plus de 20 %. Selon Watt (1974), les tanins sont de type catéchique.

Gad et coll. (1974) donnent les pourcentages suivants des acides gras des glycérides de l'huile des graines: 7 % d'acide stéarique, 22,6 % d'acide palmitique, 32,8 % d'acide oléique et 37,6 % d'acide linoléique. Les graines sont

riches en sodium, potassium et magnésium. Selon Watt (1974), la plante contient des saponosides.

1.6) Activités biologiques

L'extrait aqueux des cosques de *Acacia nilotica* est actif sur la réplication de l'HIV-1 alors que les extraits méthanoliques sont actifs sur l'enzyme protéasique de l'HIV-1. Ils ont une concentration inhibitrice CI = 31,25 µg/mL. Ces activités étaient attribuées à leur composition en tanins (Hussein et coll. 1999).

Des extraits aqueux des feuilles de *Acacia nilotica* ont démontré des propriétés lactogènes après administration per os. Les principes actifs responsables de cette activité sont constitués majoritairement de polysaccharides et de pectines et ces mêmes constituants sont responsables d'une augmentation simultanée des concentrations de prolactine, d'hormone de croissance (GH) et de cortisol (Sawadogo et coll. 1988).

Acacia nilotica possède des propriétés molluscicides attribuées aux saponines (Marston et coll. 1993).

Les feuilles et les écorces de *Acacia nilotica* sont utilisées comme anti-odontalgiques et la poudre de fruit dans le lait est utilisée comme antidysentérique (Kerharo et Adam, 1974).

Les feuilles et les fruits sont fréquemment utilisés par les populations contre les diarrhées et le rhume (Diallo et coll. 1996).

2) *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f.

2.1) Systématique

Règne: Végétal

Embranchement: Magnoliophyta

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Gentianales

Famille : Asclepiadaceae

Genre : *Calotropis*

Espèce : *procera*

Noms vernaculaires :

- arbre à soie ou pomme de sodome en Français
- Poutroupouga en Mooré
- Fogofogo, Popogolo, Fogofoko, Fogofogoba en Bambara
- Tumfaafra en Haoussa



Fig.2: Photos de *Calotropis procera*

2.2) Description botanique

Dépassant rarement 3 mètres de haut, la pomme de sodome est munie d'écorce épaisse, beige, liégeuse et caractérisée par un abondant latex blanc. Elle porte de grandes feuilles vertes glauques ou blanchâtres et opposées. Ses fleurs sont en cymes axillaires, blanches, violines ou pourpres. Les fruits se présentent sous forme de gros follicules renflés, ovoïdes, de la taille d'une mangue, verts, mous et remplis d'air (Arbonnier, 2002). La graine est aplatie, surmontée à un bout d'une touffe de soies blanches. La floraison se fait toute l'année, aussi bien en saison sèche qu'en saison des pluies. La reproduction se fait par les graines (Nacoulma, 1996).

2.3) Habitat et répartition géographique

Calotropis procera est un arbuste de la zone sahélo-saharienne envahissant les jachères ou les bords de route dans les zones plus humide. Il est retrouvé en zone soudanienne ou soudano-guinéenne (Malgras, 1992).

2.4) Usages

Au Bénin, le décocté des feuilles utilisé per os est indiqué pour le traitement de la toux, des filarioses, de l'anasarque et de l'oedème. L'infusion des feuilles est utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle. Le latex est appliqué localement sur la carie. La poudre de racine est conseillée à la femme présentant une dystocie (G.R.I.P.T, 2001).

Au Burkina-Faso, les feuilles, les écorces et les racines sont employées contre les douleurs rhumatismales, les céphalées, les diarrhées, la syphilis, l'épilepsie, les dermatoses, asthme etc... (Parvais, 2000; Nacoulma, 1996). Le latex en usage externe est antiseptique, cicatrisant, antifilariose et antiprotozoose (Nacoulma, 1996).

Au Mali, le bois et l'écorce sont donnés aux vaches pour augmenter la lactation. Le bois très léger donne un charbon de bois pour usages spéciaux. On l'utilise pour allumer le feu ou comme flotteurs des filets de pêche. Les perches sont utilisées par endroits dans la construction, pour les toits légers car le bois résiste aux termites (G.R.I.P.T, 2001; Berhaut, 1971).

Au Niger, les propriétés magiques de la plante sont signalées, le latex est utilisé pour cailler le lait (G.R.I.P.T, 2001).

Au Sénégal, les racines sont absorbées en poudre, dans du lait frais ou caillé comme purgatif, émétique et contrepoison. Le latex est constamment employé en usage externe comme antiseptique et sédatif (G.R.I.P.T, 2001)

Au Togo, les feuilles en macération aqueuse avec le fruit de *Cola nitida* sont conseillées en cas de menace d'avortement. Elles sont mâchées et avalées dans les envenimations par morsure de serpent. Le décocté aqueux des feuilles est bu pour traiter la coqueluche et la tuberculose. Les racines sont antiasthmatiques seules et entrent dans le traitement de la folie (G.R.I.P.T, 2001).

En médecine traditionnelle indienne, diverses parties de la plante sont utilisées comme purgatif, anti-helminthique et aussi dans le traitement des maladies

telles que la lèpre, l'ulcère, les tumeurs et les hémorroïdes (Kirtikar et Basu, 1935).

2.5) Chimie

La littérature sur la chimie de *Calotropis procera* a montré que principalement le latex est majoritairement riche en substances chimiques. Ainsi au niveau de ce latex, Hesse et coll. (1950), ont réussi à isoler la Calotrogénine qui est un trihydroxycardénolide ainsi que des hétérosides tels que la Calotropine, la Calactine, la Calotoxine, l'Uscharine (alcaloïde), l'Uscharidine et la Voruscharine (alcaloïde). Par ailleurs Bruschweiller et coll. (1969), ont isolé trois composés supplémentaires que sont l'Uzarigénine (dihydroxycardénolide), la Synogénine (trihydroxycardénolide) et un autre hétéroside le Procéroside. Une protéase (la calotropaine) et un triterpène (le Taraxastérol) ont été isolés de la plante. Néanmoins, dans les feuilles, Gallegos et coll.(2002), ont pu identifier par méthodes spectroscopiques des carbonates organiques à savoir le stigmastérol et le β -sitostérol.

2.6) Activités biologiques

Le latex possède une puissante activité anti-inflammatoire, des effets antioxydant et antihyperglycémique ou hypoglycémiant donc antidiabétique.

Expérimentalement, le latex possède de puissantes propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques peu puissantes (Kumar et Basu, 1994; Dewan et al, 2000). Le latex montre des propriétés anti-diarrhéiques (Kumar et coll, 2001; Kumar et Shakar, 2004). Le latex a aussi des propriétés antioxydantes comparables aux antioxydants standards telle que la vitamine C (Mueen et al, 2003, 2004).

3) *Euphorbia sudanica* A.Chev

3.1) Systématique

Ordre : Euphorbiales

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Euphorbia*

Espèce : *sudanica*

-

Noms vulgaires : - Giliki en Bambara

- Tendié en Dogon
- Guon no en Fula-Pulaar
- Homon-homon en Manding-Maninka



Fig.3: Photo de *Euphorbia sudanica*

3.2) Description botanique

La jeune plante peut atteindre 2 m de hauteur. La plante est un arbuste avec un exsudant blanc de latex, les feuilles sont pétiolées.

3.3) Habitat et répartition géographique

Elle est située dans les zones rocheuses de la savane sèche allant du Sénégal au Niger. A Niamey au Niger cette plante pousse au bord des routes et est reconnue comme un poison car son latex est caustique. Elle se retrouve aussi dans la zone rocheuse du Soudan. Au Mali, cette plante a été récoltée à Bamako et précisément sur les collines de Sangarébougou.

3.4) Usages

La décoction de la plante avec *Sarcocephalus latifolius* (Rubiaceae) réduite en cendre est utilisée au Sénégal pour se laver le corps et la face en traitement de la lèpre (H.M.Burkill, 1997).

Certaines espèces de plantes du genre *Euphorbia* sont utilisées pour le traitement des maladies de la peau, de la gonorrhée, des migraines, des parasites intestinaux et comme anti-inflammatoires dans la médecine traditionnelle indienne Ahmed et coll (2005).

3.5) Chimie

Selon la littérature disponible, n'ayant quasiment pas fait l'objet d'études ou de recherches, nous n'avons pu recueillir que la présence de classes spécifiques de macro et polycycliques 1,3-diterpènes selon Ahmed et coll (2005).

3.6) Activités biologiques

Les activités biologiques de la plante à savoir l'irritation de la peau, les activités tumorigène et inflammatoires sont attribuées à la présence de classes spécifiques de macro et polycycliques 1,3-diterpènes (Ahmed et coll, 2005).

4) *Hyptis suaveolens* (L.) Poit

4.1) Systématique

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Hyptis*

Espèce : *suaveolens*



Fig.4: Photos de *Hyptis suaveolens*

4.2) Description botanique

C'est une herbe terrestre, annuelle, aromatique, dressée jusqu'à 2 mètres de hauteur. La racine est pivotante blanche ou brune. La tige est quadrangulaire, creuse, à poils glanduleux. Les feuilles sont simples, entières, opposées, pétiolées, ovales, pubescentes sur les deux faces. Les fleurs hermaphrodites sont groupées en glomérules axillaires, sessiles à 5 pétales blancs. Le fruit est une noix (AICAF, 1997).

4.3) Habitat et répartition géographique

C'est une plante originaire d'Amérique tropicale qui est répandue à travers le monde maintenant particulièrement dans les régions tropicales.

Hyptis suaveolens montre quelques tendances anthropogéniques apparaissant au bord des routes autour des villages et comme mauvaise culture.

4.4) Usages

La plante entière est utilisée en médecine pour traiter la dysenterie et les mammites. Les feuilles fraîches seraient efficaces contre les piqûres des serpents vénimeux (Henty and Pritchard, 1973).

Les jeunes pousses de la plante sont consommées en Inde et en Thaïlande car ajoutées à la nourriture comme aromatisant (Burkill, IH, 1935; Sastri, 1959). En Java, elles constituent la nourriture du bétail (Dalziel, 1937).

En Afrique de l'Ouest, les feuilles de la plante sont acceptées comme substituant en infusion du thé (Dalziel, 1937; Deighton, 1961; Irvine, 1952). La plante est réputée pour son efficacité contre les atteintes douloureuses bénignes. Aussi, elle possède des propriétés stimulant, carminative, sudorifique, lactogène, anticatarrhale et antiparasitaire cutanée.

En Côte d'Ivoire (Bouquet et Debray, 1974) et au Sénégal (Kerharo et Adam, 1974), la tisane est donnée pour lutter contre la toux, les troubles bronchiques. Les Ashanti et Agni en Côte d'Ivoire utilisent la sève des feuilles dans la nourriture des enfants pour lutter contre les douleurs gastro-intestinales (Kerharo et Bouquet, 1950). Les Tagwana utilisent cette plante dans la nourriture des chiens pour les préparer à la lutte (Kerharo et Bouquet, 1950). La mauvaise odeur de la plante a servi à la protection des peuples en Côte d'Ivoire contre les mauvais esprits (Bouquet et Debray, 1974).

Au Sénégal, une infusion des plantes matures en fruit est prise par les Nyominka pour leur produire un sentiment de bien-être (Kerharo et Bouquet, 1950) tout comme en Côte d'Ivoire (Bouquet et Debray, 1974). Les inflorescences de la plante sont mises dans les matelas pour les garder ou les épargner des insectes venimeux piqueurs nuisibles tout comme aux Philippines où les inflorescences sont mises sous le lit ou sous les chaises (Quisumbing, 1951). Les fruits avec leurs calices épineux sont utilisés comme répulsifs pour les moustiques au Tanganyika (Ruffo, 1922). La plante est frottée au corps des cadavres pour les embaumer (Kerharo et Adam, 1974).

La sève des feuilles ajoutée à du jus de Lémon est prise en Sierra Leone contre les maux de ventre. Les feuilles sont utilisées pour chasser les vers de terre (Oliver B, 1960).

En infusion la plante est utilisée contre la fièvre (Bouquet et Debray, 1974; Dalziel, 1937; Deighton, 1961; Irvine, 1952; Wong, W, 1976).

Dans certains villages au Ghana, la plante joue un rôle très important dans le traitement de l'anémie durant la grossesse et les sages-femmes la prescrivent pour induire ou catalyser et faciliter le travail pendant l'accouchement (Mouch, 1982). La très mauvaise odeur de la plante a permis son utilisation comme insectifuge. Les feuilles sont utilisées en Sierra Leone pour repousser les insectes (moustiques) loin des maisons (Harvey, 1989).

Au Congo (Brazzaville), la plante est mise dans le bain pour laver les enfants contre la fièvre (Bouquet, 1969).

En Tanga, au Tanganyika (actuelle Tanzanie), l'eau bouillit des racines est utilisée contre les maux de ventre (Tanner, 1950).

En Amérique, le cataplasme des feuilles est appliqué contre le cancer et les tumeurs (Harbwell, 1969).

En Inde la plante est utilisée comme engrais vert et les feuilles sèches sont reniflées pour stopper le saignement du nez. La décoction des racines est utilisée comme apéritive (Sastri, 1959) et aussi pour le traitement des affections de l'utérus.

En Indonésie (Heyne fode et Burkill, 1935) et en Inde, elle est réputée comme ayant des propriétés galactogènes.

4.5) Chimie

Les feuilles de la plante sont riches en huiles essentielles isolées par hydrodistillation. Plusieurs constituants mono et diterpéniques de ces huiles essentielles ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse (Adegoke et coll. 1968).

La plante contient une huile éthérique de couleur vert jaune avec une relative présence de menthol (Berhaut, J, 1967; Oliver B, 1960). L'acide hydrocyanique est contenu dans les racines, les écorces et les feuilles (Quisumbing, 1951).

La présence d'alcaloïde a été signalée dans les échantillons des feuilles collectées au Nigéria (Adegoke et coll. 1968). La graine de cet échantillon contient aussi un alcaloïde (Willaman et Li, 1970).

4.6) Activités biologiques

Plusieurs propriétés pharmacologiques ont été mises en évidence parmi lesquelles les activités tumorigène, infertile, mycotoxique et phototoxique et récemment insecticide.

PARTIE 2: METHODOLOGIE

I) Matériel

1) Lieu d'étude

L'étude chimique et les activités inhibitrice de l'acétylcholinestérase et antioxydante ont été réalisées au Département de Médecine Traditionnelle (DMT) de L'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) à Bamako tandis que les tests larvicides ont été effectués au laboratoire d'entomologie du MRTC (Malaria Research et Training Center) à la FMPOS.

2) Matériel végétal

2.1) Préparation des poudres

Pour la présente étude nous avons utilisés les parties des plantes suivantes:

- *Acacia nilotica* : les fruits entiers
- *Calotropis procera* : les feuilles et les branches
- *Euphorbia sudanica* : les écorces de tige et la tige
- *Hyptis suaveolens* : les feuilles

Les échantillons des différentes plantes ont été récoltés frais au jardin botanique du DMT pour les plantes *Calotropis procera* et *Hyptis suaveolens*, à Sangaréboucou pour *Euphorbia sudanica* et achetés au marché de Médine pour *Acacia nilotica*. Ces échantillons ont été séchés à l'ombre à la température du laboratoire du DMT pendant deux semaines. Ensuite ils ont été concassés dans un mortier traditionnel en bois et pulvérisés à l'aide d'un moulin moderne de la marque Retsch et de type SM 2000. Et enfin ils ont été conservés à la température ambiante du laboratoire avant usage.

Ces poudres obtenues ont servi d'une part à leur dosage en certaines substances et la caractérisation des groupes chimiques et d'autre part à la préparation des extraits pour les activités larvicides et biologiques (anticholinérasique et antioxydante).

Par ailleurs des échantillons de chaque plante ont été déposés dans l'herbarium du DMT pour identification.

2.2) Préparation des différents extraits

➤ Matériel de préparation

- Bain-marie (chauffe-ballon);
- Balance analytique de type SARTORUS;
- Ballon en verre de 1000 ml avec un col de 29/32
- Cartouche en tissu tergal (6 cm x 30 cm);
- Eprouvette graduée de 250 ml;
- Réfrigérant avec un col 29/32;
- Solvants : éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol;
- SOXHLET NS 29/32.

➤ L'extraction par les solvants à polarité croissante

❖ Principe

Le Soxhlet a été utilisé pour l'extraction par les solvants à polarité croissante. Les solvants suivants ont été utilisés:

- l'éther de pétrole ;
- le dichlorométhane ;
- et le méthanol.

Une quantité de 500 g (5 x 100 g) de la poudre à analyser a été introduite dans une cartouche placée dans le Soxhlet surmonté d'un réfrigérant et porté par un ballon contenant le solvant d'extraction (250 - 300 mL). Une série de plusieurs siphonages jusqu'à épuisement de la poudre a permis l'extraction par chacun des solvants utilisés selon le schéma de la **fig.2**.

Les extraits organiques ont été évaporés à l'air libre dans des flacons préalablement tarés.

Le marc (résidu) a été séché (1 heure) et utilisé pour une décoction. Les extraits polaires ont été évaporés au Rotavapor, récupérés dans des ballons préalablement tarés en vue d'une lyophilisation.

Les extraits secs organiques et les lyophilisats obtenus ont été pesés par la suite et les rendements (exprimés en %) ont été calculés selon la formule de la page 36. Ils ont ensuite été conservés dans des flacons en verre hermétiquement fermés.

NB : Il est bon de noter que différemment des autres extraits, l'extrait méthanolique est concentré jusqu'à sec au Rotavapor, repris avec de l'eau distillée, congelé et lyophilisé.

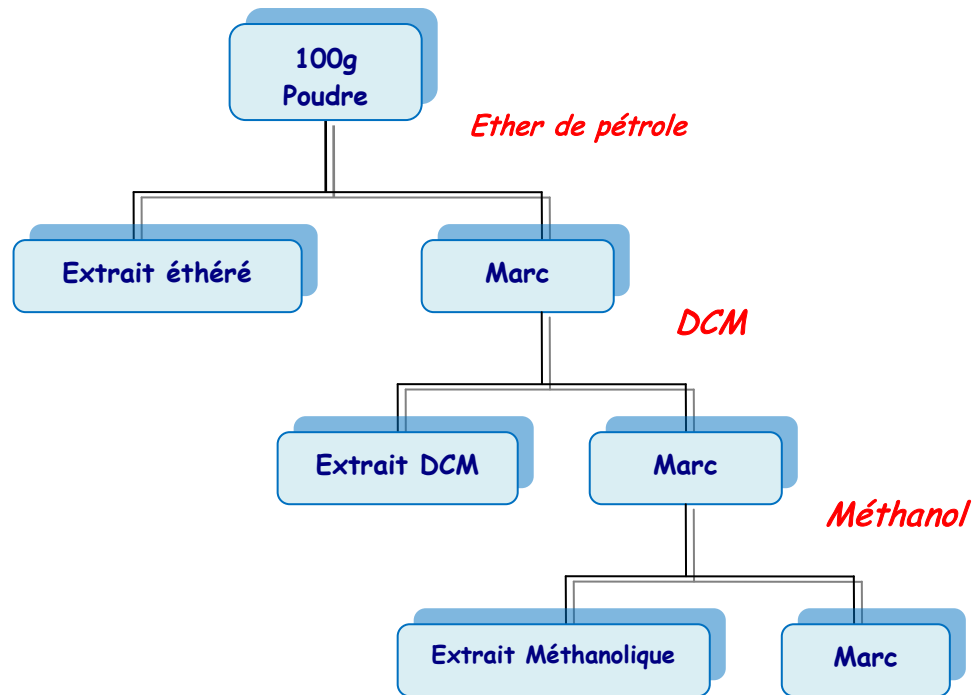


Fig.5: Schéma d'extraction par les solvants à polarité croissante

❖ Le mode opératoire

Sur un chauffe-ballon, il est placé un ballon sur lequel est fixé un Soxhlet contenant la cartouche chargée de la drogue, l'ensemble étant surmonté par le réfrigérant. La température du chauffe-ballon étant celle d'ébullition du solvant d'extraction correspondant. La drogue est extraite par le solvant dont les vapeurs condensées tombent dans la cartouche.

Lorsque le Soxhlet se remplit jusqu'à la partie supérieure du siphon, le solvant riche en produit se déverse dans le ballon: c'est le siphonage, et le mécanisme reprend.

Après épuisement de la drogue, l'extrait obtenu est concentré et conservé dans un flacon bien fermé. Le marc a été séché et repris par le solvant suivant. Procéder de la même manière pour les trois (3) solvants.

➤ L'extraction par décoction

❖ Principe

Le principe est de faire bouillir dans l'eau distillée pendant 10 mn le marc de la drogue de chaque plante obtenu après l'extraction au Soxhlet par les solvants organiques afin de récupérer les substances extractibles par l'eau à chaud.

❖ Le mode opératoire

En effet le marc de chaque plante a été préalablement pesé et mis dans un ballon de 5 L de volume auquel il a été ajouté la quantité d'eau distillée correspondant au 10 % du poids du marc. Ensuite le ballon contenant l'ensemble a été porté à ébullition sur un chauffe-ballon pendant 10 mn (Voir Fig.5). Le temps écoulé, le ballon est descendu pour refroidissement et filtration. Le filtrat obtenu est concentré au Rotavapor, congelé et lyophilisé. Le décocté de chaque plante a été ainsi préparé.

Les lyophilisats ont été conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés.

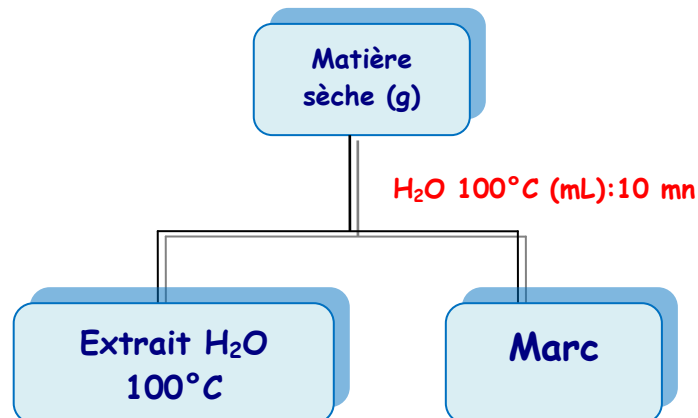


Fig.6: Schéma de l'extraction par la décoction

3) Matériel et réactifs pour l'étude phytochimique

- Balance analytique de précision (type SARTORIUS) ;
 - Four ;
 - Pinces ;
 - Spatule métallique ;
 - Creusets en porcelaine ou en fer ;
- Dessiccateur

- Ballon de 250 mL en verre ;
- Réfrigérant à reflux tube droit de 20 cm de long ;
- Tube collecteur gradué surmonté d'un tube cylindrique de condensation ;
- Source de chaleur (chauffe-ballon) ;
- Eau distillée ;
- Solvant non miscible à l'eau (toluène) ;
- Tubes à essai, éprouvette (50, 100, et 200 ml) ;
- Entonnoir, coton, papier filtre ;
- Pipettes en verre (5, 10 et 20 ml) ;
- Erlenmeyer (100 et 250 ml), poire ;
- Ampoule à décanter (250 ml) ;
- Bain-marie Buchi 461 water bath;

- Spatule, flacons, pince, crayon, règle, cutter, balance de type Sartorius, micropipettes, cuves avec couvercle, pulvérisateurs, plaque de Silice 60FG254, lampe UV ;
- Solvants: eau et acétate d'éthyle pour la dissolution des extraits (aqueux et organiques), acétate d'éthyle (extraits éther de pérole et DCM) et butanol- acide acétique-eau pour la migration des substances ;

- Révélateurs: réactifs de Godin, de $AlCl_3$ et $FeCl_3$.

4) Matériel pour l'activité larvicide

Le matériel biologique a été constitué des larves de *Anopheles gambiae s.l.* de deuxième et troisième générations issues des pontes collectives obtenues de femelles de l'insectarium du MRTC.

Le matériel de manipulation a été constitué de balance analytique, tubes falcon de 10mL et 50mL, eau distillée, eau de puits, chronomètre, scotch, plateau, boîte de Pétri, pipette, pots, tamis, picettes, DMSO.

- Composition de la nourriture des larves

La nourriture des larves est un aliment de chat de la marque Whiskas. Pour chaque recette nous avons cinq croquettes différentes (au thon, saumon, céréales, légumes et carottes):

- Céréales dont 4 % dans les croquettes aux céréales;
- Viandes et sous produits animaux, extraits de protéines végétales;
- Poisson et sous produits de poisson (dont 4 % de thon dans la croquette au thon, 4 % de saumon dans la croquette au saumon);
- Substances minérales, huiles et graisses légumes (dont 4 % de légumes dans la croquette aux légumes verts et 4 % de carottes dans la croquette aux carottes):
 - Sous produits végétaux, sucre et levure;
 - Additifs CEE avec anti-oxygène et colorants;
 - Protéine brute 35 %;
 - Matière grasse brute 7,5 %;
 - Cendres totales 7,5 %;
 - Cellule brute 1 %;
 - Humidité 10 % ;
 - Eléments minéraux: Calcium 1 %; Phosphore 1 %; Sodium 1 %.
- Vitamines:
 - Vit A : 10 000 UI / Kg;
 - Vit D : 900 UI / Kg;
 - Vit E : 95 UI / Kg.

5) Matériel pour l'activité d'inhibition de l'acétylcholinestérase

- Plaques CCM en aluminium, cuve de migration, crayons, lampes UV, Micropipettes, Captair, Pulvérisateur ultra-son.

Réactifs :

- 5,5 Dithiobis-2 nitrobenzoïque acide (DTNB) : 5mM
- Acétylcholinestérase (Ache) : 3unités/mL
- Acétylthiocholine iodide (ATCI) : 50mM
- Galanthamine
- Solution tampon de tris-HCl (pH= 8,0) : 50mM
- DMSO (Diméthylsulfoxyde)

- Solvants : Toluène, Acétate d'éthyle, Méthanol, Butanol, Acide acétique, Eau.

➤ Préparation de la solution mère et des concentrations finales

Nous avons préparé une solution stock encore appelée solution mère de 10 mg/mL et nous avons prélevé certains volumes que nous avons ensuite dilués avec de l'eau de puits pour obtenir les différentes concentrations en vue d'effectuer les tests larvicides. Pour cela, nous avons procédé comme suit:

- Solution stock (solution mère) de 10 mg/mL
- Dissoudre 200 mg d'extrait dans 20 mL de solvant (Eau, DMSO).
- Concentration (C1) = 2 mg/mL
- Pour 1 tube de 10 mL, nous avons besoin de 20 mg correspondant à 2 mL de stock.
- Prendre 2 mL de stock et compléter à 10mL avec l'eau de puits.
- Choisir 5 tubes, ajouter dans chaque tube 2 mL de stock et compléter à 10 mL avec de l'eau de puits.
- Concentration (C2) = 1 mg/mL
- Prendre 1 mL de stock et compléter à 10mL avec de l'eau de puits.
- Concentration (C3) = 0,5 mg/mL
- Prendre 500µL de stock et compléter à 10mL avec l'eau de puits.
- Concentration (C4) = 0,25 mg/mL
- Prendre 250 µL de stock et compléter à 10 mL avec l'eau de puits.

Tableau 1: Récapitulatif des concentrations et des volumes d'essai

Concentration (en mg/mL)	Concentration (en %)	Volume de stock/tube (en mL)	Volume d'eau de puits (en mL)	Volume total/essai (en mL)
2	0,2	2	8	10
1	0,1	1	9	5
0,5	0,05	0,5	9,5	2,5
0,25	0,025	0,25	9,75	1,25
			TOTAL	18,75

6) Matériel pour l'activité antioxydante

- Plaques de silicagel en aluminium ;
- Solvants de dissolution: 1mL de méthanol-eau (1-1), 1mL de DMSO ;

- Solvants de migration : ligroïne-acétate (1-1), butanol-acide acétique-eau (60-15-25) ;
- Révélateur : 2mg/mL de solution méthanolique de DPPH.

II) Méthodes d'études

1) Etudes phytochimiques

1.1) Dosage de certaines substances

La bonne conservation de la drogue (teneur en eau à l'état sec) et sa pureté (teneur en cendres) constituent des facteurs importants dans la détermination de sa composition chimique, de sa stabilité et de son intérêt pharmaceutique.

➤ Substances extractibles par l'eau

Faire une décoction pendant 15 mn avec 1g de poudre de la drogue végétale dans 20 ml d'eau distillée. Mettre le filtrat dans une capsule préalablement tarée et évaporée à sec. La capsule est ensuite pesée à froid et la masse du résidu réduit.

❖ Teneur en eau

Deux méthodes ont été utilisées pour le dosage de l'eau :

- Méthode gravimétrique
 - Principe

C'est une méthode pondérale qui consiste en la détermination de la perte en masse d'une quantité connue de poudre par dessiccation à l'étuve ou au four réglé à la température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h.

- Mode opératoire

Tarer cinq verres de montre (notés T₁ à T₅) et y introduire des prises d'essai (PE) d'environ 3g. Peser ensuite les verres de montre contenant les poudres (notés P₁ à P₅) avant de les introduire dans le four réglé à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pour une dessiccation pendant 24 h. Le temps écoulé, sortir les verres du four et les refroidir dans un dessiccateur contenant un desséchant (chlorure de calcium, anhydride phosphorique) et les avons ensuite pesés (notés P'₁ à P'₅).

La masse d'eau contenue dans la poudre de chaque verre de montre notée M est donnée par la formule suivante :

$$M = P - P'$$

La masse de la prise d'essai est :

$$PE = P - T$$

Le calcul suivant permet d'obtenir le pourcentage en eau :

$$\% \text{ eau} = 100 \times \frac{\text{Masse eau}}{\text{Masse PE}}$$

La moyenne des pourcentages d'eau des 5 verres de montre est ensuite calculée comme suit :

$$\text{Moyenne des \% eau} = \frac{\sum 5 \text{ pourcentages d'eau}}{5}$$

- Méthode par entraînement azéotropique
 - Principe

Cette méthode encore appelée méthode volumétrique consiste à mesurer le volume d'eau entraîné par distillation à température constante d'un solvant non miscible à l'eau auquel une masse de drogue végétale est ajoutée. L'eau se condense dans la partie inférieure du tube collecteur gradué et son volume est lu.

- Mode opératoire

Introduire dans un ballon sec 1 mL d'eau distillée et 100 mL de toluène.

Procéder à la distillation pendant une heure 1 h et laisser reposer pendant trente minutes (30 mn).

Lire le volume initial (V_i) d'eau.

Introduire ensuite dans le ballon une prise d'essai (PE) de 5 g de poudre de la drogue et faire bouillir l'ensemble pendant 1h. Laisser reposer pendant 30 mn.

Lire le volume final (V_f) d'eau dans l'appareil.

Le pourcentage d'eau dans la drogue est déterminé par le calcul suivant :

$$\% \text{ d'eau dans la drogue} = 100 \times \frac{V_f - V_i}{PE}$$

➤ Détermination de la teneur en cendres

❖ Cendres totales

Les cendres proviennent des tissus de la plante ou des éléments étrangers (sable, terre...) adhérant à la drogue végétale. Elles sont obtenues par calcination complète de la matière végétale dans l'air.

La teneur en cendres est obtenue par dosage pondéral des cendres blanches obtenues par calcination de la drogue végétale dans un four.

Mode opératoire

Il s'agit de peser 3 prises d'essai de la drogue (M) dans 3 creusets en silices préalablement tarées (T).

Après incinération au four à une température d'environ 600°C pendant 6 h, et refroidissement dans un dessiccateur, déterminer la masse des creusets contenant les prises d'essai et les noter M'1, M'2 et M'3.

La masse moyenne en cendres totales (MCt) contenue dans le creuset est donnée par la formule qui suit:

$$MCt = 100 \times \frac{(M'1 - T1) + (M'2 - T2) + (M'3 - T3)}{PE}$$

La masse moyenne de la prise d'essai (PE) est donnée par la formule qui suit:

$$PE = \frac{(M1 + M2 + M3)}{3}$$

Le pourcentage des cendres totales (% Ct) est donné par la formule qui suit:

$$\% Ct = 100 \times \frac{MCt}{PE}$$

❖ Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique à 10 %

C'est une évaluation du contenu en constituants siliceux de la matière végétale. Ces cendres sont déterminées à partir de l'action de l'acide chlorhydrique dilué à 10 % sur les cendres totales.

Après l'introduction de la totalité des cendres totales dans un erlenmeyer et l'addition de 20 mL d'acide chlorhydrique à 10 %, l'ensemble est porté à ébullition pendant 15 mn au bain-marie. Après refroidissement, recueillir, laver la matière non soluble sur un papier filtre sans cendre, puis transférer le filtre dans un creuset sec préalablement taré (T).

Le creuset contenant le papier filtre est ensuite séché à l'étuve pendant 24 heures et calciné pendant 6 heures au four à la température de 600°C. Après refroidissement dans le dessiccateur, peser le creuset contenant les cendres (M').

- La masse des cendres chlorhydriques (MCc) est donnée par la formule :

$$MCc \text{ (masse cendre chlorhydrique)} = M' - T$$

- La masse de la prise d'essai (PE) est la masse de poudre utilisée pour les cendres totales.
- Le pourcentage des cendres chlorhydriques (% Cc) s'obtient de la manière suivante :

$$\% Cc = 100 \times \frac{MCc \text{ (masse cendre chlorhydrique)}}{PE}$$

❖ Détermination de la teneur en cendres sulfuriques

C'est une méthode d'évaluation des substances inorganiques contenues dans la drogue végétale. Les cendres sulfuriques sont obtenues après une attaque de la drogue par l'acide sulfurique à 50 %.

La teneur est déterminée par dosage pondéral des sulfates non volatils obtenus par calcination de la matière végétale préalablement traitée avec de l'acide sulfurique dilué au ½. Les sulfates résultent de la conversion des sels organiques.

Dans un creuset en quartz sec préalablement taré (T), introduire une prise d'essai de la poudre et peser l'ensemble (M).

Ensuite humecter la poudre avec une quantité suffisante d'acide sulfurique dilué au ½ et triturer avec une baguette.

Le creuset est laissé à l'étuve jusqu'à évaporation à sec puis mis au four à la température de 600 °C pendant 6 heures. Peser le creuset après refroidissement (M'). La masse des cendres sulfuriques (MCs) s'obtient comme suit :

$$MCs = M' - T$$

La masse de la prise d'essai est : $PE = M - T$

Le pourcentage des cendres sulfuriques (% Cs) est donné par la formule suivante :

$$\% Cs = 100 \times \frac{MCs}{PE}$$

1.2) Calcul de rendement des extraits

Pour déterminer l'extractibilité des différents solvants, nous avons calculé le rendement selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = 100 \times \frac{\text{Masse de lyophilisat}}{\text{Masse de la poudre}}$$

1.3) Réactions en tube: caractérisation des groupes chimiques

➤ Les alcaloïdes

Ils forment un groupe important de substances naturelles azotées qui agissent comme des bases d'intérêt thérapeutique de par leur diversité structurale et l'éventail de leurs activités pharmacologiques (Bruneton, 1993).

❖ Solution à analyser

A 10 g de drogue végétale, ajouter 50 mL d'acide sulfurique dilué au 1/10 dans un erlenmeyer de 250 mL. L'ensemble est laissé en macération à la température du laboratoire pendant 24 heures puis filtré. Le filtrat obtenu est complété à 50 ml avec de l'eau distillée.

❖ Caractérisation

Prendre 2 tubes à essai dans chacun desquels introduire 1 mL de filtrat. Dans le premier tube, ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer (solution de mercuri-iodure de potassium) et dans le deuxième tube 5 gouttes de réactif de Dragendorff (solution de iodo-bismuthite de potassium).

La présence d'alcaloïdes est caractérisée par la formation d'un précipité dans chaque tube.

➤ Les substances polyphénoliques

❖ Solution à analyser

La solution à analyser est un infusé à 5 %. Dans un erlenmeyer de 250 mL, introduire 5g de la drogue végétale puis 100 mL d'eau bouillante et laisser infuser 15 mn. Le filtrat est complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

❖ Caractérisation

▪ Tanins

Ce sont des esters de l'acide gallique ou de glucose. Leur pouvoir à former des complexes avec les macromolécules précisément les protéines justifie leurs propriétés biologiques.

Dans un tube à essai contenant 1 mL de l'infusé, ajouter 1 mL de FeCl_3 diluée à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

▪ Les tanins catéchiques

A 5 mL de l'infusé à 5 %, ajouter 1 mL d'alcool chlorhydrique (5 mL d'éthanol 95° alcoolique, 5 mL d'eau distillée, 5 mL d'HCl concentré) et porter l'ensemble à ébullition pendant 15 mn.

La présence de tanins catéchiques est marquée par la formation d'un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique.

▪ Les tanins galliques

A 30 mL de l'infusé à 5 %, ajouter 15 mL de réactif de Stiasny (10 mL de formol à 40 %, 15 mL d'acide chlorhydrique concentré) et chauffer au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques.

Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé, ajouter 1 mL goutte à goutte d'une solution de FeCl_3 à 1 %, le développement d'une teinte bleu-noire montre la présence de tanins galliques.

➤ Les flavonoïdes

Ce sont les pigments universels des végétaux responsables de la coloration des fruits, des fleurs et souvent des feuilles.

A l'infusé à 5 % présentant une coloration plus ou moins foncée, ajouter un acide 5 mL de H_2SO_4 à 10 % puis une base 5 mL de NH_4OH . Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes.

❖ Réaction à la cyanidine

Introduire dans un tube à essai 5 mL de l'infusé à 5 %, ajouter 5 mL d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95 %, l'eau distillée, HCl concentré à parties égales en volumes) ; puis quelques copeaux de magnésium et 1 mL d'alcool isoamylique.

L'apparition d'une coloration rose-orangée (flavones) ou rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.

La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

➤ Les leucoanthocyanes

Il faut réitérer la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 mn au bain-marie.

La présence de leucoanthocyanes se manifeste par une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brun-rouge.

➤ Les Dérivés anthracéniques

Ils appartiennent au groupe des quinones. Ils se caractérisent par leur pouvoir oxydant élevé.

❖ Les anthraquinones libres

▪ Solution à analyser

A 1g de la drogue végétale, ajouter 10mL de chloroforme et chauffer pendant 3 mn au bain-marie. Filtrer à chaud et compléter le filtrat à 10 mL.

▪ Caractérisation

A 1 mL de l'extrait chloroformique obtenu, additionner 1 mL d'ammoniaque dilué au 1/2 et agiter.

La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

❖ Les anthraquinones combinées

▪ Les O-hétérosides

Il s'agit de préparer un hydrolysât à partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme auquel il faut ajouter 10 mL d'eau et 1 mL d'acide chlorhydrique

concentré. Maintenir le tube à essai au bain-marie bouillant pendant 15 mn. Filtrer et compléter le filtrat à 10 mL. Agiter 5 mL de l'hydrolysate avec 5 mL de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai. Nous avons gardé la phase aqueuse.

A la phase organique, ajouter 1 mL d'ammoniaque dilué au 1/2. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence d'anthraquinones.

Si la réaction est négative ou faiblement positive, rechercher les *O*-hétérosides à génine réduite.

Prélever 5 ml de l'hydrolysate et ajouter 3 à 4 gouttes de $FeCl_3$ à 10 %. Chauffer pendant 5 mn au bain-marie puis refroidir sous courant d'eau. Ensuite agiter avec 5 mL de chloroforme puis soutirer la phase chloroformique qui sera introduite dans un tube à essai et y ajouter 1 mL d'ammoniaque dilué enfin agiter.

En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.

- Les *C*-hétérosides

La solution à analyser est la phase aqueuse obtenue avec la solution à analyser des

O-hétérosides. A cette solution, ajouter 10 mL d'eau distillée et 1 mL de $FeCl_3$ à 10 %. Le tube à essai est maintenu au bain-marie bouillant pendant 30 mn puis refroidi sous un courant d'eau. Agiter avec 5 ml de $CHCl_3$ puis soutirer la phase chloroformique et y ajouter 1 mL d'ammoniaque diluée au 1/2.

L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de *C*-hétérosides.

- ❖ Les quinones

A 1g de drogue végétale humectée avec de l'acide sulfurique à 10 %, additionner 20 mL d'un mélange à volume égal d'éther et de chloroforme. Après une macération de 24 heures, 5 mL du filtrat obtenu sont évaporés à l'air, puis le résidu repris par quelques gouttes d'éthanol à 95 %. Ajouter goutte à goutte une solution d'acétate de nickel à 5 %.

La réaction positive se caractérise par une coloration rouge.

- Les stérols, triterpènes et caroténoïdes

❖ Solution à analyser

L'extrait à tester est obtenu à partir de 1 g de la drogue végétale et 20 mL d'éther de pétrole laissés en macération pendant 24 heures. Filtrer et compléter à 20 mL avec de l'éther de pétrole.

❖ Caractérisations

▪ Les stérols et triterpènes

Evaporer à sec 10 mL d'extrait dans un tube à essai, puis dissoudre le résidu dans 1 mL d'anhydride acétique et dans 1 mL de chloroforme. Partager dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin puis mettre dans le fond du second tube à l'aide d'une pipette 1 à 2 mL d'acide sulfurique concentré.

A la zone de contact des deux 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 tri terpènes.

▪ Les caroténoïdes

Après évaporation jusqu'à sec de 5 mL d'extrait, ajouter 2 à 3 gouttes d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme. Il se développe en présence de caroténoïdes une coloration bleue devenant rouge par la suite.

➤ Les hétérosides cardiotoniques

Ils forment un groupe homogène possédant un intérêt thérapeutique réel. Ils demeurent des médicaments majeurs de l'insuffisance cardiaque.

❖ Solution à analyser

Nous avons introduit 1 g de la drogue végétale dans un tube à essai et ajouté 10 mL d'éthanol à 60 % et 5 mL d'une solution d'acétate neutre de plomb à 10 %. L'ensemble est porté en ébullition et filtré après refroidissement.

❖ Caractérisation

Agiter le filtrat avec 10 mL de chloroforme (CHCl_3) en évitant la formation d'émulsion. Après décantation dans une ampoule à décanter, la phase chloroformique est soutirée à l'aide d'une pipette puis partagée entre 3 tubes à essai et évaporée à sec au bain-marie bouillant. Reprendre les résidus avec 0,4 mL d'isopropanol.

Dans chacun des trois tubes, ajouter respectivement 1 mL de réactif de Baljet, 1 mL de réactif de Kedde et 1 mL de réactif de Raymond-Marthoud. Enfin,

introduire dans chaque tube 2 gouttes de KOH à 2 % dans l'éthanol à 80°. Après 10 mn de contact, en présence d'hétérosides cardiotoniques, les colorations suivantes se développent :

Tube 1 (Baljet) : orangée

Tube 2 (Kedde): rouge violacée

Tube 3 (Raymond-Marthoud) : violet fugace

➤ Les saponosides

Ce sont des hétérosides caractérisés par leurs propriétés tensioactives.

❖ Solution à analyser

La solution à analyser est un décocté à 1 %. D'abord porter à ébullition dans un erlenmeyer de 250 mL, 100 mL d'eau distillée et y projeter 1 g de poudre de la drogue végétale. Une ébullition modérée doit être maintenue pendant 15 mn. Enfin filtrer et ajuster après refroidissement à 100 mL.

❖ Caractérisation

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, répartir successivement 1, 2, ..., 10 mL du décocté à 1 %. Le volume de chaque tube est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde dans le sens de la longueur, laisser au repos pendant 15 mn puis la hauteur de la mousse est mesurée.

L'indice de mousse (I.M) est calculé à partir du tube dans lequel la hauteur de la mousse a été de 1cm.

$$\text{Indice de mousse} = \frac{1000}{N}$$

N= numéro du tube concerné.

➤ Autres caractérisations

❖ Les composés réducteurs

Prendre 5 mL du décocté aqueux à 10 % et évaporer au bain-marie jusqu'à sec. Ajouter au résidu 1 mL de réactif de Fehling (0,5 mL réactif A + 0,5 mL réactif B, mélange extemporané).

L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs.

❖ Les oses et holosides

Prendre 5 mL du décocté aqueux à 10 % dans un bêcher et évaporer à sec. Ajouter au résidu 2 à 3 gouttes de H₂SO₄ concentré puis après 5 mn, 3 à 5 gouttes d'alcool saturé avec du thymol.

L'apparition d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides.

❖ Les mucilages

Ajouter à 1 mL de décocté à 10 % 5 mL d'éthanol absolu.

L'obtention après une dizaine de minutes d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages.

➤ Les coumarines

Evaporer à sec 5 mL d'extrait éthéré (obtenu après une macération de 24 heures) puis reprendre le résidu avec 2 mL d'eau chaude. Partager la solution entre deux tubes à essai. Ajouter dans l'un des tubes 0,5 mL d'ammoniaque à 25 % et observer la fluorescence sous UV 366 nm.

Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines.

➤ Les hétérosides cyanogénétiques

A 1 g de la drogue végétale, ajouter à volume égal 5 mL d'un mélange d'eau et de toluène. Bien agiter, nettoyer la partie supérieure du tube à essai et y fixer à l'aide d'un bouchon le papier picrosodé fraîchement préparé.

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

1.4) Chromatographie sur couche mince (CCM)

➤ Principe

C'est une méthode physico-chimique de séparation composée de :

- une phase stationnaire;
- une phase mobile.

La phase stationnaire est composée d'une couche mince et uniforme (de silicagel de 0,25 mm d'épaisseur) étalée sur un support approprié (feuille en aluminium).

La phase mobile ou éluant est le système de solvant utilisé pour faire migrer l'extrait, il se propage à la surface de la plaque par capillarité.

La CCM permet de suivre :

- l'efficacité des extractions avec différents solvants
- l'appréciation de la séparation des constituants de l'extrait grâce à l'observation sous l'UV (rayon ultra-violet) et aux facteurs de rétention ;
- la connaissance des différents groupes chimiques grâce aux révélateurs (différentes colorations) et permettre ainsi une bonne orientation.

➤ Les dépôts

Peser 10 mg d'extraits dans des flacons ; dissoudre dans 1mL de solvant de dissolution convenable. Déposer sur les plaques 10 microlitres des différentes solutions à l'aide de micropipettes graduées. Introduire les plaques dans des cuves pour la migration.

➤ La migration

La plaque ainsi préparée est plongée dans la chambre à chromatographie préalablement saturée par l'éluant.

L'éluant est d'abord préparé puis versé dans la cuve à chromatographie hermétiquement fermée pendant 20 mn au moins, temps idéal de saturation de la cuve.

La cuve est en verre pour permettre d'observer la migration du solvant dont la vitesse d'éluion est fonction de sa viscosité. La plaque est retirée de la cuve lorsque l'éluant arrive à 1 cm du bord supérieur. La capillarité de la phase mobile permet une séparation des différents constituants en fonction de leurs facteurs de rétention (R_f). Après migration, nous avons séché les plaques et procédé à l'observation sous lampe ultraviolette aux longueurs d'ondes 254 et 366 nm.

Calculer ensuite les facteurs de rétention (R_f) de chacune des taches observées :

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

2) Détermination de l'activité larvicide

Elle a consisté à mettre en évidence les propriétés larvicides des différents extraits des quatre plantes.

➤ Méthode

La méthode de notre test est inspirée de la technique des tests de sensibilité normalisés par l'OMS et adoptée pour tester la sensibilité des larves vis-à-vis des insecticides utilisés en campagne de lutte (OMS 1993).

A partir de l'extrait initial (solution stock 10 mg/mL ou 0,1 %) de chaque plante et l'eau de puits, des concentrations de 2 %, 1 %, 0,5 % et 0,25 % sont préparées. Les tests sont réalisés dans des tubes à essai de 15 mL contenant chacun 5 mL d'eau de puits et 20 larves de moustiques de *Anopheles gambiae*. Le même nombre de larves est placé dans un tube témoin contenant 10 mL d'eau de puits. La formule d'Abbot a été utilisée pour la correction des résultats et juger de la validité du test. En effet un taux de mortalité des témoins inférieur à 5% est négligeable tandis que lorsqu'il dépasse 15% le test est invalide. Lorsque le taux de mortalité des témoins est compris entre 5% et 15%, une correction est nécessaire selon la formule d'Abbot suivante:

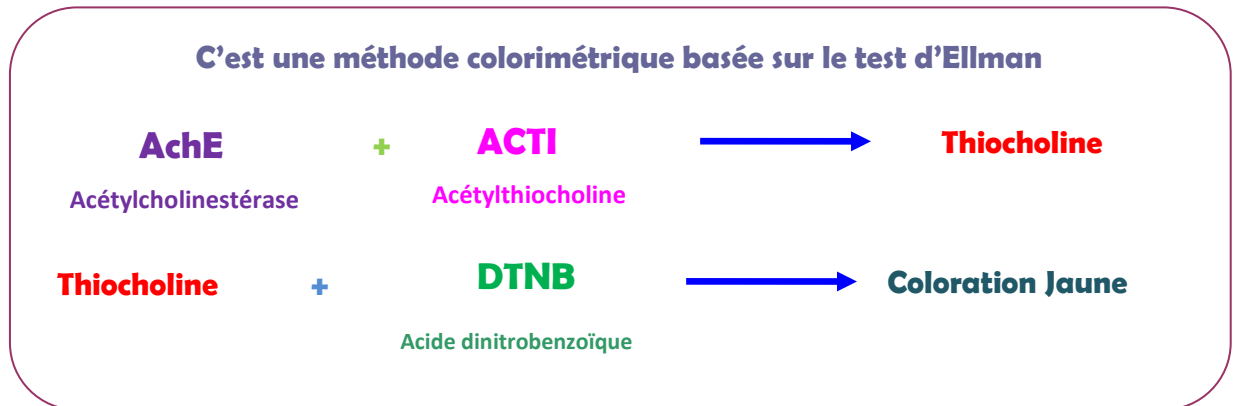
$$\text{Mortalité corrigée (en \%)} = \frac{[(\% \text{mortalité observée}) - (\% \text{mortalité témoin})] \times 100}{100 - \% \text{ mortalité témoin}}$$

Pour chacune des concentrations de l'extrait ainsi que pour le témoin, cinq répétitions sont effectuées. Le taux de mortalité est calculé en terme de moyenne des quatre déterminations portant chacune sur 20 individus.

En effet 200 mg de chaque extrait de chacune des plantes sont pesés et dissous dans 20 mL de DMSO pour les extraits organiques (extraits éther de pétrole, dichlorométhane et méthanolique) et dans 20 mL d'eau distillée pour les extraits aqueux (décocté). Ensuite sont mis dans les tubes à essai de 15 mL, 5 mL d'eau de puits auxquelles sont ajoutées 20 larves suivies du volume correspondant de la solution mère. Le volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau de puits et l'ensemble est laissé à la température ambiante du laboratoire pour déterminer le nombre de larves mortes aux temps de 30 mn, 1 heure et 24 heures d'exposition des larves. Il faut noter qu'à chaque test un tube témoin contenant 20 larves avec 10 mL d'eau de puits est utilisé et pour chaque concentration, le test est répété 5 fois. Les larves sont considérées mortes lorsqu'elles seront immobilisées au fond du tube à essai et elles sont transférées dans de l'eau distillée puis observées à l'œil nu pour le comptage de morts (Aouinty et coll, 2006).

3) Détermination de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

- Méthode pour l'activité anticholinestérasique :



- Procédure :

Elle est basée sur deux réactions:

❖ Réaction de vrai positif

- a. Appliquer (10µl) des extraits ou le produit standard sur la plaque
- b. Développer les plaques avec un système de solvant : Chloroforme - Méthanol (8:2)
- c. Sécher la plaque
- d. Pulvériser avec la solution (ACTI + DTNB)
- e. Sécher la plaque pendant 3-5 mn
- f. Pulvériser avec solution Acétylcholinestérase (3UI/ml AchE)
- g. Observer et enregistrer automatiquement les spots blancs indiquant l'activité sur la plaque sur fonds Jaune.

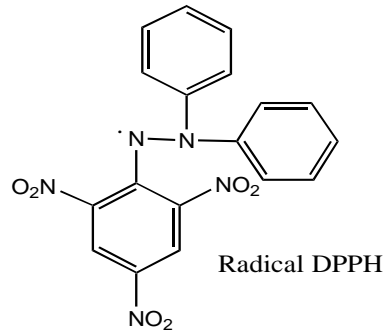
❖ Réaction de faux positif

Opérer comme dans la réaction de vrai positive jusqu'à l'étape c.

- d. Pulvériser avec la solution acide dinitrobenzoïque (5mM DTNB)
- e. Sécher la plaque pendant 3-5 mn
- f. Pulvériser avec la solution (ATCI + AchE) à la proportion de 5mM
- g. Observer et enregistrer les spots blancs sur fond jaune.

4) Détermination de l'activité antioxydante

Cette activité a été déterminée par le principe de la réduction du radical DPPH (1-1 Diphényl 2 picryl hydrazine) sur plaque de CCM.



❖ Principe



La réduction du DPPH° s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Tous les extraits ont été soumis à ce test. Un mélange méthanol-eau (1 : 1) a servi à la dissolution des extraits polaires (MeOH et décocté) tandis que les extraits apolaires (Ether de pétrole et DCM) ont été dissouts dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde). En effet 10 mg de chaque extrait ont été dissouts dans 1 mL de solvant approprié. Des dépôts de 10 μL de chaque solution d'extrait ont été réalisés sur des plaques de Silicagel. Le système de solvants Ligroïne : Acétate d'éthyle aux proportions selon les cas (1 : 1), (2 : 1) a été employé pour la migration des extraits apolaires tandis que le système Butanol-Acide acétique-eau à la proportion (60 : 15 : 25) a été utilisé pour la migration des extraits polaires.

Après la migration des substances, les plaques de CCM ont été révélées avec une solution méthanolique à 2 mg/mL de 1-1Diphényl 2 picryl hydrazine. Les substances actives sont apparues en tâche jaune sur fond violet (Diallo et coll., 2001).

PARTIE 3: RESULTATS

I) Teneurs de certaines substances dosées

Tableau 2: Teneurs (en %) de certaines substances dosées dans les poudres des parties utilisées des différentes plantes

	<i>Acacia nilotica</i> (fruits entiers)	<i>Calotropis procera</i> (feuilles et branches)	<i>Euphorbia sudanica</i> (écorces de tige et tige)	<i>Hyptis suaveolens</i> (feuilles)
Substances extractibles par eau	10	15	14	11
Teneur en eau (Gravimétrique)	2,50	6,3	2,4	5,54
Teneur en eau (Azéotrope)	8	6	6	8
Cendres totales	4,40	15,55	7,57	10,8
Cendres sulfuriques (50%)	5,68	19,33	11,66	14,62
Cendres chlorhydriques (10%)	2,22	0,42	0,5	2,47

Nous avons constaté que plusieurs principes actifs sont extractibles par l'eau avec des teneurs variant de 10 % à 15 %. Aussi nous avons noté que toutes nos drogues ont une teneur en eau inférieure à 10 %.

II) Extractions

Tableau 3: Caractéristiques des extraits des différentes plantes étudiées

Plantes	Extraits	Rendement en %	Coloration	Aspects
<i>Acacia nilotica</i>	Ether de pétrole	5,17	Ocre tendance froide	Pâteux
	Dichlorométhanique	7,33	Jaune tendance froide	Poudre
	Méthanolique	6,51	Terre de sienne naturelle	Floconneux
	Décocté	68,53	Terre d'ombre brûlée	Floconneux
<i>Calotropis procera</i>	Ether de pétrole	6,53	Vert intense foncé	Friable
	Dichlorométhanique	3,32	Noir verdâtre	Pâteux
	Méthanolique	6,13	Vert émeraude	Pâteux
	Décocté	41,84	Terre d'ombre brûlée	Floconneux
<i>Euphorbia sudanica</i>	Ether de pétrole	11,26	Ocre tendance froide	Pâteux
	Dichlorométhanique	8,03	Gris chaud	Pâteux
	Méthanolique	13,06	Noir chaud	Floconneux
	Décocté	68,53	Sienne claire	Floconneux
<i>Hyptis suaveolens</i>	Ether de pétrole	13,13	Gris chaud	Pâteux
	Dichlorométhanique	7,45	Noir verdâtre	Pâteux
	Méthanolique	13,73	Noir verdâtre	Floconneux
	Décocté	63,78	Ocre foncée	Friable

Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec les décoctés alors que les plus faibles l'ont été avec les extraits DCM exceptés *Acacia nilotica* où le rendement le plus faible a été obtenu avec l'extrait éther de pétrole. Des 16 extraits, 6 ont donné un aspect floconneux, 7 un aspect pâteux tandis que 2 étaient friables.

III) Réactions de caractérisations

Nous avons effectués deux types de caractérisations :

- ✎ Les réactions en tube
- ✎ La chromatographie sur couche mince

1) Les réactions en tube

Le tableau 5 présente les groupes chimiques obtenus par les réactions en tube.

Tableau 4: Groupes chimiques caractérisés dans les poudres des différentes plantes

Substances recherchées	Plantes étudiées			
	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Calotropis procera</i>	<i>Euphorbia sudanica</i>	<i>Hyptis suaveolens</i>
Coumarines (Fluorescence U.V. 366 nm)	- - -	+++	+++	+++
Antracénosides libres (Borntrager)	+++	- - -	- - -	- - -
Flavonoïdes : Génines flavoniques (Shibata)	- - -	- - -	- - -	+++
Flavonoïdes : Hétérosides flavoniques (Shibata)	- - -	- - -	- - -	+
Saponosides : Mousse	- - -	- - -	- - -	+++
Saponosides : Indice de mousse	- - -	- - -	- - -	+++
Tanins : Réaction avec FeCl ₃	+++	- - -	+++	+++
Tanins : Réaction avec HCl	+++	- - -	+++	+++
Tanins catéchiques : Réaction de Stiasny	+++	- - -	+++	+++
Tanins galliques : Réaction Stiasny	+++	- - -	+++	+++
Oses et holosides	+++	- - -	+++	- - -
Polyuronides (mucilages)	+++	- - -	- - -	+++
Stéroles et triterpènes : Hétérosides triterpéniques (Lieberman)	- - -	+++	- - -	- - -
Stéroles et triterpènes : Stéroïdes (Liebermann)	+++	+++	+++	+++
Hétérosides cardiotoniques (Raymond-Marthoud)	+++	+++	+++	+++
Hétérosides cardiotoniques (Kedde)	+++	+++	+++	+++
Hétérosides cardiotoniques (Baljet)	+++	+++	+++	+++
Leucoanthocyanes	- - -	- - -	+	- - -

Légende

- +++ : Présence abondante de la substance chimique
- + : Traces de la substance chimique
- - - : Absence de la substance chimique

Les hétérosides cardiotoniques et les stéroles et triterpènes ont été les plus importants car retrouvés au niveau de toutes les plantes. Ensuite viennent les tanins et les coumarines et enfin les oses et holosides, les flavonoïdes, les polyuronides et les saponosides.

2) Chromatographie sur couche mince

Le Tableau 6 présente les groupes chimiques identifiés par les réactions sur plaques CCM.

Tableau 5: Facteurs de rétention des substances des extraits ayant réagit avec l' AlCl_3 après migration dans le B:A:W (60:15:25)

Plantes	Extraits	Coloration	Rf
<i>Acacia nilotica</i>	Méthanolique	Jaune de cadmium moyen	0,50
		Jaune citron	0,74
	Décocté	Jaune de cadmium moyen	0,87
		Jaune citron	0
<i>Calotropis procera</i>	Méthanolique	Jaune	0,26
<i>Hyptis suaveolens</i>	Méthanolique	Jaune	0,93
	Décocté	Ocre jaune clair	0,93
		Ocre jaune clair	0
		Jaune de cadmium moyen	0,16
		Jaune	0,74

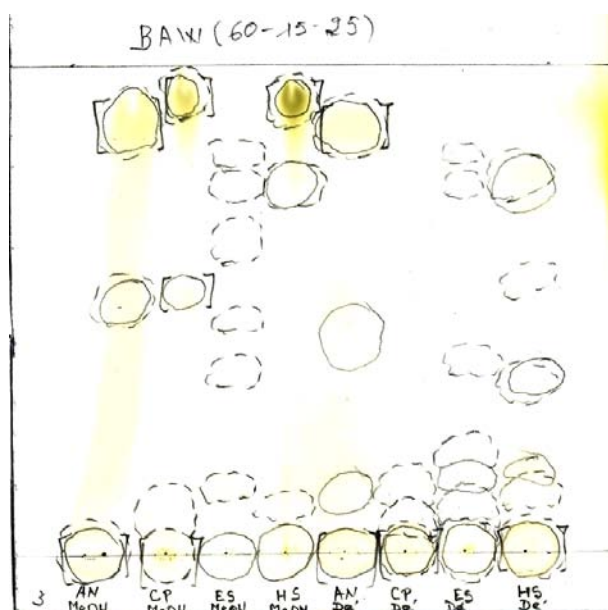
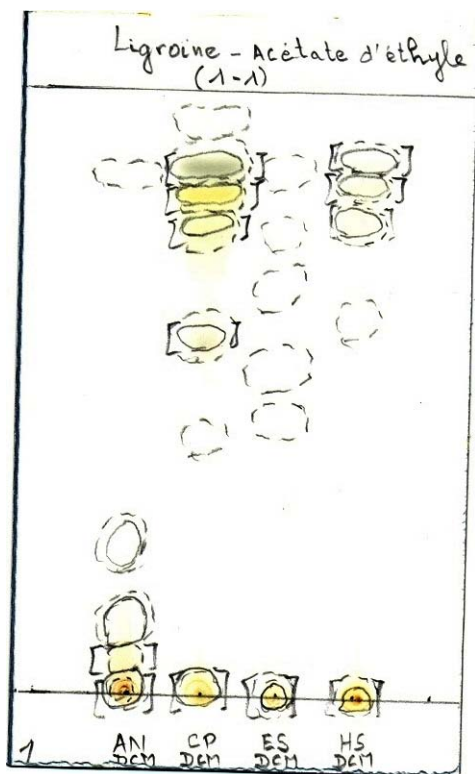


Fig.7: Plaque CCM révélée par l' AlCl_3

Conditions de déroulement du test sur la plaque

- Front du solvant : 8 cm
- Support : Plaque en silice d'aluminium
- Dépôt : 10 μL
- Eluant : Butanol-Acide acétique-Eau (60-15-25)
- Révéléateur : Réactif de l' AlCl_3

Les colorations jaunes visibles sur la plaque après révélation par l' AlCl_3 pourraient s'agir de substances polyphénoliques en particulier les flavonoïdes aux Rf 0,87 pour *Acacia nilotica*, 0,93 pour *Calotropis procera* et *Hyptis suaveolens*.



Conditions de déroulement du test sur la plaque

- Front du solvant : 8 cm
- Support : Plaque en silice d'aluminium
- Dépôt : 10µL
- Eluant : Ligroïne-Acétate d'éthyle (1-1)
- Révéléateur : Réactif de l'AlCl₃

Fig.8: Plaque CCM des extraits DCM révélée par l'AlCl₃

Les tâches jaunes observées sur la plaque aux dépôts pour les quatre extraits et aux Rf 0,82 et 0,87 pour *Calotropis procera* après révélation par l'AlCl₃ pourraient insinuer la présence de composés polyphénoliques particulièrement les flavonoïdes.

Tableau 6: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits DCM ayant réagi avec l'AlCl₃ après migration dans le système de solvants Ligroïne:Acétate d'éthyle (1:1) :

Plantes	Coloration	Rf
<i>Acacia nilotica</i>	Ocre jaune	0
	Jaune tendance froide	0,06
<i>Calotropis procera</i>		0
	Jaune tendance froide	0,59
		0,77
	Jaune	0,82
	Jaune	0,87
<i>Euphorbia sudanica</i>	Jaune tendance froide	0
<i>Hyptis suaveolens</i>	Jaune	0

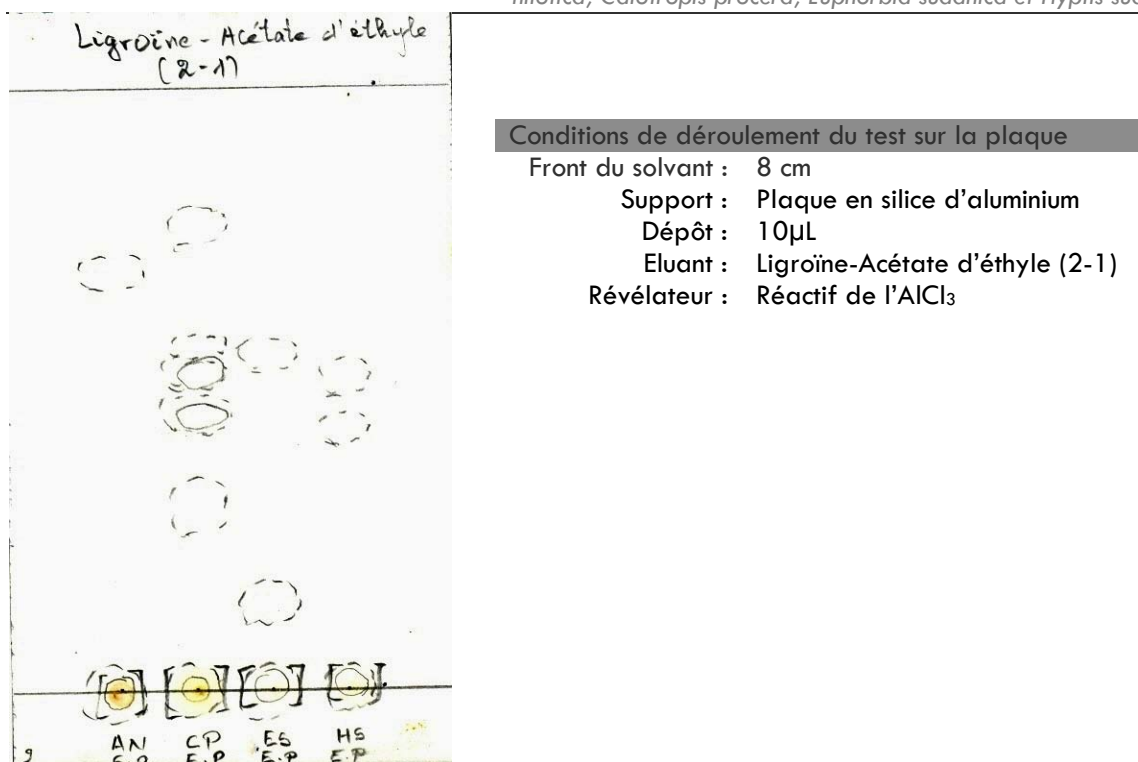
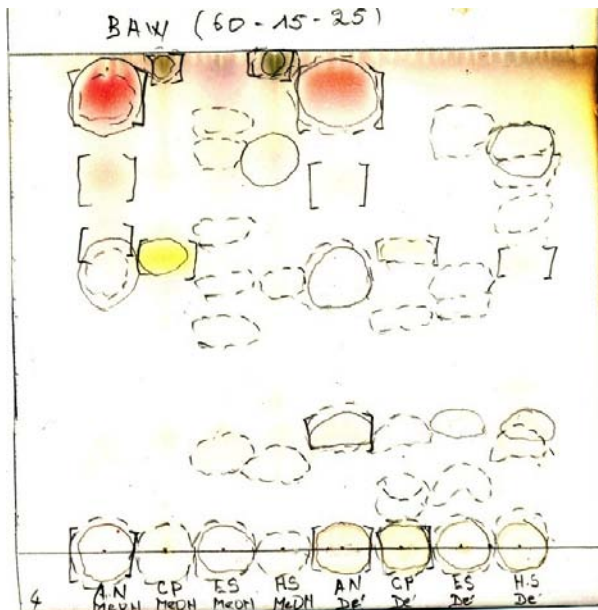


Fig.9: Plaque CCM des extraits Ether de pétrole révélée par l' $AlCl_3$

Les extraits éther de pétrole de *Acacia nilotica* et *Calotropis procera* ont présenté une tache jaune chacun à la base après révélation par l' $AlCl_3$ ce qui laisse penser qu'ils contiennent des flavonoïdes.

Tableau 7: Extraits de Ether de pétrole ayant réagi avec l' AlCl_3 après migration dans le système de solvant Ligroïne:Acétate d'éthyle (2:1)

Plantes	Coloration	Rf
<i>Acacia nilotica</i>	Ocre jaune clair	0
<i>Calotropis procera</i>	Jaune clair	0



Conditions de déroulement du test sur la plaque

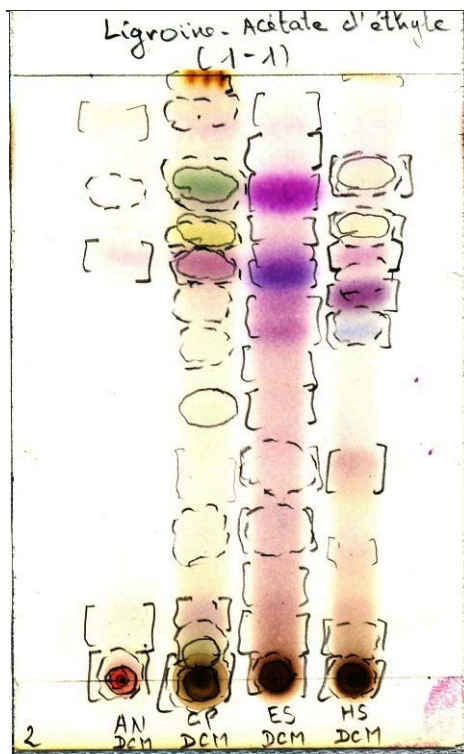
- Front du solvant : 8 cm
- Support : Plaque en silice d'aluminium
- Dépôt : 10 μL
- Eluant : Butanol-Acide acétique-Eau (60-15-25)
- Révéléteur : Réactif de Godin

Fig.10: Plaque CCM des extraits MeOH et Décocité révélée par le Godin

L'extrait méthanolique de *Calotropis procera* a présenté une tache jaune au Rf 0,6 après révélation par le Godin (révéléteur universel) laissant croire à la présence de flavonoïdes dans la plante.

Tableau 8: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits avant et après révélation par le Godin après migration dans le B:A:W (60:15:25) :

Plantes	Extraits	254 nm	Coloration à 366 nm	Coloration après Godin	Rf
<i>Acacia nilotica</i>	Méthanolique	Visible	Violette	∅	0
		Visible	Violet foncé	Rose claire	0,62
		∅	∅	Gris froid	0,75
		Visible	Rose clair	Rose	0,91
	Décocté	Visible	Violet	Chair tirant sur le gris	0
		Visible	Violet clair	Rose clair	0,24
		Visible	Violet clair	∅	0,72
		Visible	Rose clair	Rose	0,92
<i>Calotropis procera</i>	Méthanolique	Visible	∅	∅	0
		∅	Ocre clair	Jaune	0,6
		Visible	Kaki	Marron	0,97
	Décocté	Visible	Jaune clair	Jaune	0
		Visible	∅	∅	0,05
		Visible	∅	∅	0,24
		Visible	∅	∅	0,45
		Visible	∅	Jaune	0,6
<i>Euphorbia sudanica</i>	Méthanolique	Visible	Vert-clair	∅	0
			∅		0,19
			∅		0,44
			∅		0,54
			∅		0,63
			∅		0,78
			∅		0,86
	Décocté	Visible	Jaune violet	∅	0
			∅		1,13
			Bleu		0,25
Visible	∅	0,51			
Visible	∅	0,83			
<i>Hyptis suaveolens</i>	Méthanolique	Visible	∅	∅	0
			∅		0,19
			∅		0,78
	Décocté	Visible	Vert clair	Noir	0,97
			Violet	∅	0
			Jaune violet	∅	0,21
			∅	Jaune clair	0,57
			Visible	Violet	∅
Visible	Jaune clair	∅	0,80		



Conditions de déroulement du test sur la plaque

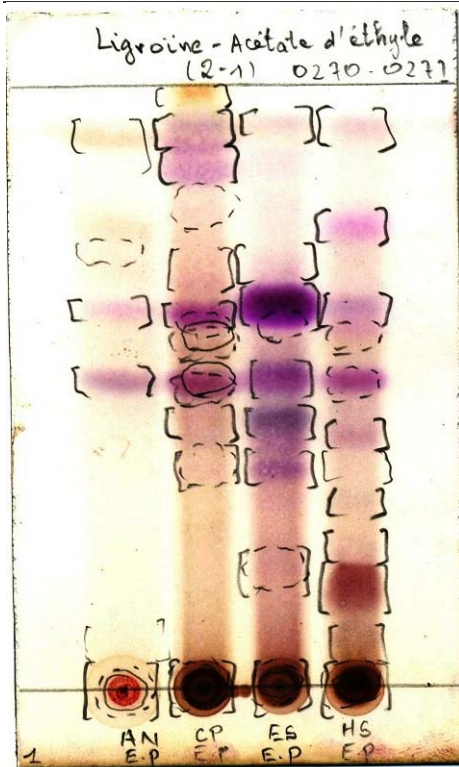
- Front du solvant : 8 cm
- Support : Plaque en silice d'aluminium
- Dépôt : 10 μ L
- Eluant : Ligroine-Acétate d'éthyle (1-1)
- Révélateur : Réactif de Godin

Fig.11: Plaque CCM des extraits DCM révélée par le Godin

Plusieurs colorations dont le rouge, le noir, le jaune, le vert, le violet et le bleu sont visibles sur la plaque révélée par le Godin permettant de poser l'hypothèse de la présence de plusieurs composés parmi lesquels on peut citer les tanins et les flavonoïdes.

Tableau 9: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits DCM ayant réagi avec le Godin après migration dans le système de solvants Ligrène-Acétate d'éthyle (1-1) :

Plantes	256nm	Coloration à 366nm	Coloration après Godin	Rf	
<i>Acacia nilotica</i>	Visible	Jaune violet	Rouge	0	
	≡		Gris froid	0,1	
	≡		Violet clair	0,69	
	Visible	≡	≡	0,82	
	≡	≡	Jaune	0,93	
<i>Calotropis procera</i>	Visible	Rose jaunâtre	Noir	0	
	Visible	Rose violet	Violet	0,12	
	Visible	≡	≡	0,25	
	≡	≡	Gris froid	0,35	
	≡	Jaune clair	≡	0,45	
	Visible	≡	≡	≡	0,56
		≡	≡	≡	0,63
		≡	Rose violet	Violet	0,69
		≡	Jaune clair	Jaune	0,75
		≡	Marron	Vert	0,83
≡	≡	Gris froid	0,95		
≡	≡	Ocre	0,98		
<i>Euphorbia sudanica</i>	Visible	Rose jaunâtre	Noir	0	
	≡	≡	Gris chaud	0,09	
	≡	≡		0,16	
	Visible	≡	Gris froid	0,25	
	Visible	≡		0,35	
	≡	≡		0,46	
	≡	≡		0,52	
	≡	≡	Violet	0,61	
	≡	≡	Bleu	0,68	
	≡	≡	Violet	0,71	
	≡	≡	Gris froid	0,75	
	≡	≡	Violet	0,80	
	≡	≡	Gris froid	0,87	
	≡	≡	Gris froid	0,95	
<i>Hyptis suaveolens</i>	Visible	Rose jaunâtre	Noir	0	
	Visible	≡	Gris chaud	0,08	
	≡	≡	Gris froid	0,21	
	≡	≡	Gris chaud	0,34	
	Visible	≡	Bleu	0,58	
	Visible	≡	Violet	0,64	
	≡	≡	Violet	0,70	
	Visible	Rose	Jaune	0,75	
	Visible	Rose clair	Jaune clair	0,84	
≡	≡	Ocre	0,99		



Conditions de déroulement du test sur la plaque

- Front du solvant : 8 cm
- Support : Plaque en silice d'aluminium
- Dépôt : 10 μ L
- Eluant : Ligroïne-Acétate d'éthyle (2-1)
- Révéléateur : Réactif de Godin

Fig.12: Plaque CCM des extraits Ether de pétrole révélée par le Godin

Des taches rouge, noire, violette et marron sont bien visibles sur la plaque après révélation par le Godin. Il pourrait s'agir de composés présents dans nos extraits.

Tableau 10: Facteurs de rétention et coloration des substances des extraits Ether de pétrole ayant réagi avec le Godin après migration dans le système de solvants Ligoïne:Acétate d'éthyle (2:1) :

Plantes	254 nm	Coloration à 366 nm	Coloration après Godin	Rf
<i>Acacia nilotica</i>	Visible	Vert jaunâtre	Rouge	0
	∓	∓	Violet	0,51
	∓	∓	Violet	0,63
	Visible	∓		0,73
	∓	∓	Ocre	0,92
<i>Calotropis procera</i>	Visible	Rose violet	Noir	0
	Visible	∓	Gris chaud	0,37
	∓	∓	Gris chaud	0,44
	Visible	Rose	Rose violet	0,50
	Visible	Violet	Violet	0,62
	∓	∓	Gris chaud	0,69
	∓	∓	Violet	0,87
	∓	∓	Violet	0,92
	∓	∓	Ocre jaune clair	0,98
<i>Euphorbia sudanica</i>	Visible	Jaune	Noir	0
	Visible	∓	Gris chaud	0,20
	∓	∓	Violet	0,37
	∓	∓	Bleu violet	0,44
	∓	∓	Violet	0,51
	Visible	∓	Bleu violet	0,64
	∓	∓	Violet clair	0,94
<i>Hyptis suaveolens</i>	Visible	Violet jaune	Marron	0
	∓	∓	Ocre tendance froide	0,07
	∓	∓	Marron	0,16
	∓	∓	Gris froid	0,23
	∓	∓	Gris froid	0,30
	∓	∓	Gris froid	0,36
	∓	∓	Violet clair	0,42
	∓	∓	Violet	0,50
	Visible	∓	Bleu violet	0,62
	∓	∓	Violet	0,76
	∓	∓	Violet très clair	0,93

Pour le révélateur $FeCl_3$, seul *Acacia nilotica* a présenté deux substances qui ont positivement réagi aux facteurs de rétention 0,91 et 0,90 respectivement pour les extraits méthanolique et décocté après migration dans le système de solvants BAW (60-15-25).

Tous les autres extraits des différentes plantes ont réagi à la base (au dépôt) pour les trois différents systèmes de solvants tandis que les extraits de *Acacia nilotica* ont réagi à la base pour le système de solvant ligoïne-acétate d'éthyle aux proportions 1-1 et 2-1.

IV) Activité larvicide

Tableau 11: Taux de mortalité (en %) des larves de *Anopheles gambiae s.l.* après exposition au décocté de *Acacia nilotica*.

Temps d'exposition des larves	Nombre de larves exposées	Concentrations de l'extrait décocté en µg/mL			
		500	1000	1500	2000
30 mn	100	0	0	0	0
1 H	100	0	0	0	0
24 H	100	0	0	75	100

L'effet larvicide du décocté de *Acacia nilotica* n'apparaît qu'à partir de la 24^{ème} heure d'exposition avec une mortalité totale de 100 % à 2000 µg/mL.

NB : Avec les décoctés de *Calotropis procera*, de *Euphorbia sudanica* et de *Hyptis suaveolens*, aucune activité larvicide n'a été observée malgré une augmentation de la concentration jusqu'à 2000µg/mL.

Tableau 12: Taux de mortalité (en %) des larves de *Anopheles gambiae s.l.* après exposition aux extraits organiques de *Acacia nilotica*

Temps d'exposition des larves	Nombre de larves exposées	Concentrations en µg/mL					
		500			1 000		
		Ether de pétrole	DCM	MeOH	Ether de pétrole	DCM	MeOH
30 mn	100	0	0	0	0	0	0
1 H	100	0	0	0	3	4	0
24 H	100	0	52	14	48	71	30

Les extraits organiques à une concentration de 500 µg/mL, présentent une activité larvicide à partir de la 24^{ème} heure qui se maintient à des proportions très faibles.

La mortalité avec les extraits organiques est faible après 24H d'exposition même après une augmentation de la concentration 1000µg/mL.

Tableau 13: Taux de mortalité (en %) des larves de *Anopheles gambiae s.l.* après exposition aux extraits organiques de *Calotropis procera*

Temps d'exposition des larves	Nombre de larves exposées	Concentrations en µg/mL							
		500				1 000			
		Ether de pétrole	DCM	MeOH	mEtOH	Ether de pétrole	DCM	MeOH	mEtOH
30 mn	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1 H	100	0	0	0	0	0	0	0	0
24 H	100	5	83	51	20	43	100	100	100

Seulement au bout de 24 heures d'exposition à la concentration de 500 µg/mL qu'apparaît un effet larvicide faible avec ces extraits mais plus de 80 % de mortalité est atteint avec l'extrait DCM.

Avec une concentration de 1000µg/mL, l'effet larvicide des extraits organiques de *Calotropis procera* est plus marqué après 24 heures d'exposition (100 % avec les extraits alcooliques et l'extrait dichlorométhane).

Tableau 14: Taux de mortalité (en %) des larves de *Anopheles gambiae* s.l. après exposition aux extraits organiques de *Euphorbia sudanica*

Temps d'exposition des larves	Nombre de larves exposées	Concentrations en µg/mL					
		500			1 000		
		Ether de pétrole	DCM	MeOH	Ether de pétrole	DCM	MeOH
30 mn	100	0	0	0	0	0	0
1 H	100	0	0	0	0	5	7
24 H	100	25	17	0	76	51	100

A 500µg/mL, l'effet larvicide est faible même après 24 H d'exposition.

A 1000µg/mL, seul l'extrait méthanolique de *Euphorbia sudanica* a donné une activité larvicide totale après 24 heures d'exposition. Cependant les autres extraits ont donné plus de 50 % de mortalité aussi après 24 heures.

Tableau 15: Taux de mortalité (en %) des larves de *Anopheles gambiae* s.l. après exposition aux extraits de *Hyptis suaveolens*

Temps d'exposition des larves	Nombre de larves exposées	Concentrations en µg/mL									
		500					1000				
		Ether de pétrole	DCM	MeOH	mEtOH	mMeOH	Ether de pétrole	DCM	MeOH	mEtOH	mMeOH
30 mn	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 H	100	0	0	0	0	0	62	0	0	0	0
24 H	100	84	40	35	0	0	100	97	100	80	26

La mortalité avec les extraits organiques est très faible après 24H d'exposition à 500 µg/mL mais l'extrait étheré se distingue par une mortalité de 84 %.

A 1000µg/mL, nous avons observé une activité larvicide totale avec les extraits méthanolique et étheré de *Hyptis suaveolens* au bout de 24 H tandis que l'extrait dichlorométhane a présenté une mortalité quasiment totale de 97 %. Une activité larvicide rapide, comparativement aux autres extraits, a été observée avec l'extrait d'éther de pétrole avec une mortalité de 62% en 1H.

V) Détermination des CL₅₀

Les résultats des tests sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous et les CL₅₀ sont déterminées par les graphiques.

1) *Acacia nilotica*

Tableau 16: Activité larvicide (en % et CL₅₀) de l'extrait DCM de *Acacia nilotica*

Concentration (µg /mL)	DCM
1000	71
500	52
400	34
CL₅₀ (µg /mL)	487,8

L'extrait dichlorométhanique seul a permis de déterminer une CL₅₀ pour *Acacia nilotica*.

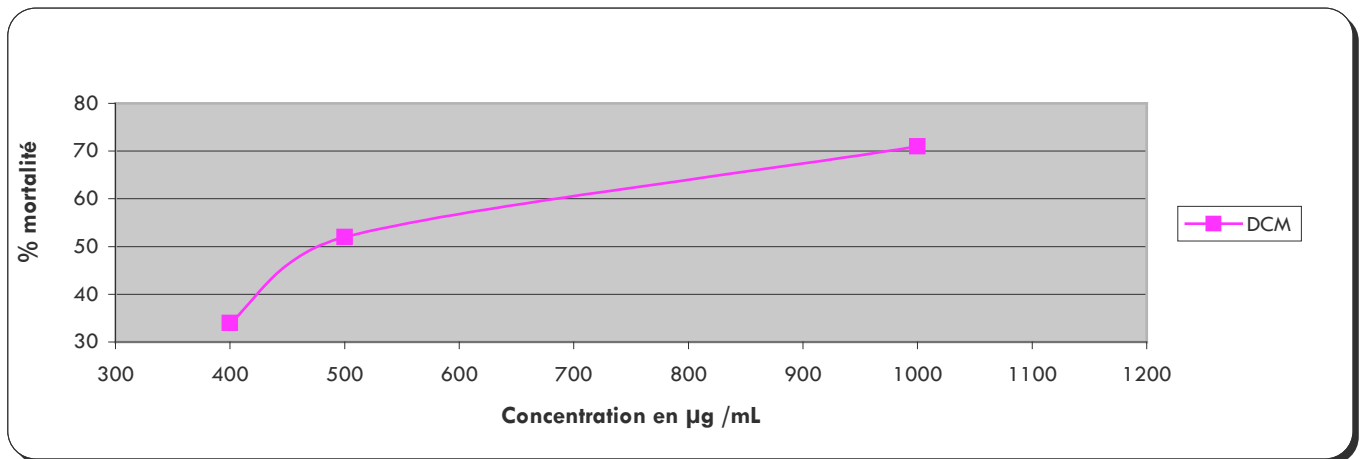


Fig.13: Relation concentration-activité larvicide de l'extrait DCM

Le nombre de larves mortes augmente en fonction de la concentration pour atteindre 71% de larves mortes à 1000µg/mL.

2) *Calotropis procera*

Tableau 17: Activité larvicide (en % et CL₅₀) des extraits de *Calotropis procera*

Concentration (µg /mL)	DCM	MeOH	mEtOH 70%
1000	100	100	100
500	83	51	57
350	43	24	20
250	30	21	0
CL₅₀ (µg /mL)	372,5	493,4	579,7

L'extrait DCM a une CL₅₀ plus faible que celles des extraits MeOH et EtOH 70 % ce qui signifie qu'il est plus efficace que les deux autres extraits.

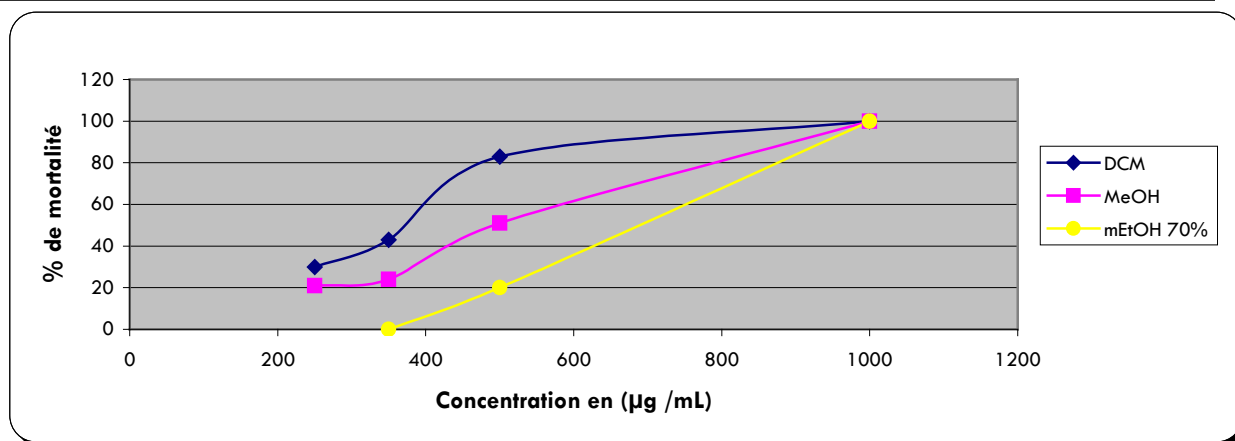


Fig.14: Relation concentration-activité larvicide des extraits DCM, et EtOH 70 % de *Calotropis procera*

Tous les trois extraits ont donné des mortalités de larves augmentant avec la concentration. Aussi une même puissante activité (100% de mortalité) a été obtenue à la même concentration de 1000 µg/mL pour les trois extraits.

3) *Euphorbia sudanica*

Tableau 18: Activité larvicide (en % et CL₅₀) des extraits de *Euphorbia sudanica*

Concentration (µg/mL)	Ether de Pétrole	MeOH
1000	76	100
900	53	28
750	35	6
CL₅₀ (µg /ml)	873,1	

Les extraits étheré et dichlorométhanique ont tous deux des CL₅₀ élevées néanmoins celle de l'éther de pétrole est plus faible que celle du dichlorométhane.

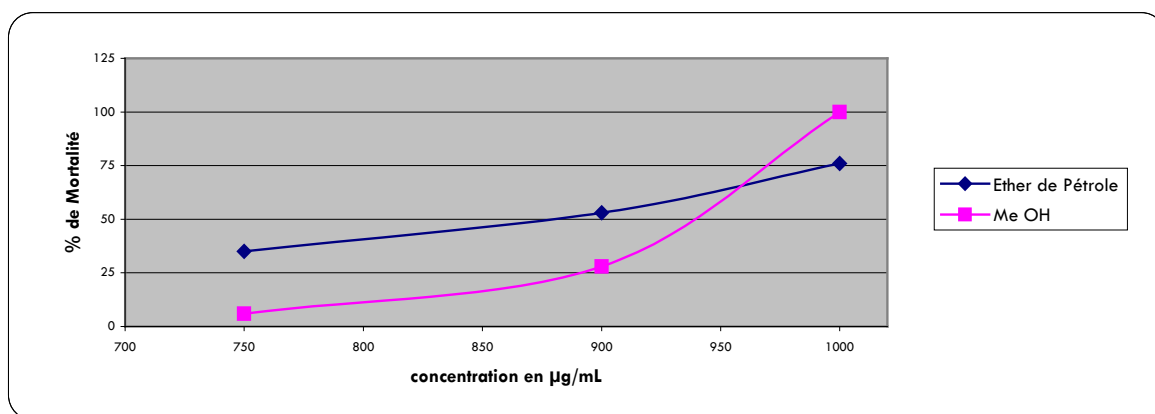


Fig.15: Relation concentration-activité larvicide des extraits Ether de pétrole, MeOH de *Euphorbia sudanica*

Les deux courbes montrent que le taux de mortalité des larves augmente avec la concentration mais à 1000µg/mL, l'extrait méthanolique a provoqué une mortalité de 100% tandis que l'extrait éther de pétrole a donné un taux de 76%.

4) *Hyptis suaveolens*

Contrairement à *Acacia nilotica* et *Euphorbia sudanica*, *Hyptis suaveolens* a donné quatre extraits qui ont permis de déterminer des CL₅₀.

Tableau 19: Activité larvicide des extraits de *Hyptis suaveolens*

Concentration (µg /mL)	Ether de pétrole	DCM	MeOH	mEtOH 70 %
1000	100	97	100	80
950			61	58
600		52		28
500	84	40	21	
350	32			
CL₅₀ (µg /mL)	396	582	796,3	840,4

La CL₅₀ la plus faible a été obtenue avec l'extrait éther de pétrole qui a donné 396 µg /mL et la plus élevée a été de 840,4 µg /mL pour l'extrait EtOH 70 %.

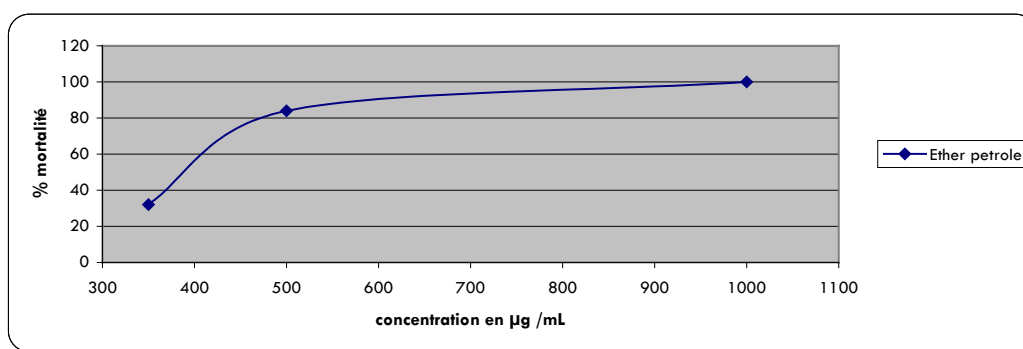


Fig.16: Relation concentration-activité larvicide de l'extrait Ether de pétrole de *Hyptis suaveolens*

La courbe montre que le taux de mortalité des larves croît avec la concentration donc plus la concentration utilisée est grande plus le nombre de larves mortes est élevé.

Tableau 20: Récapitulatif des CL₅₀ de l'activité larvicide des différents extraits des plantes

EXTRAITS	Plantes	CL ₅₀ (µg /mL)
Ether de pétrole	<i>H. suaveolens</i>	396
	<i>E. sudanica</i>	873,1
DCM	<i>C. procera</i>	372,5
	<i>A. nilotica</i>	487,8
	<i>H. suaveolens</i>	582
MeOH	<i>C. Procera</i>	493,4
	<i>H. suaveolens</i>	796,3
mEtOH 70 %	<i>C. procera</i>	579,7
	<i>H. suaveolens</i>	840,4

Hyptis suaveolens a donné la plus faible CL₅₀ parmi les extraits éther de pétrole, *Calotropis procera* parmi les extraits dichlorométhaniques, méthanoliques et éthanoliques à 70 %. Les extraits dichlorométhaniques sont les mieux indiqués comme larvicides pour *Acacia nilotica* et *Calotropis procera* car donnant les plus faibles CL₅₀ tandis que ce sont les extraits éthers qui sont retenus pour *Hyptis suaveolens*.

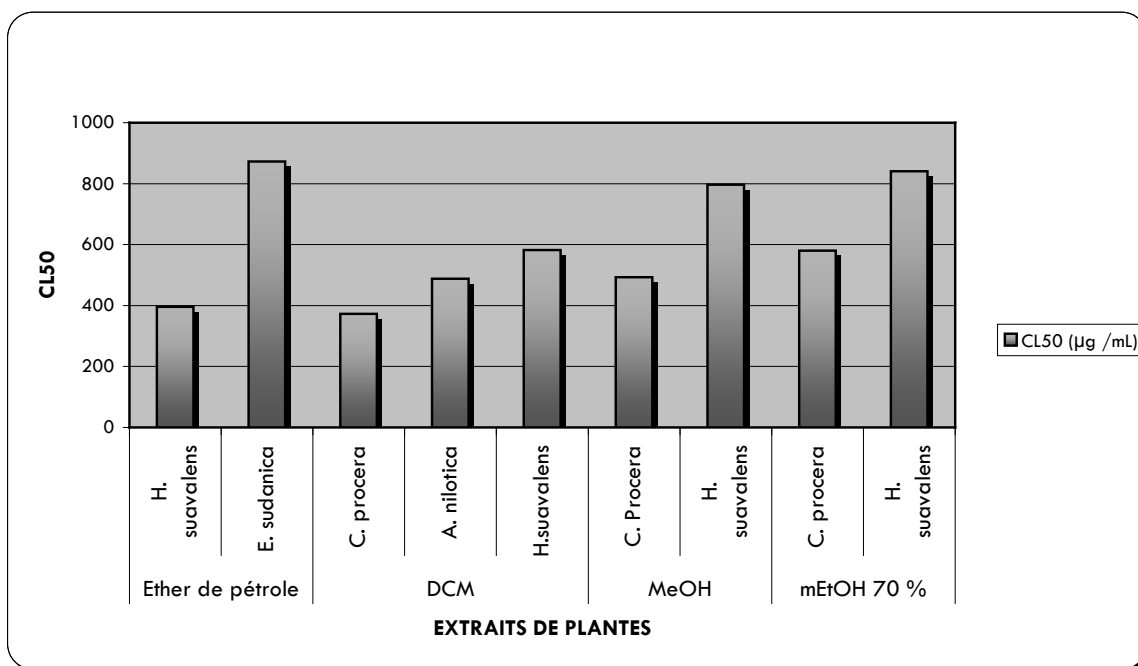


Fig.17: Graphique des CL₅₀ des différents extraits des plantes

L'extrait dichlorométhanique de *Calotropis procera* paraît le plus efficace ensuite vient l'extrait éther de pétrole de *Hyptis suaveolens* qui ont toutes deux des CL₅₀ inférieures à 400µg/mL. Les autres extraits présentent des CL₅₀ supérieures à 400 µg/mL.

VI) Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

Les figures qui suivent montrent les résultats de l'activité anticholinérasique réalisée sur les extraits d'éther de pétrole (**Fig.12**), de dichlorométhane (**Fig.13**) et méthanolique (**Fig.14**) des quatre plantes. L'activité se caractérise par l'apparition des spots blancs sur plaque CCM (Vraie Positive) ne correspondant pas aux mêmes tâches blanches sur contre plaque CCM (Fausse Positive).

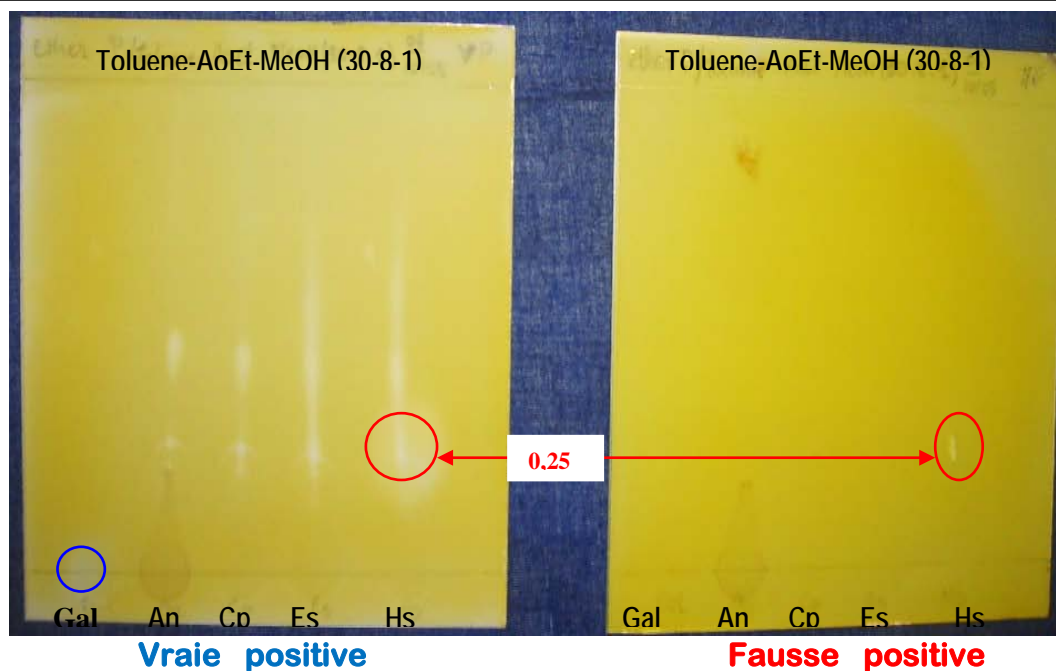


Fig.18: Extraits d'Ether de Pétrole

A l'exception d'une substance de la plante de *Hyptis suaveolens* qui a donné un résultat négatif au facteur de rétention (Rf) 0,25, toutes les autres plantes ont présenté au moins deux substances qui ont donné des résultats positifs à des Rf quasiment identiques. Les extraits étherés de nos plantes sont de ce fait potentiellement anticholinestérasiques.

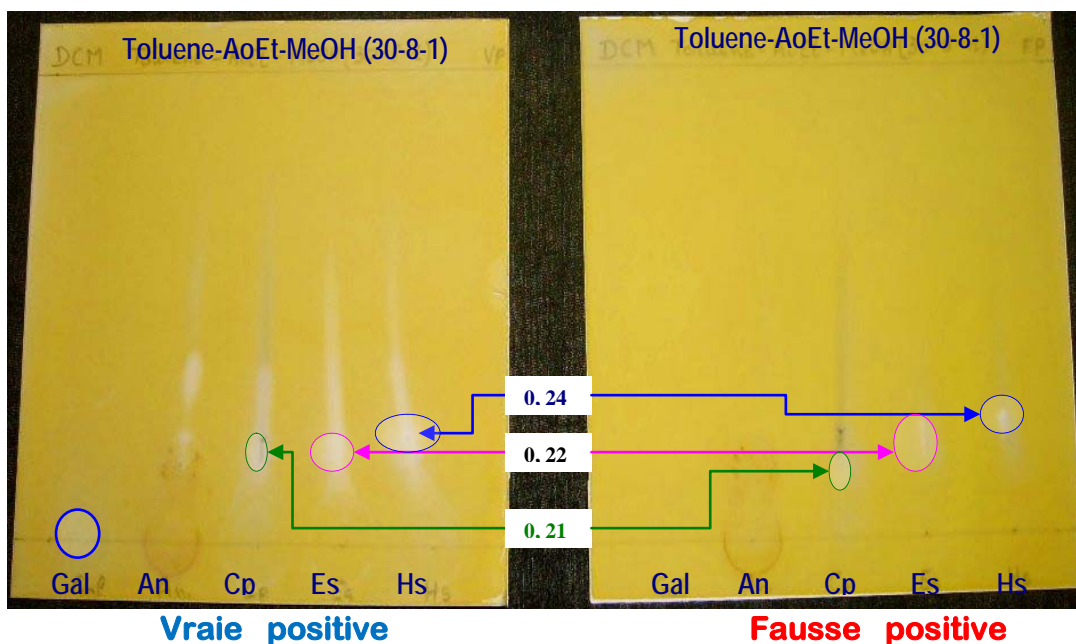


Fig.19: Extraits DCM

Nous avons observé qu'aux Rf 0,21 pour *Calotropis procera*, 0,22 pour *Euphorbia sudanica* et 0,24 pour *Hyptis suaveolens* aucune activité anticholinestérasique ne s'est révélée tandis qu'aux Rf 0,22 et 0,37 ; 0,36 ; 0,35 et enfin 0,37 respectivement *Acacia nilotica*, *Calotropis procera*, *Euphorbia sudanica* et *Hyptis suaveolens* ont donné des résultats positifs. Les extraits DCM de toutes nos plantes ont donc une capacité anticholinestérasique.

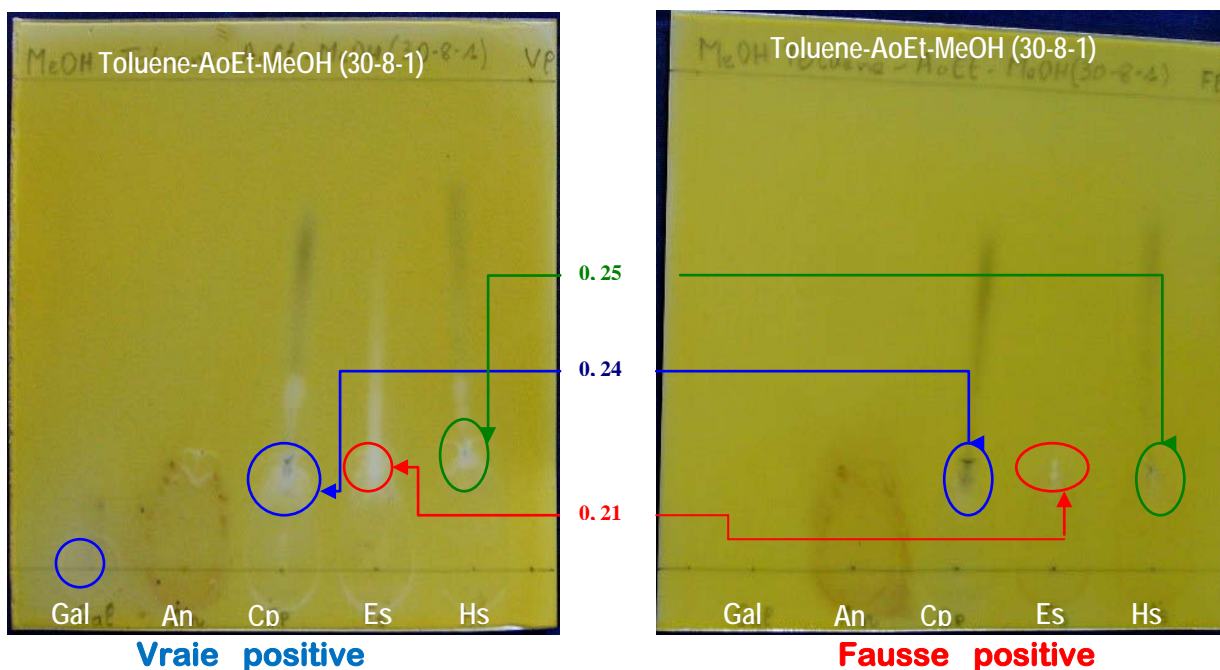


Fig.20: Extraits MeOH

Nous avons remarqué qu'aux Rf 0,21, 0,22 et 0,25 respectivement *Calotropis procera*, *Euphorbia sudanica* et *Hyptis suaveolens* ont donné des résultats

négatifs tandis qu'aux Rf 0,22 pour *Acacia nilotica*, 0,37 pour *Calotropis procera*, 0,36 pour *Euphorbia sudanica* et 0,39 pour *Hyptis suaveolens* l'activité anticholinestérasique s'est avérée positive. Alors les extraits méthanoliques de toutes nos plantes possèdent des propriétés anticholinestérasiques.

Gal : Galanthamine

An : *Acacia nilotica*

Cp : *Calotropis procera*

Es : *Euphorbia sudanica*

Hs : *Hyptis suaveolens*

Conditions de déroulement des plaques pour l'activité anticholinestérasique:

Front du solvant: 8cm

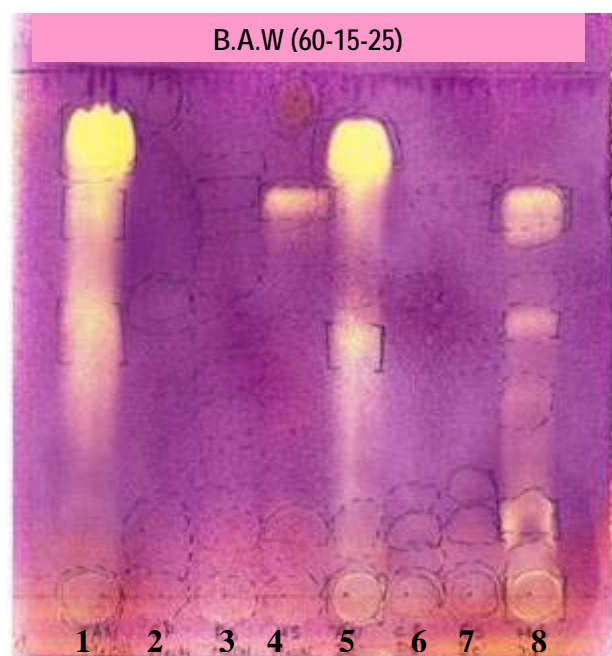
Support: plaque de silice en aluminium

Dépôt: 10 μ L

Eluant: Toluène-Acétate d'éthyle-Méthanol (30-8-1)

VII) Activité antioxydante

Les chromatogrammes obtenus avec les extraits ont été révélés par une solution de DPPH pour déterminer la présence de l'activité antioxydante, les résultats se présentant sous forme de tâches jaunes sur fond violet.



B.A.W (60-15-25)

Conditions de déroulement du test sur la plaque

Front du solvant : 8 cm

Support : Plaque en silice d'aluminium

Dépôt : 10 μ L

Eluant : B.A.W (Butanol-Acide acétique-Eau)
(60-15-25)

Fig.21: Activité antioxydante des extraits MeOH et Décocté des quatre plantes

1 et 5 : Extraits MeOH et Décocté de *Acacia nilotica*

2 et 6 : Extraits MeOH et Décocté de *Calotropis procera*

3 et 7 : Extraits MeOH et Décocté de *Euphorbia sudanica*

4 et 8 : Extraits MeOH et Décocté de *Hyptis suaveolens*

Nous notons que *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* sont les plantes possédant une activité antioxydante aussi bien pour les extraits MeOH que Décocté. L'activité antioxydante a été beaucoup plus marquée pour les extraits de *Acacia nilotica* que ceux de *Hyptis suaveolens* et au niveau de cette dernière, c'est le décocté qui a été plus actif que l'extrait méthanolique.

Par ailleurs, les tests réalisés sur les extraits DCM et Ether de pétrole des quatre plantes n'ont montré aucune activité antioxydante.

VIII) ANALYSES ET DISCUSSION

Cette étude a porté sur la phytochimie et les activités biologiques de quatre plantes de la pharmacopée traditionnelle malienne.

Le matériel végétal était constitué des fruits entiers de *Acacia nilotica*, des rameaux feuillés de *Calotropis procera*, de la partie aérienne de *Euphorbia sudanica* et des feuilles de *Hyptis suaveolens*.

Dans cette étude le criblage phytochimique a révélé la présence de plusieurs groupes de composés chimiques dans nos plantes. Ce sont les coumarines, tanins, stérols, triterpènes, hétérosides cardiotoniques, les oses et holosides. Les mucilages ont été identifiés dans *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens*, les leucoanthocyanes n'ont été présents que sous forme de traces dans l'échantillon de *Euphorbia sudanica* tout comme les saponosides qui ont été seulement présents dans l'échantillon de *Hyptis suaveolens*.

En effet dans l'échantillon de *Acacia nilotica*, nous avons révélé la présence des tanins ; cela confirme les travaux rapportés par Kerharo et Adam (1974) qui stipulaient que la plante entière est riche en tanins.

Les tanins sont surtout connus pour leur propriété astringente mise à profit pour stopper les hémorragies. Ils ont des propriétés anti-infectieuses du fait de leur capacité à complexer les macromolécules, en particulier les protéines : enzymes digestives et autres, protéines fongiques ou virales (Bruneton, 1993).

Les études antérieures réalisées sur *Calotropis procera* ont rapporté la présence d'alcaloïdes (Hesse et coll.1950), d'hétérosides cardiotoniques (Hesse et coll. ; Bruschweiller et coll. 1969), de triterpène (Bruschweiller et coll.1969) dans le latex de la plante. Dans notre étude, nous avons noté la présence de coumarines, d'hétérosides cardiotoniques et de triterpène mais dans les poudres des feuilles et branches.

Concernant *Euphorbia sudanica*, les données de la littérature ont signalé la présence de diterpènes révélée par Hamed et coll (2005). Dans notre étude, nous avons mis en évidence la présence de coumarines, de tanins, de composés réducteurs, d'oses et holosides, d'hétérosides et de traces de leucoanthocyanes.

Enfin, nous avons remarqué dans la littérature se rapportant à *Hyptis suaveolens* que les recherches ont été basées sur l'identification des huiles essentielles présentes dans les feuilles. Cependant l'acide hydrocyanique et des traces

d'alcaloïdes furent identifiés dans les feuilles d'un échantillon nigérian étudié au Campus of Lagos State University (LASU) contrairement à nous qui n'avons remarqué aucune trace d'alcaloïde. Par contre nous pouvons insister sur le fait que c'est la seule plante à avoir présenté dans nos conditions expérimentales des saponosides avec un indice de mousse de 111,111 et des flavonoïdes. Ceci pourrait expliquer son usage traditionnel contre la toux, les troubles bronchiques (Bouquet et Debray, 1974) dus aux saponosides et comme antalgique (Kerharo et Bouquet, 1950) dû aux flavonoïdes. L'absence d'alcaloïde retrouvé dans nos conditions expérimentales peut être due à la localisation de la plante ainsi qu'à la texture du sol de culture.

Par ailleurs, toutes les plantes ont présenté une teneur en eau inférieure à 10 %, ce qui indique qu'elles se prêtent à une bonne conservation. En effet une teneur en eau supérieure à 10 % favoriserait les réactions d'oxydation, de fermentation ainsi que la formation de moisissures qui sont souvent préjudiciables à l'activité thérapeutique de la drogue (Paris et Hurabielle, 1981).

Les teneurs en cendres chlorhydriques des échantillons de toutes les plantes étant inférieures à 3 % indiquent qu'elles ont moins d'éléments.

Outre *Acacia nilotica*, les taux des cendres totales et des cendres sulfuriques des autres plantes sont élevés ce qui traduit leurs richesses en substances résiduelles non volatiles et en substances inorganiques tandis que *Acacia nilotica* est riche en éléments minéraux et moins en éléments.

Les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus avec les décoctés qui ont donné un rendement de 68,53 % aussi bien pour *Acacia nilotica* que *Euphorbia sudanica* tandis que le dichlorométhane a donné le plus faible rendement pour les extraits polaires avec un rendement de 3,32 % pour *Calotropis procera*.

Les plantes ont présenté des pourcentages de plus de 10 de substances extractibles par l'eau ce qui signifie qu'elles possèdent de nombreux principes actifs solubles dans l'eau tels que les coumarines, les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les oses et holosides.

Ces résultats ont été confirmés d'une part par les réactions en tube et d'autre part par la chromatographie sur couche mince. Par exemple, les flavonoïdes se sont matérialisés par des tâches jaunes au réactif de $AlCl_3$, les coumarines par des tâches bleues au réactif de Godin. La présence de ces composés dans nos différentes plantes pourrait justifier leurs utilisations traditionnelles.

L'étude biologique a concerné les activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante.

Pour ce qui concerne l'activité larvicide, les résultats varient en fonction du type d'extraits. En effet, pour les décoctés, seuls ceux de *Acacia nilotica* ont donné des mortalités de 75 % et 100 % respectivement aux concentrations de 1500 µg/mL et 2000 µg/mL. Ces résultats traduisent la puissante activité de l'extrait aqueux de cette plante par rapport aux autres.

Cependant il faut noter que ces extraits agissent à des concentrations très élevées tout comme présenté par les travaux de Diallo et coll. (2001) qui ont obtenu l'activité larvicide de *Cussonia barteri* sur *Anopheles gambiae* à une concentration de 500mg/L.

Les décoctés des autres plantes n'ont donné aucune mortalité aux concentrations auxquelles nous avons effectués nos tests malgré une augmentation de ces dernières. Ces résultats corroborent avec ceux de Bah (1998) dont les tests larvicides effectués avec les extraits aqueux de 10 plantes de la flore malienne n'ont donné aucune mortalité des larves de *Anopheles gambiae* aux concentrations de 0,015; 0,03 et 0,06 mg/mL.

Toutefois l'absence d'activité larvicide des autres plantes pourrait se justifier par leur nature et le genre de larves car au Maroc, Aouinty et coll. (2006) ont obtenu 100% de mortalité des larves de *Culex pipiens* à une concentration de 1% avec les extraits aqueux de *Ricinus communis*.

En effet vue que l'extrait aqueux de *Acacia nilotica* a montré une puissante activité sur les larves de *Anopheles gambiae*, il serait donc important d'explorer davantage l'activité larvicide de cette plante pour plusieurs raisons dont le coût moins élevé d'acquisition du solvant (eau) et la biodégradation de la plupart des composés solubles dans l'eau.

Concernant les extraits alcooliques (MeOH et EtOH 70%), tous les extraits méthanoliques à l'exception de celui de *Acacia nilotica* ont été très actifs car ils ont tous provoqué une mortalité de 100 % à 1000 µg/mL ce qui montre que toutes nos plantes possèdent une activité larvicide. Cependant de toutes ces plantes, *Calotropis procera* paraît la plus efficace pour l'extrait méthanolique en ce sens qu'elle possède la CL₅₀ (496 µg/mL) la plus faible.

Aussi pour l'extrait éthanolique à 70 % que nous disposons seulement pour les plantes *Calotropis procera* et *Hyptis suaveolens*, c'est *Calotropis procera* qui a été à la fois plus active et plus efficace.

Il apparaît ici donc que les extraits alcooliques sont très actifs sur les larves ce qui est en phase avec plusieurs travaux précédents dont celui de Diakité (2008) qui a montré que les extraits méthanoliques de *Erythrina senegalensis* et *Anthocleista djalonensis* ainsi que les extraits éthanoliques de *Pseudocedrela kotschy* et *Anthocleista djalonensis* ont donné 100% de morts des larves de *Anopheles gambiae* après 1H d'exposition à la concentration de 1,25 mg/mL. Aussi les travaux de Diallo et coll. (2001) rapportaient que les larves du genre *Anopheles* étaient sensibles à tous les extraits alcooliques de 23 plantes testés après 24H d'exposition à la concentration de 500 mg/L. Enfin, Bah (1998) a trouvé que l'extrait éthanolique des feuilles fraîches de *Gliciridia sepum* donnait 100% de mortalité des larves de *Culex quinquefasciatus* à 400ppm tandis que Sharma et coll. (1998) trouvaient que ce même extrait de la même plante provoquait 100% de mortalité des larves de *Anopheles stephansi* et *Aedes aegypti* à la concentration de 250 ppm.

Il est donc irréfutable que les extraits alcooliques de nos plantes sont de puissants larvicides d'où la nécessité de poursuivre leur étude afin d'aboutir à la mise en place d'insecticides à moindre coût d'acquisition.

Quant aux extraits dichlorométhaniques, toutes les plantes ont été actives avec des mortalités de 100 % et 97 % des larves de *Anopheles gambiae* à 1000 µg/mL respectivement pour *Calotropis procera* et *Hyptis suaveolens*. Ces résultats indiquent que l'extrait dichlorométhanique de *Calotropis procera* a une activité plus puissante que ceux des autres plantes qui donnent aussi de bons pourcentages de mortalité car plus de 50%. Par comparaison des CL₅₀, *Calotropis procera* demeure la plus efficace en ce sens qu'elle a la plus faible concentration de 372,5 µg/mL. Ces résultats sont conformes à ceux de Diakité (2008) qui a trouvé que les extraits dichlorométhaniques de *Securidaca longepedunculata*, *Pseudocedrela kotschy* et de *Syzigium guineense* avaient produit 100 % de mortalité des larves de *Anopheles gambiae* aux concentrations de 1mg/mL, 1,25mg/mL et 1,5mg/mL après 24 heures d'activité. A cela, il faut ajouter que Marston et coll. (1993) ont démontré que l'extrait dichlorométhanique de *Artemisia borealis* était très toxique pour les larves de *Aedes aegypti*. Aussi Diallo et coll. (2001) trouvaient que parmi 23 extraits de plantes testés sur différents

genres de larves, seul l'extrait dichlorométhanique de *Cussonia barteri* tuait respectivement 65 %, 90 % et 40 % des larves de *Culex*, de *Anopheles* et de *Aedes* à la concentration de 500 mg/L et que l'extrait dichlorométhanique des feuilles de *Lannea velutina* tuait toutes les larves de *Culex* après 24 heures d'exposition à 500mg/L. Enfin Bah (1998) montrait que l'extrait dichlorométhanique de *Glinus oppositifolius* provoquait 70 % de mortalité des larves de *Anopheles gambiae* à 50 mg/L et Oueleguem (1999) trouvait que l'extrait dichlorométhanique des feuilles de *Lannea velutina* tuait 100 % des larves de *Anopheles gambiae* exposées.

Il ressort de cette analyse que les extraits dichlorométhaniques sont très prometteurs quant à leur activité larvicide. Alors une étude de leur impact sur l'Homme et l'environnement s'avère nécessaire en vue d'un contrôle larvaire.

Enfin concernant les extraits éthers, toutes nos plantes ont réagi à des degrés divers. En effet à la concentration de 1000 µg/mL, des mortalités de 100 % et 76 % ont été observées respectivement pour *Hyptis suaveolens* et *Euphorbia sudanica* tandis que moins de 50 % ont été obtenues avec *Acacia nilotica* et *Calotropis procera*. *Hyptis suaveolens* a alors une activité plus puissante que toutes les autres plantes pour l'extrait éther de pétrole et s'en suit *Euphorbia sudanica*.

Comparant les CL₅₀, avec 396 µg/mL *Hyptis suaveolens* est encore la plus efficace. Il serait donc important d'approfondir les études sur cette plante car potentiellement larvicide.

Pour l'activité anticholinestérasique, nous avons observé une réaction positive (présence d'une tâche blanche sur la plaque vraie positive qui est absente sur la plaque fausse positive) du témoin (la galanthamine) ce qui traduit le bon déroulement de l'activité. Ainsi tous nos extraits ont été soumis à ce test.

Les décoctés de toutes nos plantes n'ont aucunement réagit mais cela ne signifie pas forcément qu'ils sont inactifs. En effet il se peut que les substances responsables de l'activité anticholinestérasique soient en faible quantité dans nos décoctés ou que les parties utilisées de nos plantes n'en contiennent pas car Ferreira et coll. (2006) ont déterminé une excellente activité anticholinestérasique des décoctés des plantes entières de *Hypericum undulatum*, *Lavandula pedunculata* et *Mentha suaveolens* tandis que nous avons utilisés les parties aériennes de nos plantes.

Pour les extraits apolaires toutes nos plantes ont démontré une très bonne activité qui décroît avec la polarité des extraits c'est-à-dire que l'activité est d'autant plus importante que l'extrait est apolaire. Ainsi pour les extraits éthers qui ont marqué une activité plus puissante que les extraits dichlorométhane et méthanolique, à l'exception d'une substance de la plante de *Hyptis suaveolens* qui a réagi négativement au Rf 0,25, toutes les plantes ont présenté des substances qui ont réagi positivement.

En effet, au Rf 0,25, il se peut que ce ne soit pas une absence d'activité mais plutôt une concentration trop grande de l'extrait qui s'est accumulée à ce niveau. Il apparaît donc que les extraits d'éther de pétrole sont potentiellement actifs. Tout comme les extraits éthers, les extraits dichlorométhane et méthanoliques de toutes les plantes ont présenté des substances ayant réagi positivement à la seule différence qu'ils ont moins de substances actives que les extraits éthers. En effet, en 2004, Peter et coll. ont mis en évidence par méthode spectrophotométrique d'Ellman, l'activité anticholinérasique des extraits méthanoliques brutes de bulbes de deux espèces de *Crinum* récoltées au Nigéria. Les substances responsables de cette activité selon les mêmes auteurs sont les alcaloïdes dont les plus actifs sont le hamayne ($CL_{50}=250\mu M$) et le lycorine ($CL_{50}=450\mu M$).

Tout comme les deux précédentes plantes citées, les extraits méthanoliques de nos plantes possèdent tous de bonnes propriétés anticholinérasiques mais les méthodes de déterminations diffèrent car nous avons utilisé la méthode colorimétrique basée sur le test d'Ellman. En plus nous n'avons pas, dans nos conditions expérimentales, détecté la présence d'alcaloïdes dans les échantillons de nos plantes.

Cependant la présence de flavonoïdes et de glycosides dans les échantillons de nos plantes pourraient justifier leur importante activité anticholinérasique car Mukherjee et coll. (2007) ont rapporté une bonne activité anticholinérasique des plantes de *Cynanchum atratum* (*Asclepiadaceae*) et *Origanum majorana* (*Lamiaceae*) due respectivement aux glycosides et aux flavonoïdes. Mukherjee et coll. (2007) ont cité les alcaloïdes, terpènes, glycosides et coumarines comme des composés pourvus de propriétés anticholinérasiques alors que nos plantes contiennent ces composés. Ces données pourraient donc contribuer à justifier leur bonne activité anticholinérasique.

Aussi ces mêmes auteurs ont souligné la propriété anticholinérasique qu'ont certaines familles telles que *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lamiaceae* ce qui contribue à justifier l'activité de nos plantes appartenant à ces familles à savoir respectivement *Calotropis procera*, *Euphorbia sudanica* et *Hyptis suaveolens*. Par conséquent, ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils constituent une contribution à la liste des plantes à activité anticholinérasique et ils pourraient ouvrir une piste de recherche sur toutes les substances à activité anticholinérasique.

Il faut comprendre par là que toutes nos plantes possèdent une activité anticholinérasique et sont donc prometteuses pour la perspective d'autres recherches aboutissant à autres usages de nos plantes tels que dans la maladie d'Alzheimer, le glaucome et les myasthénies.

Par ailleurs, nos plantes étant toutes larvicides surtout quant à leurs extraits apolaires et que ce sont ces mêmes extraits apolaires qui ont démontré une importante activité anticholinérasique, nous sommes alors tentés de justifier l'activité larvicide par l'effet de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinérase. Nos plantes auraient peut être le même mécanisme d'action larvicide que les organophosphorés et les carbamates.

Il est donc impérieux de porter une attention particulière à ces plantes quant à la recherche de solutions pour maîtriser et contrôler les vecteurs (genre *Anopheles*) du paludisme.

Quant à l'activité antioxydante, les extraits aqueux et méthanoliques de *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* ont réduit le DPPH avec une activité antioxydante plus marquée pour *Acacia nilotica* que *Hyptis suaveolens*. Par contre, les extraits aqueux et méthanoliques des autres plantes n'ont montré aucune activité antiradicalaire après révélation par le DPPH.

En effet, l'action antioxydante de ces différents extraits pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques, tanins (surtout *Acacia nilotica* et moindre *Hyptis suaveolens*), coumarines, flavonoïdes et saponosides (pour seulement *Hyptis suaveolens*) car selon Bruneton (1993) et Cavin (1999), les substances ci-dessus citées sont à haut potentiel antioxydant. Ces résultats sont d'autant plus intéressants quand nous savons que, selon Pincemail et coll. (1999), les antioxydants protègent l'organisme contre les cancers et autres maladies cardiovasculaires. Nous pourrions peut-être justifier l'activité antioxydante de *Hyptis suaveolens* par les résultats de Feeman qui en 2001,

stipulait que les flavonoïdes sont particulièrement des substances antioxydantes actives dans le maintien de la circulation sanguine car ils contribuent à l'augmentation de la production de l'oxyde nitrique des plaquettes sanguines qui limite la formation des caillots en empêchant les plaquettes de s'agglutiner (prévention de l'athérosclérose).

Aussi, ce sont des substances veinoactives car en diminuant la perméabilité capillaire sanguine, elles renforcent la résistance périphérique (Bruneton, 1993). Enfin, en 1992, Rabinovich a mis en évidence l'important rôle joué par les flavonoïdes dans la prévention du diabète sucré en ce sens qu'ils piègent les radicaux libres qui sont responsables de la perturbation de la production de l'insuline par les cellules pancréatiques. Cette plante serait-elle aussi antidiabétique?

Par ailleurs, il faut rappeler que *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* ont donné une bonne activité anticholinestérasique ce qui est très significatif en ce sens qu'elles peuvent être exploitées très scientifiquement par les laboratoires pour mettre sur le marché des médicaments qui interviennent à la fois dans le traitement de certaines maladies comme la maladie d'Alzheimer et la défense de l'organisme contre certaines agressions.

CONCLUSION

L'accès difficile et le coût élevé des médicaments dits conventionnels, l'attachement aux cultures et aux croyances ancestrales et aussi la quasi-inexistence de campagnes de sensibilisation sont autant de raisons qui justifient le recours à la tradithérapie de plus de 80 % de la population africaine.

Retenons qu'en études phytochimiques, les réactions ont révélé la présence de nombreux composés dont la présence fut confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM).

Ce travail nous a permis de déterminer l'activité larvicide de ces quatre plantes en fonction du type d'extrait et de la concentration en notant que ce sont les extraits organiques qui se sont montrés plus actifs et efficaces que les décoctés.

Par ailleurs sur l'ensemble des extraits des quatre plantes testées, l'activité anticholinestérasique s'est avérée négative par la méthode CCM pour seulement les extraits décoctés. Par contre pour tous les autres extraits (éthérés, dichlorométhaniques et méthanoliques), il y'a alternance de résultats positifs et négatifs avec une activité plus remarquable pour les extraits éthérés.

Pour ce qui concerne l'activité antioxydante, ce sont les extraits décoctés et méthanoliques qui se sont montrés actifs pour *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens*. Il est cependant bon de remarquer que les extraits méthanoliques ont démontré une activité plus marquée que les décoctés.

Au terme de ce travail ayant étudié la phytochimie, les activités larvicide, anticholinestérasique et de quatre plantes de la flore malienne, nous estimons que les résultats obtenus constituent des preuves scientifiques tangibles pouvant justifier des études beaucoup plus approfondies dont le seul but sera d'aboutir à la mise en place de formes thérapeutiques facilement accessibles pour nos populations.

RECOMMANDATIONS

Au regard des résultats obtenus et de la conclusion de cette étude, les recommandations suivantes ont été formulées, et s'adressent aux structures suivantes:

➤ INRSP :

Mettre à la disposition du DMT (qui a en son sein un personnel dévoué et motivé pour la cause humaine) tous les moyens financiers et matériels (conditions sine qua non pour effectuer des recherches approfondies) afin qu'il poursuive les investigations d'une part sur deux plantes que sont *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* qui ont démontré une forte activité antioxydante et d'autre part sur toutes les quatre plantes qui ont présenté des activités larvicide (surtout *Hyptis suaveolens* et *Calotropis procera*) et anticholinérasique relativement bonnes car liées au type d'extrait.

➤ Ministère de la santé, Ordres professionnels de la Santé, Fédération Malienne des Thérapeutes Traditionnels:

Rendre pérenne la collaboration entre chercheurs et tradipraticiens de santé.

➤ Ministère de la Santé, Ministère des Enseignements Secondaire Supérieur et de la Recherche Scientifique, Partenaires Techniques et Financiers:

Appuyer les structures de recherches par les moyens (matériels et financiers) car la promotion de la médecine traditionnelle dans un pays aussi pauvre que le nôtre ne doit pas être seulement une préoccupation départementale ou de faculté mais plutôt une lutte par tous et convaincu de cela, il est important voire impérieux que chacun y mette le sien.

REFERENCES

A

1. **Abassi, K., Atay, Z., Kadiri, et Ghaout S.**, 2004, *Zool.baetica*, 15: 153-166.
2. **Adewoye R.O., Rao J. B.** (1977). *Acacia nilotica* variety *andansonii* pods (Bagaruwa) of Nigeria. pp 293-301.
3. **Adeolu O. Eshilokun, Adeleke A. Kasali et Abdullatif O. Giwa-Ajenya.**(2005) Chemical composition of essential oils of two *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves from Nigeria. *Flavour et fragrance journal* 20: 528-530.
4. **Adjanohoun E.J., Eyme J., Drame K.L., Fouraste I., Issa Lo, Le Bras M., Le Joly J., Boukef K., Penge On'okoko et Waechter P., Eyog Matg O., Agossou M.** (2001). *Revue de médecine et pharmacopées africaines*. Volume 15.
5. **Allain, Pierre** (1996) *Pharmacologie : les médicaments* – Ed ESTEM– 414p.
6. **Anderson C.M., Halleberg A. et Hogberg T.** (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res* 28, 65-180p.
7. **Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., Mahari S.**(2006). Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles de *Ricinus communis L.* et du bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2), 67-71p.
8. **Ayoub H., S. M. , Yankov L. K.** (1987). Molluscicidal properties of the sudan *Acacia*. *Fitoterapia*. Vol. L VIII, N°5, pp363-366.
9. **Azevedo N.R., Campos I.F.R, Ferreira H.D., Portes T.A., Seraphin J.C., Realino De Parola J., Santos S.C., Ferri P.H.** (2002) Essential

oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilia Cerrado. Biochemical systematics et ecology 30, 205-216p.

B

10. **Bah, S.** (1998) Sensibilité de *Anopheles gambiae* aux insecticides organiques de synthèse et à divers extraits de plantes medecinales du Mali. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Bamako (Mali), 129p.
11. **Bettolo, M.G.B., Galeffi, C.** (1988) The New approches to utilization of plants in the preparation of pharmaceuticals and insecticides, Fitoterapia, Volume LIX, N^o3, 179-203.
12. **Bruneton, J.** (1993): Pharmacognosie et Phytochimie des plantes médicinales. Lavoisier, Paris, 2^{ème} édition, 914p
13. **Burkill, H.M.** (1994) The useful plants of west tropical Africa. Volume 2.
14. **Burkill, H.M.** (1997). The useful plants of west tropical Africa. Royal gardens, vol.4, 969p

C

15. **Cavin, A.** (1999). Investigation phytochimique des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires : *Tinospora crisa* (Menispermaceae), *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Oreophea eneandra* (Annonaceae) - Thèse de doctorat, Lausanne 243 p
16. **Chandre, F., Darriet, F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J., et Guillet P.** (1999) Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, recueil d'articles N^o1, 77(3) ; 230-234.
17. **Chukwujekwu J.C., Smith P., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., Vanstaden, J.** (2005) Antiplasmodial diterpenoïd from the leaves of *Hyptis suaveolens*. Journal of ethnopharmacology 102, 295-297p.
18. **Chung, Y.K., Heo, H.J., Kim, E.K., Kim, H.K., Huh, T.L., Lim, Y., S.K., Shin, D.H.** (2001) Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase. Mol. Cells 11, 137-

19. **Cohen Y.** (1994)-Abrégés de Pharmacologie 4è Edition, Masson Paris Milan Barcelone 441p.

D

20. **Dan Dicko-Zafimahoval** et **Eyme J.** (1988) Médecine traditionnelle et pharmacopée. Volume 2, numéro 2.
21. **Diakité, B.** (2008) La susceptibilité des larves de *Anopheles gambiae* s.l. à des extraits de plantes médicinales du Mali. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Bamako (Mali), 80p.
22. **Diallo, A.** (2005) - Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* Willd. (*Myrtaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako, 98p.
23. **Diallo, D., Hveen, B. et Berge, G.** (1996). Traditional medicine in the sahel: Plants used for Healing in the Malian Gourma, West Africa. *Ethnobiology in human welfare, Ed. S. K. Jain, 1996; PP 101-104.*
24. **Diallo, D.** (2000) – Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositilius* (*Aizoaceae*), *Diospyros abyssinica* (*Ebenaceae*), *Entada Africana* (*Mimisaceae*), *Trichilia emetica* (*Meliaceae*). These de doctorat, Lausanne, 2000, 211p.
25. **Diallo D., Marston A. Terreaux C., Touré Y., Paulsen B., Smestad et Hostettman K.** (2001). Screening of Malian Medicinal Plants for Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxydant and Radical Scavenging Activities. *Phytotherapy Research*, 2001, 15, 401 – 406.
26. **Doumbia, S.** (1989) Contribution à l'étude épidémiologique du paludisme, des bilharzioses et des parasitoses intestinales dans un quartier péri-urbain de Bamako : Banconi. Thèse de Médecine, Ecole de Médecine et de Pharmacie, Bamako, Mali, 96p.

E

27. **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M.** (1961)
A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

F

28. **Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araùjo M.E.M. Araùjo.** (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxydant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108 31-37.
29. **Fulton, B. et Benfield, P.** (1996) Galanthamine. *Drugs aging* 1: 60-65

G

30. **Gallegos Olea R.S., Oliveira A.V., Selveira L.M.S., Silveira E.R.,** (2002) FITOTERAPIA. The journal for the study of medicinal plants. Volume 73, numéro 3.
31. **Gentilini, M,** 1993 Situation de la résistance aux pyrethrinoides chez *Anopheles gambiae sensu lacto*. *Medecine tropicale*, 5^{ème} edition Flammarion, France.
32. **Guillet P.,** Atelier lutte antivectorielle. Les principales familles d'insecticides et leurs modes d'action. Montpellier, OMS, 31/08-2/09/1999.
33. **Guillet P, Chandre F, Akogbeto M, Darret F, Faye O.** (1996) Resistance of *Anopheles gambiae s.l.* to pyrethrinoids in Africa and the use of impregnated materials. Meeting on insecticide impregnated Materials, Brazaville, Congo 18-20 March.
34. **Guillet P.** (Mai 1995) ORSTOM / Centre Montpellier. La résistance des vecteurs aux insecticides.
35. **Guillet P.** (Septembre 1999) Atelier lutte antivectorielle. Les principales familles d'insecticides et leurs modes d'action. Montpellier, OMS.

36. **Gunnvor, B., Diallo D., et Hveem, B.,** Les plantes sauvages du sahel malien. Les stratégies d'adaptation à la sécheresse des sahéliens.

H

37. **Hamon, J., Eyraud, M., Diallo, B., Dyenkouma, A., Choumara, H.B. et Sylla, O.,** 1961. Les moustiques de la république du Mali (*Dipt. Culidae*)
38. **Hamon J. et Sales S.** (1970) Etude de la relation existant chez les moustiques adultes, entre la durée d'exposition à un insecticide et la mortalité résultante. Bull.org.Mond.Santé, 43,757-762p.
39. **Holstein M.** (1949). Guide pratique de l'anophélisme en Afrique de l'Ouest Française (A.O.F). Service Général d'hygiène Mobile et de Prophylaxie, Dakar, 54p.
40. **Hussein Ghazi, Miyashiro Hirotugu, Nakamura Norio, Hattori Masao, Kawahata Takuya, Otake Toru, Kakiuchi Nobuko et Shimotohno Kunitada.** (1999). Inhibitory effects of sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. Phyotherapy research, phytother. Res. 13, 31-36p.

K

41. **Kerharo, J. et Adam, J.G.** 1974, Pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. pp556-587.
42. **Krinsky, N.I.** (1989) Antioxydant functions of carotenoids. Free radicals, Bio. Med. 7, 6p.

L

43. **Lee, K.Y., Sung, S.H., Kim, Y.C.,** (2003) New acetylcholinesterase-inhibitory pregnane glycosides of *Cynanchum atratum* roots. Helvetica Chim. Acta 86, 474-483p.

M

44. **Madhavavi D. L., Deschpandle S. et Salunkle D. K.** (1996) Food antioxydants technological, toxicological and health perspectives, Ed. Marel Dekker, New York, 101p.
45. **Malgras, D.** (1992) Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes, Editions KARTHALA et ACCT pp 386-387.
46. **Marston A., Maillard M., Hostettmann K.** (1993) Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from african medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 38, 215-223p.
47. **Masquelier J. et Michaud J.** (1973) Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tannins catéchiques, leurs relations avec la vitamine C₂ (D). *Produits et problèmes pharmaceutiques- Vol.28, N°7.*
48. **Mattingly, P.F.** (1969) The biology of mosquito-borne disease, in *The science of biology, Series I*, pp 13-183.
49. **Mc Gregor** (1988). *Principe and Practice of Malariology. MALARIA, Vol-2, 1213-1226p.*

O

50. **OMS** (1994) *Stratégie mondiale de lutte antipaludique* Genève, OMS.
51. **OMS** (1993) - *Stratégies de lutte contre le paludisme dans la région africaine et étapes pour leur mise en œuvre. Cahiers Techniques AFRO, 23, 1-20p.*
52. **OMS** (1995). *Lutte contre les vecteurs du paludisme et autres maladies transmises par les moustiques. Rapport d'un groupe d'étude de l'OMS, Genève, OMS, Série de Rapports techniques, N°857.*
53. **Oueleguem T.** (1999) *Etude de l'activité larvicide de quelques plantes médicinales du Mali sur les larves de *Anopheles gambiae s.s.* et *Culex quinquefasciatus*. Thèse de Doctorat en Pharmacie, 1999, Bamako (Mali), 88p.*

P

54. **Paris, M et Hurabielle, M.** (1981). Abrégés de Matière médicale (Pharmacognosie). Tome 1. Généralités- Monographie, Paris, Masson, 339p.
55. **Perry Niolette S.L., Houghton P.J., Theobald Anthony, Jenner Peter, Perry Elaine K.**, 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. The Journal of Pharmacy and Pharmacology 52, 895-902p.
56. **Perry, N.S.L., Houghton, P.G., Sampson, J., Theolad, A.E., Hart, S., Lis-balchin, M., Hout, J.R.S., Evans, P., Jenner, P., Milligan, S., Perry, E.K.**, (2001) In vitro activities of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. J. Pharm. Pharmacol. 53, 1347-1356p.
57. **Peter J. Houghton, Joseph M. Agbedakunsi et Aderonke Adegbulugbe.** (2004) Cholinesterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species.
58. **Pincemail, J. ; Meurisse, M. ; Limet, R. ; Defraigne, Jo.** (1999) – Méthodes d'évaluation du stress antioxydant chez l'homme : importance en matière de prévention – Cancérologie – Ed MEDI SPHERE.
59. **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O.** (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme 16, 233-339p.
60. **PNLP-Mali** (Mars 2004) Rapport de la collecte des données de base pour le suivi et l'évaluation des interventions de lutte contre le paludisme au Mali.
61. **Pulol K. Mukherjee, Venkatesan Kumar, Mainak Mal, Peter J. Houghton.** (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine 14, 289-300p.
62. **Pyor W A** (1976-1982). Free radical in biology, Ed. Academic press New York, 1-5p.

R

63. **Rhee, I.K., Meent, M.V., Ingkaninan, K., Verpoorte, R.,** (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combinaison with bioactivity staining. *J. Chromatogr.A* 915, 217-223
64. **Richard A. Harvey; Pamela C. Champe; Richard D. Howland; Mary J. Mycek,** (2006) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, Third Edition, 552p.

S

65. **Sawadogo Laya, Houdérine Louis-Marie, Thibault Jean-François, Rouan Xavier.** Bulletin Médecine traditionnelle, 1988, volume 2, numéro 1. Mise en évidence d'une activité lactogène dans des extraits végétaux.
66. **Sharma N., Quadry J. S., Subrabanium B., Verghese T., Rahman, S. S., Sharma, S. K. et Jalees, S.** (1998) Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephansi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*; *Pharmacology biology*, Vol. 36, N°1, January, pp3-7.
67. **Soderlund, D.M. et Blomquist, J.R.** (1990) Molecular mechanisms of insecticide resistance, In: *Pesticide resistance in arthropods*. Roush, R.T. et Tabashnik, B. E (eds). Chapman on hall, New york: 58-96p.

T

68. **Tchoumbougnany F., Amvam Zollo P.H., Fekam Boyom F., Nyegue M.A., Bessiere J.M. et Memait C.** (2005). Aromatic plants of tropical central Africa. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis suaveolens* from Cameroon: *Hyptis lanceolata*. Poit, *Hytpis peatinata* (L.) Poit, *Hyptis spicigera* Lam. And *Hyptis suaveolens* Poit. *Flavour and fragrance journal* 20: 340-343p
69. **Touré, Y.T.** (1979). Bioécologie des anophèles (*Diptera-Culicinae*) dans une zone de Savane soudanienne au Mali (village de Banambani.)

Incidence sur la transmission du paludisme et de la filariose de Bancroft.
Thèse de 3^{ème} cycle, Centre Pédagogique Supérieur, Bamako, Mali.

70. **Traoré S.K.** (1986) Sensibilité des vecteurs importants du paludisme dans une zone d'inondation du Mali. Mémoire de fin d'études, Ecole Normale Supérieure Bamako.

V

71. **Viqar Uddin Ahmad, Hidayat Hussain, Ishfaq A. Bukhari, Javid Hussain, Amir Reza Jassbi, Ahsana Dar.** (2005) The journal for the study of medicinal plants. FITOTERAPIA: volume 76, numéro 2, Mars.

W

72. **Waechter O. Eyog-Matig, Agossou M.,** (2001) Revue de médecine et pharmacopées africaines. Volume 15.
73. **WHO** (1984): Chemical methods for the control of arthropod vectors and pests of public health importance, Geneva.

FICHE SIGNALÉTIQUE

NOM : KONE

PRENOM : Dahafolo

TITRE DE LA THESE : Etude de la phytochimie et des activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante de quatre (04) plantes : *Acacia nilotica* (Guill.et Perr.) O. Ktze Mimosaceae, *Calotropis procera* (Ait.) Ait.F. Asclepiadaceae, *Euphorbia sudanica* A. Chev Euphorbiaceae, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit Lamiaceae

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2008 - 2009

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako (Mali)

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS)

SECTEUR D'INTERET : Médecine traditionnelle

RESUME

Notre étude a porté sur les fruits entiers de *Acacia nilotica*, les rameaux feuillés de *Calotropis procera*, les parties aériennes de *Euphorbia sudanica* et *Hyptis suaveolens*.

Nous avons effectué un screening phytochimique de ces plantes par des réactions en tube et par chromatographie sur couche mince (CCM). Les réactions de caractérisation en tube ont montré la présence de plusieurs groupes chimiques qui pourraient être responsables des activités pharmacologiques retrouvées au cours de l'étude notamment les coumarines, les hétérosides cardiotoniques, les stérols, les triterpènes et les tanins.

Après la phytochimie, nous avons procédé à l'évaluation des activités biologiques.

Les extraits organiques de toutes les plantes ont montré une activité larvicide. Cependant, les extraits dichlorométhaniques se sont avérés plus efficaces. Parmi les décoctés, seuls ceux de *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* ont été actifs mais à des concentrations beaucoup plus élevées que celles des extraits organiques.

Tous les extraits organiques ont démontré une bonne activité anticholinestérasique avec une activité plus marquée pour les extraits d'éther de pétrole.

L'activité antioxydante a été positive avec les extraits méthanoliques et décoctés de *Acacia nilotica* et *Hyptis suaveolens* tandis que les autres extraits n'ont pas réagi. Par ailleurs, il faut souligner que ces deux plantes ont à la fois les propriétés larvicide, anticholinestérasique et antioxydante pour leurs extraits méthanoliques.

Mots clés :

- ✎ Mali ;
- ✎ Plantes médicinales ;
- ✎ Activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante.

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

Je le jure !

