



Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali

Mamadou Badiaga

► To cite this version:

Mamadou Badiaga. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22187 . tel-00719564

HAL Id: tel-00719564

<https://theses.hal.science/tel-00719564>

Submitted on 20 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

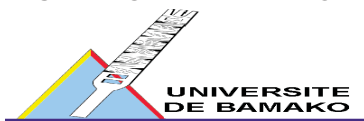
REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE UN BUT UNE FOI

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Collaboration inter-universitaire

UNIVERSITE DE BAMAKO



FACULTE DES SCIENCES &
TECHNIQUES (FAST)

UNIVERSITE BLAISE PASCAL DE
CLERMONT-FERRAND



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES
FONDAMENTALES (EDSF)

N°...

THESE (cotutelle)

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Mention : Chimie Organique)

Par

Mamadou BADIAGA

**ETUDE ETHNOBOTANIQUE, PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES
DE NAUCLEA LATIFOLIA SMITH UNE PLANTE MEDICINALE AFRICAINE
RECOLTEE AU MALI**

Soutenue publiquement à la FAST de Bamako le 7/12/2011, devant la commission d'examen

Président : **M. Mamady DIAWARA**, Professeur à la FAST de Bamako

Directeur de Thèse : **M. Yves TROIN**, Professeur à l'ENSC de Clermont-Ferrand

Co-directeurs : **M. Pierre CHALARD**, Maître de Conférences à l'ENSC de Clermont-Ferrand

M. Lassine SIDIBE, Professeur à la FAST de Bamako

Rapporteurs : **Mme Chantal MENUT**, Professeur à l'ENSC de Montpellier

M. Drissa DIALLO, Professeur à la FMPOS de Bamako

Examineurs : **Mme Marion GABANT**, Chargée de recherche, société l'Oréal, Paris

M. Babakar DIOP, Maître de Conférences à la FAST de Bamako

“ Celui qui a planté un arbre avant de mourir n’a pas vécu inutile “

... dit un proverbe indien.

A la mémoire de ma mère Lallé CAMARA et de mon frère Saloum BADIAGA.

A mes parents, à mes frères et sœurs, à ma famille et à tous mes amis.

REMERIEMENTS

Ce travail de recherche est le fruit de nombreuses collaborations pluridisciplinaires, il se situe à la frontière entre la chimie et la biologie ayant une finalité thérapeutique. Mes chaleureux remerciements à toutes les personnes qui ont soutenu cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Yves TROIN, qui est mon directeur de thèse et directeur du Laboratoire de Chimie des Hétérocycles & Glucides de m'avoir accepté dans son équipe.

J'exprime, ma profonde reconnaissance à Monsieur Pierre CHALARD, Maître de Conférences à l'ENSC de Clermont-Ferrand qui est mon co-directeur de thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant 3 longues années. Si ce travail est présentable aujourd'hui, c'est grâce à ses efforts inlassables, à sa probité sans faille et surtout à l'aide qu'il m'a apporté pour le complément de financement afin de mener à bien ce travail. Il a toujours su répondre à mes préoccupations. Sa disponibilité, ses nombreux conseils et son soutien ont été déterminants pour la réussite de ce travail fastidieux. Je le remercie de la gratitude et de la confiance qu'il a témoignée pendant ces années à ma modeste personne.

Mes sincères remerciements à Monsieur Lassine SIDIBE, Professeur à la FAST de l'Université de Bamako, d'avoir accepté de codiriger cette thèse. Je le remercie sur le choix du sujet de thèse, de ses conseils pertinents, et d'avoir tenu à m'assister pendant tout le long de cette thèse. Il m'a beaucoup aidé et soutenu pour l'octroi de la bourse de thèse, je le remercie du fond de cœur pour son apport constant.

Mes vifs remerciements au Professeur Jean Claude CHALCHAT de m'avoir guidé et orienté vers ce travail de thèse. Son implication personnelle m'a valu l'octroi de la bourse de la coopération française.

Je remercie tous les membres du jury qui ont accepté de juger la qualité de ce travail. Je rends hommage à Monsieur Mamady DIAWARA, Maître de Conférences à la FAST de l'Université de Bamako en sa qualité du président du jury, à Monsieur Drissa DIALLO, Professeur à la Faculté de Médecine, Pharmacie et Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako-Département de Médecine Traditionnelle (rapporteur), à Madame Chantal MENUT, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (rapporteur), à Docteur Marion GABANT, du département de chimie analytique, Laboratoire de Purification des Extraits Naturels de la société l'Oréal de Paris (examineur) et à Monsieur Babacar DIOP, Maître de Conférences à la FAST de l'Université de Bamako (examineur).

Je dis merci au corps professoral, à tous les doctorants et à tous les stagiaires du Laboratoire de Chimie des Hétérocycles & Glucides. J'exprime également toute ma sympathie à Monsieur Gilles FIGUEREDO de LEXVA Analytique ainsi qu'au

personnel de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et de l'Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand.

Mes remerciements au Doyen de la Faculté des Sciences & Techniques de Bamako, Professeur Hamidou DOUCOURE, à tout le corps professoral et à tout le personnel de la FAST pour leur soutien moral.

J'exprime profondément ma gratitude à l'Ambassade de France à Bamako via son Service de Coopération et d'Action Culturelle. Cette thèse a bénéficié de l'appui financier du SCAC à travers le projet de « valorisation des ressources du terroir par le renforcement des capacités de formation », une collaboration inter-universitaire entre le Mali et la France. Dans cette expression, mes considérations distinguées à Monsieur Thierry VIELLE, à Madame Dominique BORDES-MSILTI, à Madame Annick PRATS-JENART et à tout le personnel de l'Ambassade de France à Bamako.

Je dis merci à Madame Florence CALDEFIE-CHEZET, à Madame Laetitia DELORT, à Madame Hermine BILLARD et à tout le personnel du Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques Pharmaceutiques de l'équipe EA4233 « Nutrition, Cancérogénèse et Thérapie antitumorale » de la Faculté de Pharmacie de l'Université d'Auvergne pour leur accueil et les bonnes dispositions pour la mise en œuvre des tests anticancéreux.

Un grand merci à Monsieur Fabien MARCHAND du « Pôle Neurosciences » de la Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne, il n'a ménagé aucun effort pour la réalisation des tests antalgiques.

Je ne saurai terminer sans omettre d'exprimer ma profonde reconnaissance à l'endroit de mes aînés et camarades Aimé Ainin SOMBORO, Sékou BOUARE, Hamadoun MAÏGA et à tout le personnel du Laboratoire de Chimie Organique et des Substances Naturelles de la FAST de Bamako.

Que toutes les personnes qui ont collaboré ou aidé dans l'élaboration de ce travail de recherche soient assurées de ma profonde reconnaissance.

Je remercie pleinement tous mes amis du Mali et ceux côtoyés au cours de ces années de recherche pour leur soutien déterminant.

Une mention spéciale à toute la famille BADIAGA de Bamako, de Marseille et de Paris, elle m'a soutenue et a toujours cru à mes capacités.

Que ceux et celles qui ne sont pas nommé(e)s ne se sentent pas oublier. Je ne saurai oublier personne car vous avez été tous et toutes là pour moi, je vous garde dans ma pensée.

Merci à tous et à toutes pour les efforts consentis d'une façon ou d'une autre!

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

- AcOH : acide acétique
- AcOEt : acétate d'éthyle
- AT : alcaloïdes totaux
- Ca : calcium
- CCM : chromatographie sur couche mince
- CH₂Cl₂ : chlorure de méthylène
- CHCl₃ : chloroforme
- (CH₃COO)₂Pb, 3H₂O : trihydrate d'acétate de plomb
- CHG : Chimie des Hétérocycles & Glucides
- C₆D₆ : cyclohexane deutéré
- CDCl₃ : chloroforme deutéré
- CI 50 : concentration d'inhibition à 50 pourcent
- Co : cospot
- CPG : chromatographie phase gazeuse
- CRMT : Centre Régional de Médecine Traditionnelle
- Cu : cuivre
- Cyclo : cyclohexane
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DMT : Département de Médecine Traditionnelle
- E : écorces
- EDSF : Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales
- ENSCCF : Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand
- Et₂O : éther diéthylique
- EtOH : éthanol
- F : feuilles
- FAST : Faculté des Sciences et Techniques
- FATTB : Fédération des Associations des Tradi-Thérapeutes de Bandiagara
- Fe : fer
- FeCl₃ : perchlorure ferrique ou chlorure ferrique
- g : gramme
- GC : gas chromatography ou chromatographie phase gazeuse
- GC/MS : couplage chromatographie gaz/spectrométrie de masse
- h : heure
- HCl : acide chlorhydrique
- HPLC : high performance liquid chromatography ou chromatographie liquide à haute performance
- H₂SO₄ : acide sulfurique
- IASP : International Association for the Study of Pain
- I_m : indice de mousse
- INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique
- Ka : Kanadjiguila
- Kg : kilogramme

- Ki : Kita
- Ko : Koulouba
- KOH : hydroxyde de potassium
- l : litre
- λ : lambda (longueur d'onde)
- LC : liquid chromatography ou chromatographie en phase liquide
- LC/MS : couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse
- Lf : Lafiabougou
- Ls : Lassa
- m : mètre
- MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7 (cellules cancéreuses mammaires)
- MeOH : méthanol
- μ : micron
- μg : microgramme
- $\mu\text{g/ml}$: microgramme par millilitre
- μl : microlitre
- Mg : magnésium
- mg : milligramme
- mg/kg : milligramme par kilogramme
- MgSO_4 : sulfate de magnésium
- ml : millilitre
- mn : minute
- MS : Mass Spectrometry ou spectrométrie de masse
- MTA : Médicament Traditionnel Amélioré
- *N.* : *nauclea*
- nm : nanomètre
- NaOH : hydroxyde de sodium
- Na_2SO_4 : sulfate anhydre de sodium
- NH_4OH : ammoniaque ou hydroxyde d'ammonium
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PBS : phosphate buffered saline ou tampon phosphate salin
- pH : potentiel hydrogène
- % : pourcentage
- R : racines
- RMN : Résonance Magnétique & Nucléaire
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
- SbCl_3 : trichlorure d'antimoine
- SCAC: Service de Coopération et d'Action Culturelle
- Sm. : Smith
- SVF : sérum de vaux fœtal
- UV : rayonnement ultra-violet

LISTE DES IMAGES

Image 1 : *Ochrosia elliptica*, exemple de plante qui renferme les alcaloïdes de type ellipticine

Images 2 et 3 : Fleurs et fruits de *N. latifolia* Sm.

Images 4 et 5 : Fruits murs de *N. latifolia* Sm.

Images 6 et 7 : Troncs et feuilles de *N. latifolia* Sm.

Image 8 : *Nauclea latifolia* Sm dans son habitat naturel

Image 9 : Carte du Mali (zones d'enquête et de récoltes)

Image 10 : Plaque à 96-puits pour le test antitumoral

Image 11 : Réduction de la résazurine en résorufine

Images 12 et 13 : Disposition des différentes concentrations d'extraits d'alcaloïdes totaux dans les plaques à 96 puits

Image 14 : Disposition d'un lot de 4 souris pour le test de KOSTER

Image 15 : Photo d'une souris qui crampe

LISTE DES TABLEAUX

Enquête ethnobotanique

Tableau 1 : Utilisations des feuilles de *N. latifolia* Sm.

Tableau 2 : Utilisations des fruits de *N. latifolia* Sm.

Tableau 3 : Utilisations des écorces de *N. latifolia* Sm.

Tableau 4 : Utilisations du gui de *N. latifolia* Sm.

Tableau 5 : Utilisations des racines de *N. latifolia* Sm.

Tableau 6 : Utilisations du mélange fruits + racines de *N. latifolia* Sm.

Tableau 7 : Utilisations du mélange écorces + racines de *N. latifolia* Sm.

Caractérisation chimiques

Tableau 8 : Résultat de recherche des alcaloïdes dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 9 : Résultat de recherche des substances polyphénoliques (tanins + flavonoïdes) dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 10 : Résultat de recherche des dérivés anthracéniques dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 11 : Résultat de recherche des stérols, triterpènes et coumarines dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 12 : Résultat de recherche des hétérosides cardiotoniques dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 13 : Résultat de recherche des saponosides dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Tableau 14 : Résultat de recherche des composés réducteurs dans les différents organes de *N. latifolia* Sm.

Extraction des alcaloïdes

Tableau 15 : Quantité de matière par organes et volume de solvants utilisés par site.

Tableau 16 : Quantité de matière par organes et par site nécessaire pour la 2^e étape de l'extraction.

Tableau 17 : Quantité de matière par organes et par site nécessaire pour la 3^e étape de l'extraction.

Tableau 18 : Résultats comparatifs des extraits d'AT issus des différents de *N. latifolia* Sm.

Fractionnement

Tableau 19 : Résultat de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'AT des feuilles du site de Kanadjiguila.

Tableau 20 : Résultat de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'AT des feuilles du site de Kita.

Tableau 21 : Résultat de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'AT des feuilles du site de Lassa.

Tableau 22 : Résultat de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait d'AT des feuilles du site de Lafiabougou.

Activité antitumorale

Tableau 23 : Extrait d'AT des feuilles de Kanadjiguila.

Tableau 24 : Extrait d'AT des feuilles de Kita.

Tableau 25 : Extrait d'AT des feuilles de Lafiabougou.

Tableau 26 : Extrait d'AT des feuilles de Lassa.

Tableau 27 : Extrait d'AT des feuilles de Koulouba.

Tableau 28 : Extrait d'AT des écorces de Kanadjiguila.

Tableau 29 : Extrait d'AT des écorces de Lafiabougou.

Tableau 30 : Extrait d'AT des écorces de Lassa.

Tableau 31 : Extrait d'AT des écorces de Koulouba.

Tableau 32 : Extrait d'AT des racines de Kanadjiguila.

Tableau 33 : Extrait d'AT des racines de Lafiabougou.

Tableau 34 : Extrait d'AT des racines de Lassa.

Tableau 35 : Extrait d'AT des racines de Koulouba.

Activité antalgique

Tableau 36 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 5 extraits des feuilles.

Tableau 37 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 3 extraits des écorces.

Tableau 38 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 3 extraits des racines.

Tableau 39 : Moyenne de crampes en fonction du temps et d'extraits pour chaque lot de souris.

Annexe

Tableau 40 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles, écorces et racines de Kanadjiguila.

Tableau 41 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles, écorces et racines de Lafiabougou.

Tableau 42 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles et racines de Koulouba.

Tableau 43 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles et écorces de Lassa.

Tableau 44 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles de Kita.

LISTE DES SPECTRES RMN

Fractionnement

Spectre 1 : RMN ^1H dans CDCl_3 du produit FKi_9D_1 .

Spectre 2 : RMN ^1H dans CDCl_3 du produit FKi_9D_2 .

Annexe

Spectre 3 : RMN ^1H dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

Spectre 4 : RMN ^{13}C dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

Spectre 5 : RMN COSY dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

Spectre 6 : RMN HMBC dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

Spectre 7 : RMN HSQC dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

Spectre 8 : RMN ^1H dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKi_{4-7} .

Spectre 9 : RMN ^{13}C dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKi_{4-7} .

Spectre 10 : RMN COSY dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKi_{4-7} .

Spectre 11 : RMN HSQC dans CDCl_3 du produit A isolé de la fraction FKi_{4-7} .

Spectres 12 et 13 : RMN ^1H dans C_6D_6 du produit A isolé de la fraction FKa_4 .

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1 : Différents cas de cancers répertoriés chez la femme en 2005 (France).

Graphique 2 : Evolution comparative de CI 50 des extraits d'AT des 3 organes de *N. latifolia* Sm.

Graphique 3 : Evolution du % d'inhibition en fonction des extraits d'AT des différents organes de *N. latifolia* Sm. testés sur les cellules MCF-7.

Graphique 4 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'AT des racines de *N. latifolia* Sm.

Graphique 5 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'AT des feuilles de *N. latifolia* Sm.

Graphique 6 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'AT des écorces de *N. latifolia* Sm.

Graphique 7 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les feuilles, écorces et racines de Lafiabougou (annexe).

Graphique 8 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les feuilles et racines de Koulouba (annexe).

Graphique 9 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les feuilles et écorces de Lassa (annexe).

Graphique 10 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les feuilles, écorces et racines de Kanadjiguila (annexe).

Graphique 11 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les feuilles de Kita (annexe).

SOMMAIRE

Résumé.....	1
Summary.....	2
Introduction générale.....	3
Partie 1 : Etude bibliographique.....	8
Chapitre 1 : Alcaloïdes.....	9
1. Définition des alcaloïdes.....	10
2. Historique des alcaloïdes.....	14
3. Sources d'alcaloïdes.....	16
3.1. Les végétaux.....	16
3.2. Autres sources d'alcaloïdes.....	18
4. Classification par structures des alcaloïdes.....	20
5. Origine biosynthétique des alcaloïdes.....	22
6. Localisation des alcaloïdes.....	24
7. Fonction des alcaloïdes.....	25
8. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes.....	26
9. Détection et caractérisation des alcaloïdes.....	28
10. Extraction des alcaloïdes.....	29
11. Techniques de dosage des alcaloïdes.....	29
12. Utilité et usages pharmacologiques des alcaloïdes.....	30
Chapitre 2 : Etude monographique de <i>Nauclea latifolia</i> Smith.....	33
1. Présentation botanique.....	33
1.1. Systématique.....	33
1.2. Caractéristique de la plante.....	33
1.3. Habitat naturel de la plante.....	35
2. Propriétés thérapeutiques de la plante.....	36
2.1. Différents organes de <i>Nauclea latifolia</i> Smith.....	37
2.1.1. Feuilles.....	37
2.1.2. Ecorces de tronc.....	37
2.1.3. Racines.....	37
2.1.4. Sève des tiges.....	38
2.1.5. Fruits.....	38
2.2. Autres utilités de la plante.....	39
2.2.1. Bois.....	39
2.2.2. Utilité dans l'artisanat africain.....	39
2.3. Remarques.....	39
3. Types d'alcaloïdes isolés à partir de <i>Nauclea latifolia</i> Smith.....	39
4. Conclusions.....	43
Références.....	45
Partie 2 : Etudes expérimentales.....	56

Introduction.....	56
Objectif.....	58
Chapitre 1 : Enquête ethnobotanique.....	59
1. Description et choix des localités de l'enquête.....	59
2. Méthodologie.....	60
2.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique.....	61
2.2. Analyse et discussion des résultats.....	67
2.3. Conclusion.....	68
Chapitre 2 : Caractérisation chimique.....	70
1. Lieu de cueillette des différents organes des plantes.....	70
1.1. Site de Kanadjiguila : récolte au bord d'une rivière.....	70
1.2. Site de Lafiabougou : récolte au flanc de la colline.....	70
1.3. Site de Lassa : récolte sur la colline.....	70
1.4. Site de Koulouba : récolte sur la colline.....	70
1.5. Site de Kita.....	71
2. Végétation et pluviométrie.....	71
3. Période et choix de prélèvements.....	71
4. Préparations des échantillons.....	71
5. Réactions de caractérisation.....	72
5.1. Matériel et méthodes.....	72
5.1.1. Caractérisation des alcaloïdes.....	72
5.1.2. Caractérisation des tanins.....	73
5.1.3. Caractérisation des flavonoïdes.....	73
5.1.4. Caractérisation des dérivés anthracéniques.....	74
5.1.5. Caractérisation des stérols et triterpènes.....	74
5.1.6. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques.....	75
5.1.7. Caractérisation des saponosides.....	75
5.1.8. Caractérisation des composés réducteurs.....	76
5.2. Résultats des caractérisations phytochimiques.....	76
6. Analyse et discussion.....	79
Chapitre 3 : Méthodes d'extraction des alcaloïdes.....	83
1. Extraction des alcaloïdes.....	83
1.1. Matériel et méthodes : Extraction en milieu alcalin.....	83
1.2. Isolement des alcaloïdes.....	85
1.3. Résultats d'extraction des alcaloïdes.....	87
2. Fractionnements.....	88
2.1. Séparation des A.T des feuilles du site de Kanadjiguila.....	88
2.2. Séparation des A.T des feuilles du site de Kita.....	91
2.3. Séparation des A.T des feuilles du site de Lassa.....	98
2.4. Séparation des A.T des feuilles du site de Lafiabougou.....	100
3. Conclusion.....	103
Références.....	104
Partie 3 : Activités biologiques des extraits alcaloïdiques de <i>N. latifolia</i> Sm.....	109
Introduction.....	109

1. Activité anticancéreuse.....	110
1.1. Généralités.....	110
1.2. Matériel et méthodes.....	114
1.3. Résultats.....	116
1.3.1. Extraits A.T issus des feuilles de <i>N. latifolia</i> Sm.....	116
1.3.2. Extraits A.T issus des écorces de <i>N. latifolia</i> Sm.....	117
1.3.3. Extraits A.T issus des racines de <i>N. latifolia</i> Sm.....	118
1.4. Analyse et discussions.....	119
1.5. Conclusion.....	121
2. Activité antalgique.....	122
2.1 Généralités.....	122
2.2. Matériel et méthodes.....	123
2.2.1. Matériel.....	123
2.2.2. Méthodes.....	124
2.3. Résultats.....	126
2.4. Analyse et discussions.....	129
2.5. Conclusion.....	132
Références.....	133
Conclusion générale et perspectives.....	135
Annexes.....	137

RESUME

Nauclea latifolia Smith (*Rubiaceae*) est une plante aux vertus médicinales beaucoup plus connues en Afrique sub-saharienne dans la pharmacopée traditionnelle pour ses nombreuses activités pharmacologiques.

N. latifolia Sm. est un arbre ou arbuste d'espèce soudano-sahélienne ; ses zones d'abondance sont principalement l'Afrique Occidentale et Centrale. Sa large utilisation en médecine traditionnelle, nous a incités à réaliser une enquête ethnobotanique et un screening phytochimique afin de mettre en cohérence les prescriptions et les activités potentielles des constituants chimiques présents.

Les principales classes de métabolites secondaires, principalement les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les stérols et terpéniques ont été recherchés dans les feuilles, écorces et racines de la plante.

N. latifolia Sm. de par la présence des nombreuses familles chimiques, possède des activités biologiques intéressantes. Les extraits d'alcaloïdes totaux issus des 3 organes de la plante, ont prouvé une activité anticancéreuse. Ces extraits inhibent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Outre, l'activité antitumorale, les extraits alcaloïdiques de *N. latifolia* Sm. agissent contre la douleur. Ils inhibent l'effet de la douleur après injection de l'acide acétique à 0,6% chez la souris.

Cependant, *N. latifolia* Sm. se présente comme une plante aux nombreux médicaments. Au regard de ces activités biologiques intéressantes, il convient de mener des investigations intenses pour enrichir la production des Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA).

Mots clés : *Nauclea latifolia*, étude ethnobotanique, screening phytochimique, activités biologiques.

Summary

Nauclea latifolia Smith (*Rubiaceae*) is a plant with curative virtues much more known in Sub-Saharan Africa in the traditional pharmacopoeia for the numerous biological activities.

N. latifolia Sm. is a shrub or tree Soudano-Sahelian species; his zones of abundance are in most cases Western and Central Africa. His wide use in traditional medicine incited us to realize an ethnobotany investigation and a phytochemical screening to put in coherence the prescriptions and the potential activities of the chemical constituents.

The main classes of metabolites secondary sectors, mainly alkaloids, flavonoids, tannins, sterols and terpenoids, were looked for in the leaves, barks of stems and roots.

N. latifolia Sm. all over the presence of its numerous chemical families have interesting pharmacological activities. The extracts of existent complete alkaloids of the 3 organs of the plant, proved an anticancerous activities. These extracts inhibit the proliferation of the mammary cancerous cells MCF-7. Besides, activity antitumorale extracts alkaloids of *N. latifolia* Sm. act against pain. They inhibit the effect of pain after injection acetic acid in 0,6% to the mice.

However, *N. latifolia* Sm. comes as a plant in numerous drugs. With regard to the interesting biological activities, it is necessary to lead intense investigation to enrich the production of Traditional Ameliorated Drugs.

Keywords: *Nauclea latifolia*, ethnobotany study, phytochemical screening, biological activities.

INTRODUCTION GENERALE

La flore africaine en général, et malienne en particulier, regorge d'une importante réserve de plantes à caractères aromatique et médicinal. Ainsi, les plantes médicinales occupent une place importante dans la pharmacopée africaine. De nos jours encore, elles jouent un rôle déterminant dans le traitement de certaines pathologies tropicales comme le paludisme, l'ictère, la blennorragie, la bilharziose [1-4]. De l'impressionnante réserve des plantes à travers le monde, seulement 10% ont fait l'objet d'études de leurs propriétés pharmacologiques [5].

L'usage fréquent de ces plantes par les tradipraticiens et les résultats satisfaisants qui s'en suivent dans certains cas ont conduit certains pays, principalement africains, à mener des réflexions plus poussées pour la revalorisation de la **phytothérapie**.

Ainsi, ce regain d'intérêt a conduit le Mali à réhabiliter la médecine traditionnelle, par la création du Département de la Médecine Traditionnelle (D.M.T) en 1968. Le département relève de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (I.N.R.S.P) qui lutte par tous les moyens appropriés pour soulager les besoins de la population en médicaments génériques. Le DMT est la structure technique du Ministère de la Santé chargée de la valorisation des ressources de la médecine traditionnelle. Le département s'est assigné deux rôles majeurs :

- Dans un premier temps, créer une synergie de complémentarité entre la médecine traditionnelle et la médecine conventionnelle.
- Dans un second temps, élaborer des médicaments efficaces accessibles à faible coût au grand public.

A ce jour, le D.M.T a élaboré sept médicaments commercialisés dans les officines du pays et labellisés sous le nom de Médicaments Traditionnels Améliorés (M.T.A), c'est le cas notamment du sirop "Balembo" utilisé dans le traitement contre la toux.

Dans cette optique, l'étude de la **phytochimie** fait l'objet d'intenses investigations pour aider à déterminer les constituants chimiques présents dans les plantes médicinales. Pour mener à bien ces investigations, divers organes des plantes (feuilles, écorces, racines, fruits) sont cueillis dans leur habitat naturel afin de déterminer leur taux de toxicité et analyser leurs éventuels effets pharmacologiques. Un des outils indispensables est la connaissance du **screening phytochimique** ou **criblage phytochimique** qui permet de déceler la présence des groupes de familles chimiques dans une "drogue" donnée. Le screening phytochimique joue un rôle essentiel dans la caractérisation des groupes de familles chimiques dans une plante

donnée, par contre, il ne permet pas d'identifier ou de déterminer la structure chimique des composés présents.

Au préalable, un travail de terrain est effectué dont le but consiste à mener une **enquête ethnobotanique** auprès des tradithérapeutes (ou tradipraticiens), des herboristes et des individus vivant en contact avec les plantes médicinales. Il s'agit de mettre en cohérence les informations relatives sur l'usage de ces plantes en médecine traditionnelle et de créer une synergie d'activité avec les composés chimiques actifs utilisés en médecine conventionnelle. La connaissance de l'enquête ethnobotanique nous permettra d'édifier les rôles potentiels des plantes médicinales dans la pharmacopée traditionnelle et l'impact induit dans la prophylaxie. Cette enquête met en exergue une pratique ancestrale très efficace pour soigner les maladies. Le traitement traditionnel par les plantes est beaucoup plus prisé dans les zones surtout rurales soit dépourvues de toute structure sanitaire soit par manque de moyen financier, et demeure de nos jours le meilleur sinon le seul moyen pour la prise en charge de plusieurs maladies auprès de la population locale.

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable pour les tradipraticiens africains afin de traiter (ou guérir) certaines pathologies souvent mortelles. De nos jours, beaucoup de guérisseurs traditionnels continuent à puiser leur secret en valorisant les dérivés de ces plantes médicinales dans le traitement de plusieurs maladies graves [6-7].

***Nauclea latifolia* Smith**

De ces nombreuses plantes médicinales, notre étude s'est portée sur le ***Nauclea latifolia* Sm.** qui est une espèce végétale que l'on rencontre en Afrique tropicale, dans les régions humides, en zone soudanienne [2-3] et très largement utilisée par les tradipraticiens contre de multiples maladies entre autres : la malaria, la constipation, les fièvres, les infections uro-génitales et bucco-dentaires [8].

Le *N. latifolia* Sm. très connu dans son aire de répartition naturelle, est généralement un arbuste ou arbre lianescent pouvant atteindre 4 à plus de 6 m de haut suivant son habitat.

Le *N. latifolia* Sm. appartient à la famille des **Rubiacées**, lesquelles peuvent contenir de nombreuses substances chimiques capables de manifester diverses activités pharmacologiques remarquables [9]. Parmi ces substances nous nous sommes intéressés aux **alcaloïdes** [10] qui sont des composés organiques azotés et naturels, le plus souvent d'origine végétale [11-14].

Le genre *Nauclea* (*Rubiaceae*) est une source très riche en alcaloïdes. A l'heure actuelle, les chercheurs ont isolé à partir des différents organes du genre *Nauclea* plus de 40 alcaloïdes monoterpéniques de type indolique [15-17].

Les alcaloïdes qui constituent le nom générique de près d'un millier de substances naturelles ou synthétiques appartenant à la chimie des substances organiques, ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques remarquables (surtout à l'état pur) même à faible dose [18]. Les alcaloïdes sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale [19-20]. La recherche de ce type de composés chimiques constitue un des axes prioritaires de cette étude.

L'utilisation de ces alcaloïdes comme "médicament" a conduit à des tests concluants dans le traitement aussi bien en médecine traditionnelle qu'en médecine moderne de certaines pathologies aiguës comme le cancer, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hépatite [21-23].

Ces substances azotées sont extraites des différents organes de la plante, la plupart des cas elles ne sont pas pures et se rencontrent sous forme complexe soit en mélange de plusieurs types ou avec d'autres composés qui nécessitent une séparation chromatographique (pour la purification) puis, une identification faisant appel aux techniques modernes d'analyse (RMN, masse, ...).

L'efficacité de *N. latifolia* Sm. dans la lutte antipaludéenne et contre certaines douleurs [24-26] a donné l'idée aux chimistes d'isoler les molécules cibles à des fins thérapeutiques.

L'abondance de *N. latifolia* Sm. à l'état naturel sur le territoire malien a également permis de faciliter les études phytothérapeutiques et phytochimiques. Les résultats du screening phytochimique ont décelé outre la présence des alcaloïdes, le *N. latifolia* Sm. renferme d'autres substances chimiques très connues à l'image des composés polyphénoliques tels que les tanins et flavonoïdes, des saponosides [27-31] qui sont réputés posséder des activités antitumorales. Pour se rendre à l'évidence, un criblage phytochimique complet est réalisé au niveau de chaque organe de la plante. Le but visé de cette étude est de disposer d'un panel élargi de groupe de familles chimiques et présager un spectre thérapeutique intéressant lié à la drogue. Les indications thérapeutiques de *N. latifolia* Sm. sont nombreuses, plusieurs auteurs tels que Bouquet en 1969 [32-33], Pousset en 1983 [34], Malgras en 1992 [35] ont énuméré les multiples usages de ce végétal en pratique médicale populaire ou en pharmacopée africaine. Il est important de souligner que l'absence certaine des hétérosides cyanogénétiques révélée au cours du screening diminue les risques toxicologiques liés à l'usage de cette plante, ce qui confirme les résultats des travaux antérieurs [36-37].

N. latifolia Sm. de par les nombreuses familles chimiques qu'il contient révèle des activités pharmacologiques intéressantes. Ainsi, nous pouvons conclure que le *N. latifolia* sm. se présente comme une plante médicinale fournissant plusieurs médicaments populaires aux activités pharmacologiques multiples. Certaines de ses propriétés : antimalarique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antidiabétique et

hypertenseur ont été mises en évidence expérimentalement ou font l'objet des tests biologiques et justifient une place de choix de cette plante dans la médecine traditionnelle.

Si plusieurs constituants chimiques de *N. latifolia* sm. ont été mis en évidence, isolés, et caractérisés, comme certains alcaloïdes, nombre d'entre eux n'ont pas été identifiés à ce jour. De plus, si certaines molécules sont "endémiques" de cette plante, celle-ci peut présenter un "profil chimique" différent en fonction du lieu d'implantation et de la nature du terrain ou du climat.

Par ailleurs, si des enquêtes ethnobotaniques de *N. latifolia* Sm. ont déjà été réalisées, bien peu d'entre elles ont été suivies d'une étude phytochimique cherchant à éclairer les prescriptions des tradipraticiens.

Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels de la plante constitue un enjeu passionnant qui pourrait enrichir l'arsenal de la phytothérapie.

C'est la raison pour laquelle nous avons axé nos travaux sur l'étude de cette plante, tant d'un point de vue ethnobotanique que chimique et sur les activités biologiques des extraits qui en sont issus.

En cela, notre étude s'inscrit pleinement dans la stratégie développée par les autorités maliennes : rendre accessible au grand public la production des médicaments traditionnels améliorés et valoriser la flore locale.

PREMIERE PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette première partie est consacrée essentiellement aux résultats décrits dans la littérature. Elle concerne les alcaloïdes (état naturel, distribution, localisation...), la botanique de la plante, l'intérêt pharmacologique et l'usage phytothérapeutique lié à la plante.

L'étude bibliographique comporte deux grands chapitres :

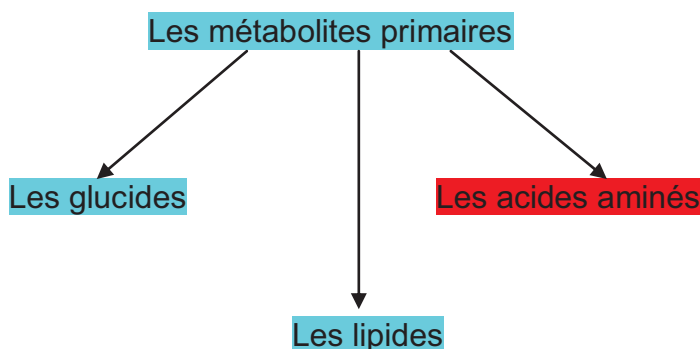
- Le premier chapitre concerne une présentation générale des alcaloïdes.
- Le deuxième chapitre concerne *N. latifolia* Sm. : la présentation botanique, les propriétés thérapeutiques liées à la plante et les différents types d'alcaloïdes isolés à partir des différents organes de cette plante.

CHAPITRE 1 : Les alcaloïdes

Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux (ou d'animaux). On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires [38].

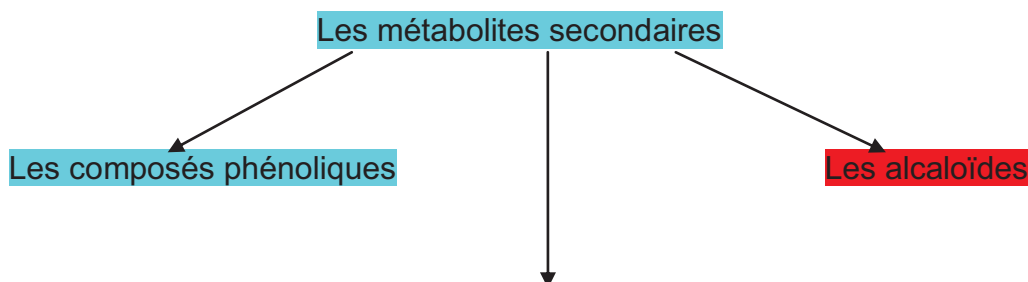
Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme :

- ✚ Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose).
- ✚ Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- ✚ Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines.



Les métabolites secondaires ne sont pas, par définition, nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme. Ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Elles ont de nombreuses applications pharmaceutiques. De façon générale, les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ces métabolites secondaires sont repartis en trois grandes familles chimiques.

- ✚ Les composés aromatiques (phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).
- ✚ Les terpénoïdes et stéroïdes.
- ✚ Les composés azotés ou alcaloïdes.



Les alcaloïdes font partie des métabolites secondaires des plantes [11-14]. Pour cette étude, nous nous intéresserons uniquement aux alcaloïdes. Les alcaloïdes sont une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologiques [39].

1. Définition des alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. MEISNER au début du XIX^e siècle pour désigner les substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect).

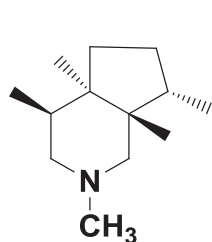
Toute fois, il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels.

On peut définir de manière simple « un alcaloïde est une substance organique azotée (appartenant au vivant) d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure complexe » [10-14]. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique ; les alcaloïdes possèdent une activité pharmacologique significative [20, 40]. Plusieurs auteurs pensaient que ces alcaloïdes avaient pour origine le seul règne végétal. Mais, au fil du temps un certain nombre d'alcaloïdes a été isolé chez certains animaux [41-42].

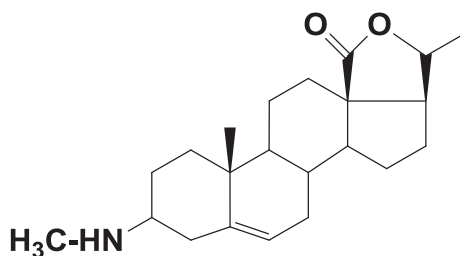
Ainsi, on divise les alcaloïdes en trois genres : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

Les **alcaloïdes vrais** qui représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques importantes. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ces substances sont douées d'une grande activité biologique, même à faible dose. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme *N*-oxyde.

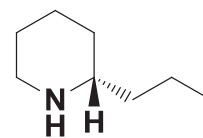
Les **pseudo-alcaloïdes** présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Les alcaloïdes stéroïdaux et les purines sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes. Il s'agit, dans la majorité des cas connus, d'isoprénoïdes et l'on parle d'alcaloïdes terpéniques : les alcaloïdes monoterpéniques tels que la β -skytanthine, sesquiterpéniques des *Nymphaeaceae*, les alcaloïdes diterpéniques comme l'aconitine, du tubercule d'aconit ou stéroïdiques (paravallarine), ... On connaît également des substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate : c'est le cas de la coniine, principe actif de la ciguë.



β -skytanthine

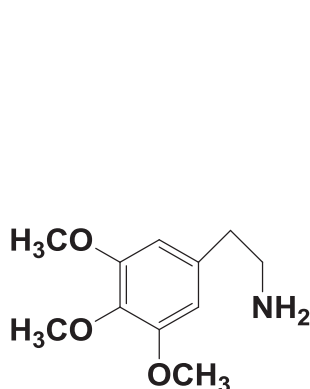


paravallarine

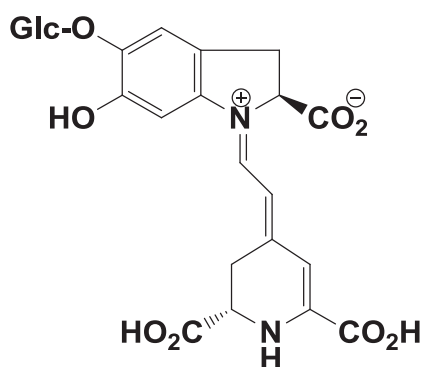


(+)-coiine

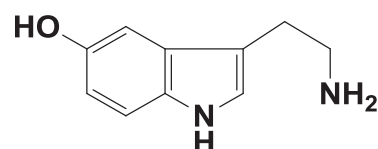
Les **proto-alcaloïdes** sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau. Diverses substances répondent à cette définition : des amines simples comme la sérotonine, la mescaline du peyotl ou la cathinone du thé des Abyssins, mais aussi les bêtaïnes (qui résultent de la quaternarisation de l'azote des acides aminés). Certains auteurs incluent les bêtalainines (parfois appelées chromo-alcaloïdes) dans ce groupe c'est l'exemple de la bétanine [11-14].



mescaline

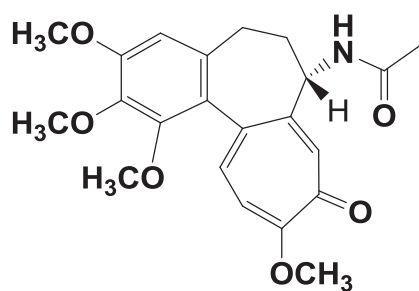


Bétanine

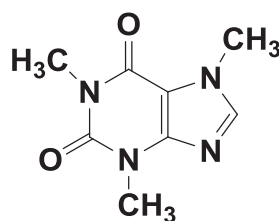


Serotonine

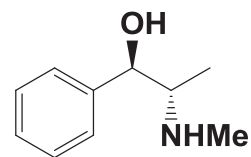
Il arrive dès fois d'être confronté à des difficultés pour classer certains alcaloïdes. Bien que la distinction entre alcaloïdes vrais, proto et pseudo-alcaloïdes, dans la théorie, semble pertinente, dans la pratique elle n'est pas toujours facile à appliquer. Par exemple, où classer la colchicine dont l'azote amidique n'est pas inclus dans un hétérocycle ? Comment considérer la caféine et la théophylline ? Ne doit-on voir dans des glucosides aminés comme les chaconines que des saponosides azotés ?



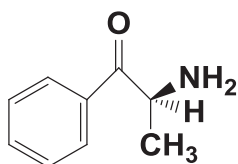
colchicine



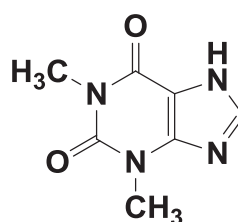
caféine



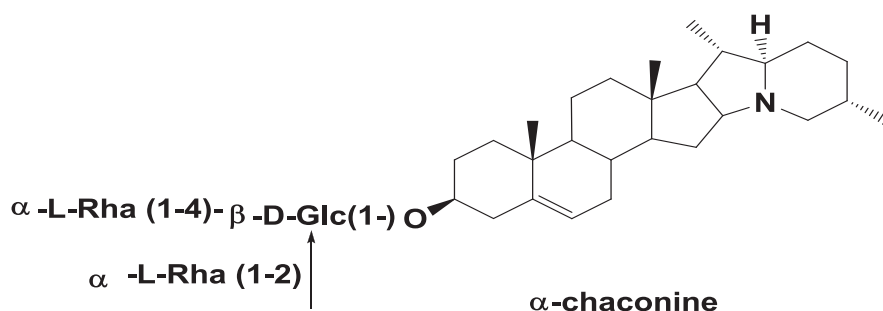
éphédrine



(-)-cathinone



théophylline



La théophylline est un alcaloïde du type méthylxanthine provenant principalement de feuilles de thé et du café. La cathinone est une substance chimique provenant des feuilles séchées d'un arbuste africain *Catha edulis*. La cathinone est un alcaloïde monoaminé.

En pratique, il est admis par tous que, ne sont pas nommés alcaloïdes : les amines simples, les bétalaïnes, les peptides, les acides aminés, les amino-sucres, les porphyrines, les alkylamines, au moins celles qui sont largement distribuées (a contrario des produits de distribution restreinte comme l'éphédrine sont le plus souvent reconnus comme alcaloïdes). Pour tous les autres composés on parle couramment d'alcaloïdes : il ne viendrait à l'esprit de personne de dénier cette qualité à la colchicine, à la coniine ou à l'aconite.

“On peut donc définir qu'un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées” [43]. Le

regroupement d'un tel ensemble est par ailleurs confirmé par des réactions communes de précipitation avec les « réactifs généraux des alcaloïdes ».

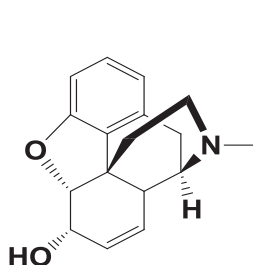
PELLETIER a défini le terme alcaloïde de manière suivante [44]:

✚ Un alcaloïde est un composé cyclique qui contient de l'azote dans un état d'oxydation négatif qui est de distribution limitée parmi les organismes vivants.

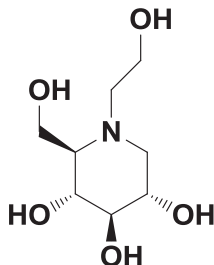
En tenant compte de cette définition, on arrive à classer certains composés parmi les alcaloïdes ; ainsi nous pouvons citer le cas des amines et de leurs oxydes, des amides et des ammoniums quaternaires, de la caféine, de l'éphédrine, de la colchicine et de la ricinine.

Il est important de préciser que cette définition ne tient pas compte du critère d'activité des composés, toute fois il faut noter que n'importe quel composé administré à dose suffisante (parfois à très faible dose) induit un effet quelconque sur l'organisme vivant.

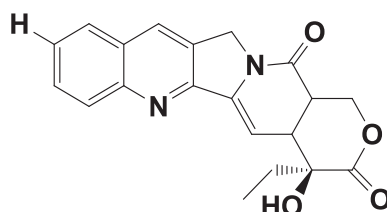
Les alcaloïdes les plus utilisés comme médicaments dans la pharmacopée usuelle sont les dérivés de **morphine** connus pour leurs propriétés analgésiques, le **miglitol** (*N*-Hydroxyéthyldeoxynojyrimicine) connu comme un antidiabétique, la **camptothécine** utilisée comme anticancéreux de même que le taxol, la **cinchonine** et les dérivés de la **quinine** comme antimalarique.



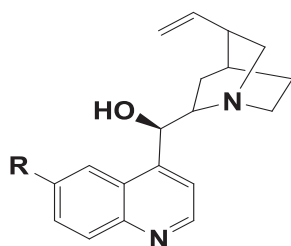
Morphine (Analgésique)



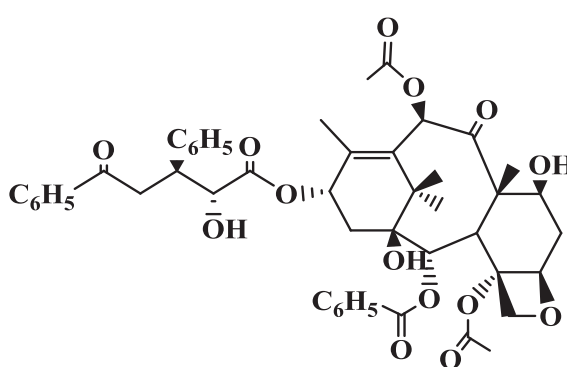
Miglitol (Antidiabétique)



Camptothécine (anticancéreux)



R = H Cinchonidine
R = OCH₃ Quinine
(Antimalarique)



Taxol (anticancéreux)

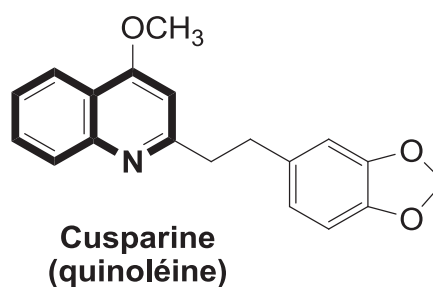
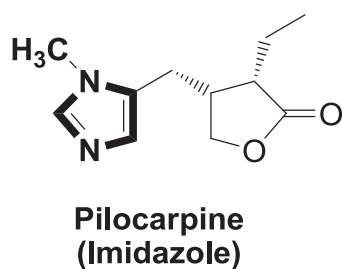
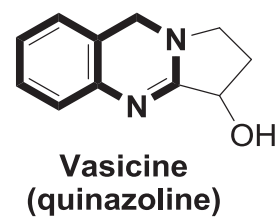
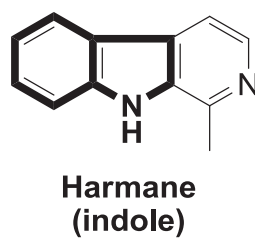
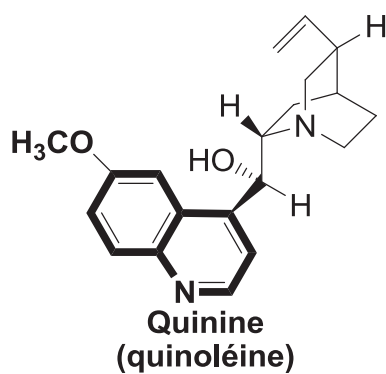
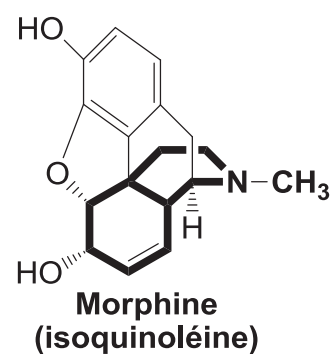
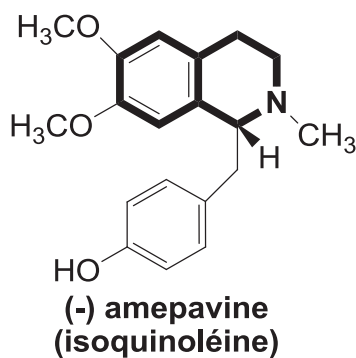
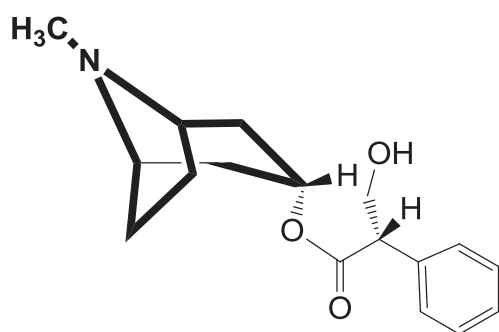
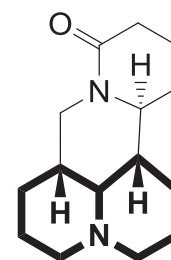
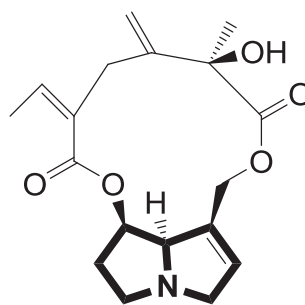
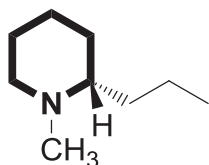
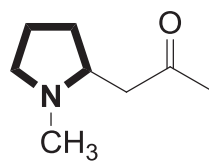
2. Historique des alcaloïdes

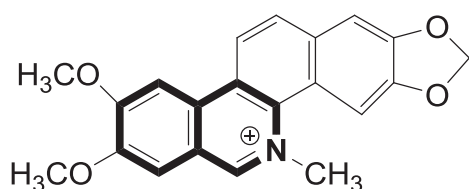
Si la notion d'alcaloïde est assez récente, la connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne : depuis des siècles, voire plusieurs millénaires beaucoup de composés sont employés soit pour la guérison des maladies, soit comme poison, soit comme excitant. On peut citer, par exemple, l'opium, le coca, la belladone, le quinquina, les curares, etc. [45]

C'est vraisemblablement DEROSNE qui, en 1803, extrayant un mélange de narcotine et de morphine de l'opium, fut le premier à isoler un alcali végétal. En 1806, SERTURNER reconnaît le principe somnifère de l'opium, principe qu'il dénommera morphine une dizaine d'année plus tard. Peu après, deux pharmaciens français, PELLETIER et CAVENTOU, découvrent une impressionnante série de composés actifs entre 1817 et 1820 ; nous pouvons citer entre autres la caféine, l'émétine de l'ipéca, la strychnine de la noix vomique, la quinine et la cinchonine seront isolées de l'écorce de quinquina. Un peu plus tard il en sera de même pour la coniine principe actif de la cigüe. Les chimistes tentent très tôt d'élucider la structure de ces molécules : ils y parviendront dans les cas les plus simples (coniine, SCHIFF, 1870), mais pour d'autres il faudra attendre la seconde moitié de notre siècle : l'édifice polycyclique de la strychnine a résisté près de 130 ans aux investigations des chimistes. Aujourd'hui les techniques avancées de RMN, de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse et la diffraction des rayons X permettent de venir à bout des structures les plus complexes [43-48]. La synthèse de ces composés a également constitué très tôt un défi pour les chimistes : de la synthèse de la coniine à la fin du siècle dernier à celle de la morphine (1952), ce défi a joué et joue encore un rôle de premier plan dans le développement de la synthèse organique.

L'isolement, au début des années cinquante, de la réserpine et le succès thérapeutique de celle-ci ont incité les photochimistes à explorer systématiquement ce vaste domaine des alcaloïdes : le nombre des structures décrites ne cesse de progresser et les données structurales, biosynthétiques, synthétiques ou pharmacologiques sont maintenant tout à fait considérables [46-48]. Dans quelques cas, des molécules originales ont été introduites en clinique, c'est celui des alcaloïdes binaires des *Catharanthus*, dans beaucoup d'autres des analogues structuraux ont été synthétisés et commercialisés (dérivés des alcaloïdes de l'ergot de seigle) et des potentialités pharmacologiques intéressantes ont été mises au jour, suscitant des développements dans les directions les plus variées (synthèse, relations structure / activité, étude de récepteurs, etc.).

Exemples de structures alcaloïdiques illustrant les principaux systèmes hétérocycliques rencontrés





Nitidine
(isoquinoléine)

3. Sources d'alcaloïdes

De nos jours, on évalue à plus de 10.000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes [40, 49].

3.1. Les végétaux

Les alcaloïdes sont des composés présents pour l'essentiel dans les plantes supérieures comme les Angiospermes. Plusieurs sources estiment que 10 à 15 % d'entre elles synthétisent des alcaloïdes. Certaines familles ont une tendance marquée à élaborer des alcaloïdes : c'est vrai aussi bien chez les Monocotylédones (*Amaryllidaceae*, *Liliaceae*) que chez les dicotylédones (*Annonaceae*, *Apocynaceae*, *Fumariaceae*, *Lauraceae*, *Loganiaceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, etc.). Généralement, on rencontre les alcaloïdes dans les quatre familles botaniques les plus étudiées : *Papaveraceae*, *Papilionaceae*, *Ranunculaceae* et *Solanaceae* [11-14].

Les plantes les plus connues, dont sont issus les alcaloïdes les plus utilisés, sont la belladone (atropine), le pavot (morphine) et la pervenche de Madagascar. Cependant, des investigations récentes ont démontrés que plusieurs familles de plante en contiennent également. C'est notamment le cas des *Rubiaceae* à laquelle appartient *Nauclea latifolia* Sm. [10, 18].

Certains alcaloïdes existent dans plusieurs genres appartenant à des familles différentes, parfois très éloignées taxonomiquement (caféine), le plus souvent assez proches (réticuline, yohimbine). D'autres sont caractéristiques d'un nombre limité de genres à l'intérieur d'une famille (hyoscyamine) ou d'un groupe d'espèces à l'intérieur d'un genre (thébaïne) ; certains sont étroitement spécifiques (morphine).

La teneur des plantes en alcaloïdes varie dans de larges limites : de l'ordre de quelques ppm comme dans le cas des alcaloïdes antitumoraux de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* : la teneur atteint à peine 3 g de vinblastine pour une tonne de feuilles) à plus de 15 % pour les écorces de tronc du quinquina (*Cinchona ledgeriana*). Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, le plus souvent, elles donnent un mélange complexe dominé, souvent, par un composé majoritaire. Une plante peut éventuellement renfermer

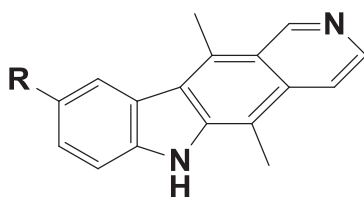
plusieurs dizaines d'alcaloïdes (la pervenche de Madagascar peut en contenir une centaine).

En règle générale, tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine biogénétique commune, même si les structures paraissent assez différentes. Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant en être dépourvus. Il n'est pas rare de noter des variations qualitatives fréquentes, les différents organes d'une même plante renferment des alcaloïdes dissemblables. La quinine est l'exemple typique de ce cas, elle s'accumule dans les graines et les écorces du kurchi (*Holarrhena pubescens*) alors qu'elle est absente des feuilles. On notera que l'existence de chimiotypes (ou chémotype) n'est pas exceptionnelle (*Rauwolfia*, *Duboisia*).



Image 1 : *Ochrosia elliptica*, exemple de plante renfermant les alcaloïdes de type ellipticine (antitumoraux).

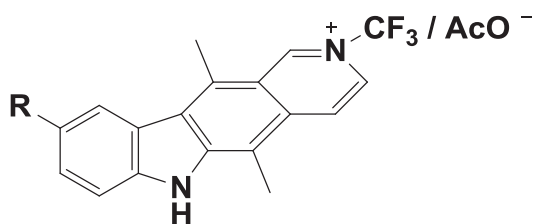
Réf : <http://www.Univ-orleans.fr/Sciences/IUP-CHIMIE/Images/M1COA4> 2007.pdf



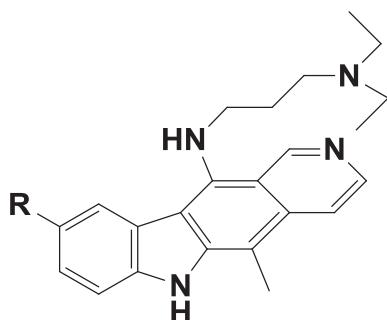
R = H, Ellipticine

R = OMe, 9-methoxy-ellipticine

Evolution pharmaceutique des alcaloïdes de type ellipticine : Hémisynthèse



Celiptium



Aza-ellipticine BD 40

3.2. Autres sources d'alcaloïdes

On rencontre exceptionnellement les alcaloïdes chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*). Ils sont assez rares chez les champignons (psilocine des champignons hallucinogènes de l'Amérique centrale, ergolines des *Claviceps* et autres Actinomycètes, sporidesmines, roquefortine, etc.).

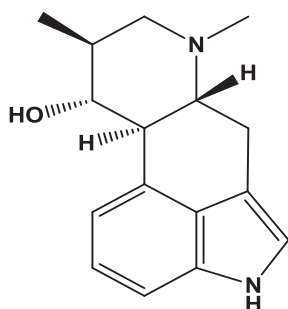
Pendant longtemps, les alcaloïdes ont été considérés comme des produits du métabolisme des seuls végétaux. En réalité, certains animaux renferment des structures alcaloïdiques. Dans certains cas, ce sont des produits formés à partir des alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaire de l'animal : l'exemple de la castorine issue de la métabolisation des alcaloïdes des nénuphars que consomme le castor, c'est celui des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents chez certains papillons. Les arthropodes sécrètent les alcaloïdes à faible quantité dans leurs glandes exocrines. Nous pouvons citer les Coléoptères, Neuroptères, etc. Ces alcaloïdes sont de masse moléculaire peu élevée (pyrrolidines, pipéridines, pyrroles, indolizidines, pyrazines), ils sont assez volatils pour constituer des signaux chimiques, éléments de défense (allomones) et de communication (phéromones).

On rencontre les alcaloïdes chez certains batraciens (*Dendrobates*) et salamandres, ils sont très rares chez les mammifères. Quelques insectes comme les fourmis (fourmis de feu ou *solenopes invicta*), les coccinelles, les mille-pattes et certains organismes marins (unicellulaires ou les éponges) en contiennent également.

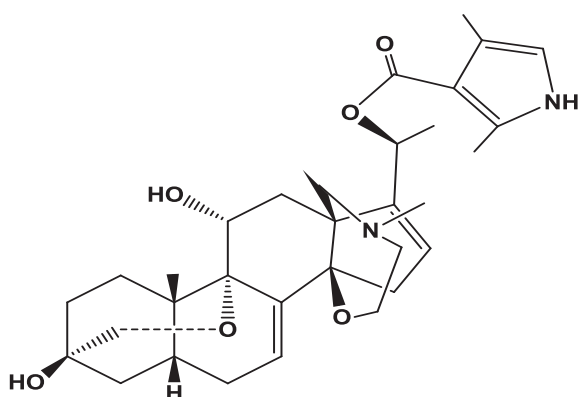
Dans la classification des alcaloïdes, la batrachotoxine produite par les batraciens joue le rôle de stéroïde. Depuis quelques décennies, la connaissance sur

les différentes études concernant les organismes marins a conduit à l'isolement de nombreuses structures hétérocycliques azotées, en particulier chez les éponges. Certaines de ces structures possèdent de réelles potentialités thérapeutiques, notamment anticancéreuses.

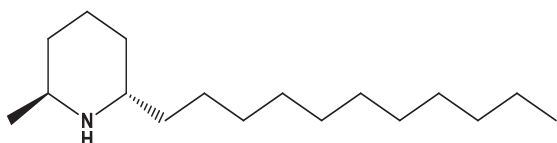
Quelques exemples d'alcaloïdes isolés à partir d'autres sources :



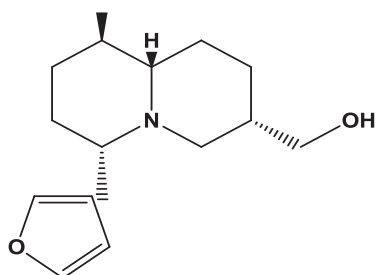
Chanoclavine : alcaloïde indolique isolé chez le champignon de type "*Claviceps purpurea*".



Batrachotoxine : type d'alcaloïde extrait à partir des peaux de certains batraciens (Dendrobates).



Solénopsine : type d'alcaloïde isolé chez la fourmi (*Solenopes invicta*).

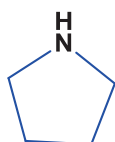


(-) Castoramine : type d'alcaloïde isolé chez le Castor.

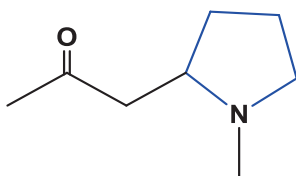
4. Classification par structures des alcaloïdes

Vouloir proposer une classification pour les alcaloïdes demeure une tâche ardue, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. Une des classifications possibles concerne le nombre de cycles contenant l'atome d'azote.

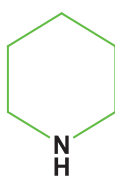
- 1 seul cycle contenant l'atome d'azote



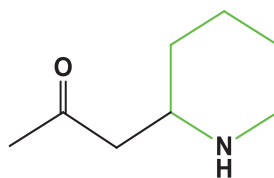
Cycle pyrrolidinique



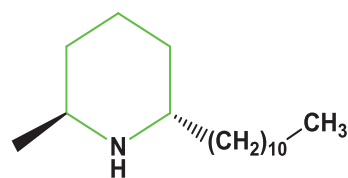
Hygrine



Cycle pipéridinique

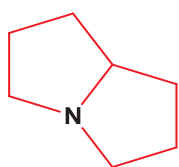


Isopelletierine

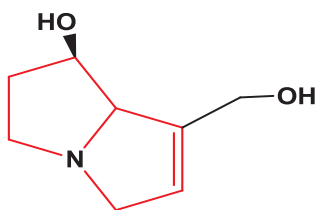


Solénopsine A

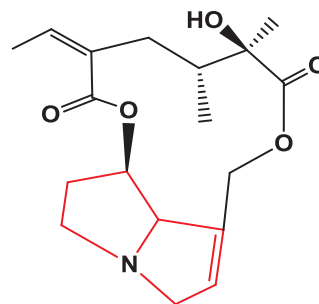
- 2 cycles contenant l'atome d'azote



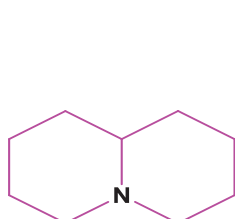
Cycle pyrrolizidinique



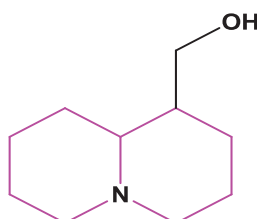
Rétronécine



Sénécionine



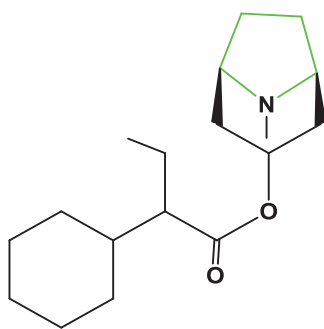
Cycle quinolizidinique



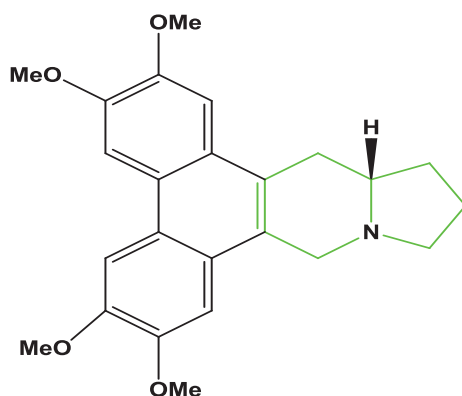
Lupinine



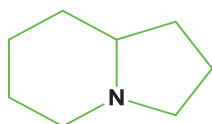
Sparteine



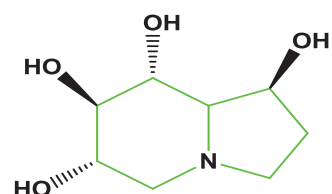
Hyoscyanine



Tylophorine

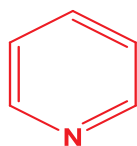


Cycle indolizidinique

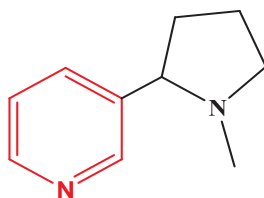


Castanospermine

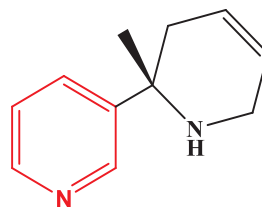
- **Hétérocycles aromatiques**



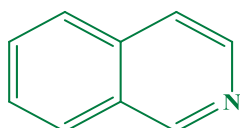
Cycle pyridinique



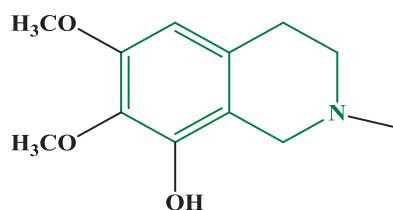
Nicotine



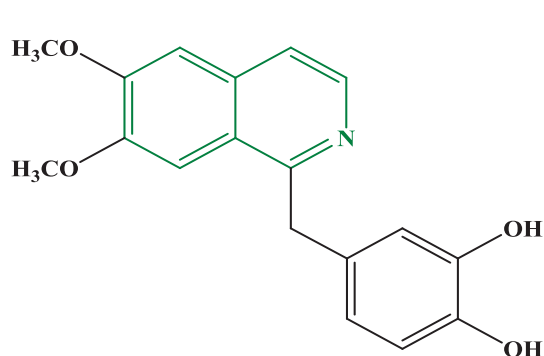
Anatabine



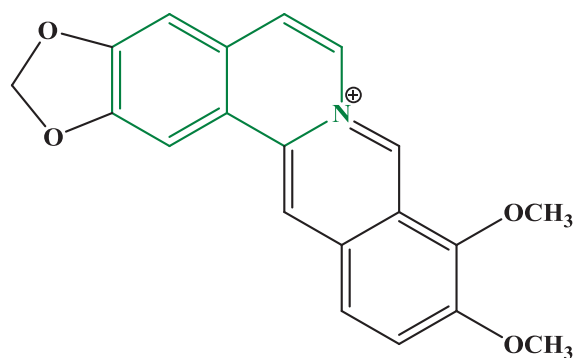
Cycle isoquinoléinique



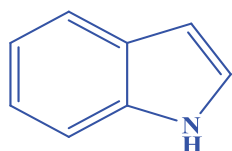
Pellotine



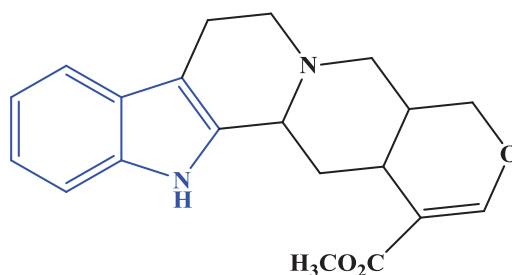
Papavérine



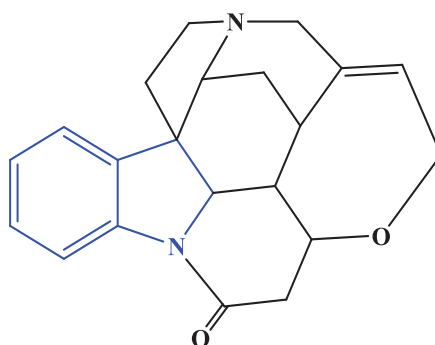
Berbérine



Cycle indolique



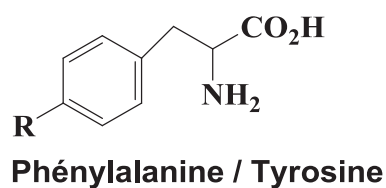
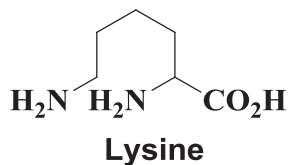
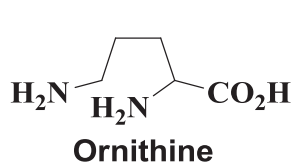
Ajmaline

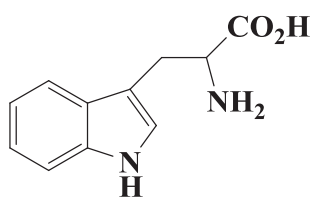


Strychnine

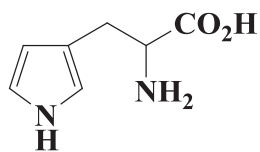
5. Origine biosynthétique des alcaloïdes

Nous avons noté précédemment que l'origine des alcaloïdes vrais remonte aux acides aminés entre autres : l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, la tryptophane, l'histidine et l'acide anthranilique.

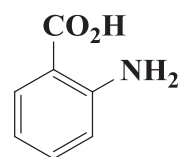




Tryptophane

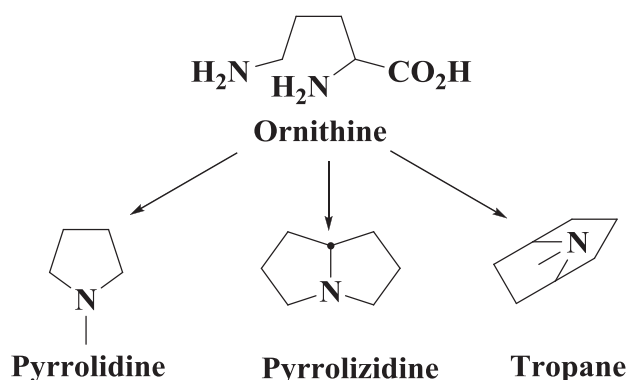


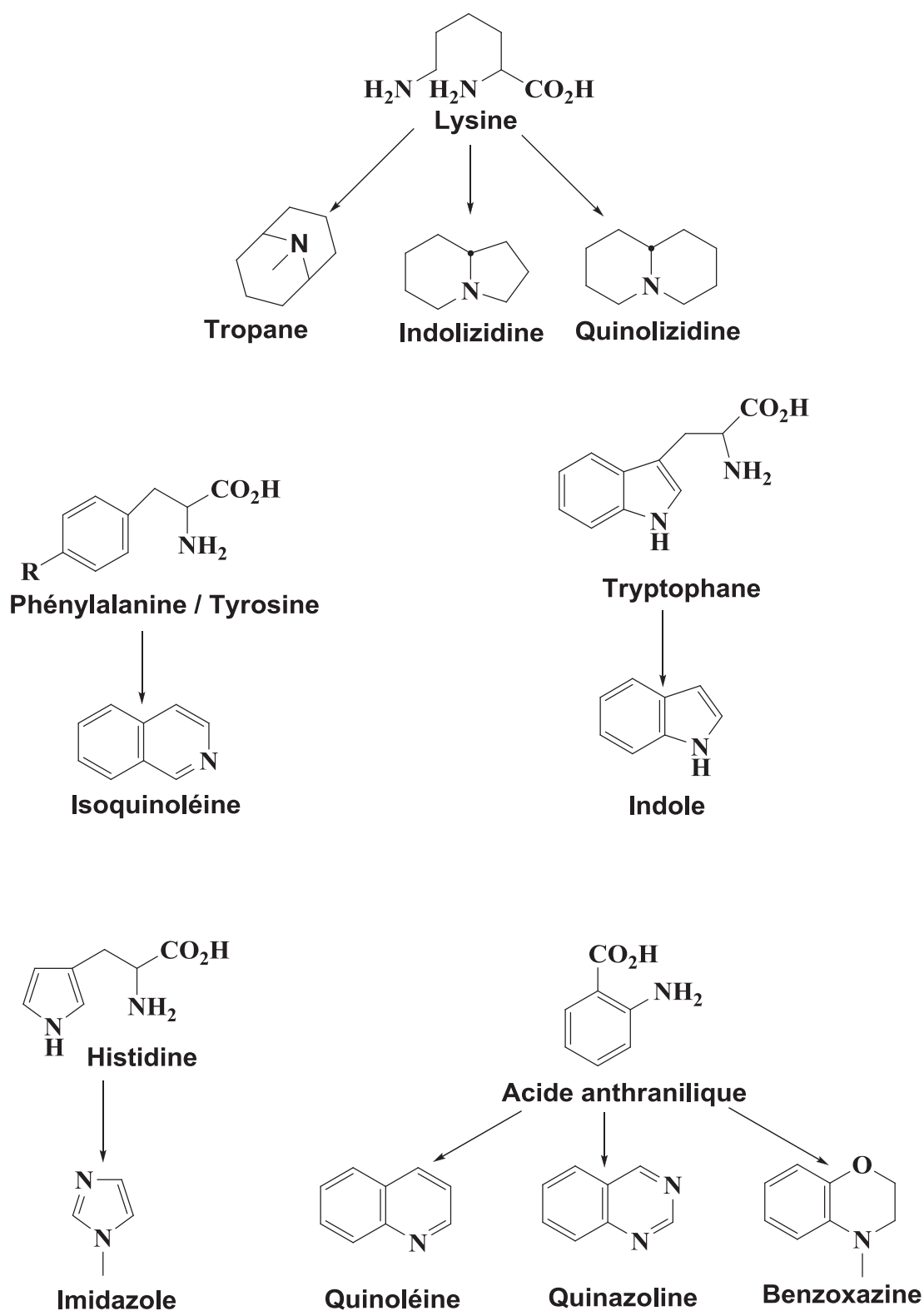
Histidine



Acide anthranilique

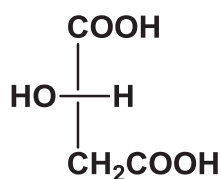
La formation du système hétérocyclique passe généralement par un processus inter ou intramoléculaire simple : la formation d'une base de Schiff ou, fréquemment la réaction de Mannich [56]. La formation de l'alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé, c'est le cas de l'hygrine ou de la cathine, de deux molécules du même acide aminé comme pour les quinolizidines et les benzyloquinolines, plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) ou de plusieurs molécules du même acide aminé comme dans le cas de la spartéine. Quand la molécule comporte des carbones supplémentaires, ils sont apportés par des éléments largement impliqués dans d'autres métabolismes : acétate (tropanes), diméthylallylpyrophosphate (ergolines, furoquinolines) ou plus spécifiques à un groupe particulier de végétaux comme le sécologanoside (alcaloïde indolo-monoterpéniques). Les oxydations allyliques, les couplages oxydatifs, l'oxydation des noyaux aromatiques, les estérifications, les étherifications, etc. justifient l'existence des nombreuses variations structurales. Pour les alcaloïdes terpéniques, ils sont un peu particuliers et leurs précurseurs ont une origine strictement terpénique et l'amination de la molécule est tardive.



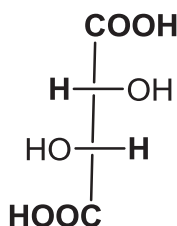


6. Localisation des alcaloïdes

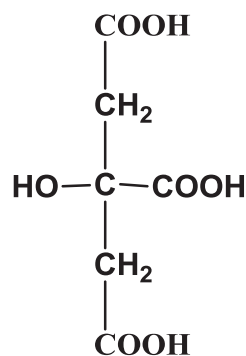
Les alcaloïdes sont rarement libres dans la plante, ils existent sous forme de glycosides ou de sels d'acide citrique, malique, tartrique, etc. ou sont combinés avec les tanins [11-14].



Acide L-(-)-malique



Acide D-(+)-tartrique



Acide citrique

Les investigations finement réalisées par la microchimie permet de montrer que les alcaloïdes sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces de tige et de racine, tégument des graines ; on en découvre également dans certains cas dans la partie supérieure des plantes (feuilles, fruits). La basicité et les actions antimétabolites de la plupart de ces molécules imposent leur compartimentation : elles sont normalement stockées dans les vacuoles cellulaires, que ces dernières soient spécifiques (dans les laticifères) ou non. Le plus souvent la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de sites précis (racine en croissance, cellules spécialisées de laticifères, chloroplastes), ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage.

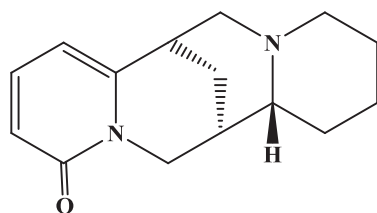
7. Fonction des alcaloïdes

Le rôle des alcaloïdes dans les végétaux est encore largement inconnu. Certaines théories prédisent que certains alcaloïdes interviennent dans les relations plantes / prédateurs en protégeant les premières contre l'agression des seconds : si l'on admet que la diversité structurale est le reflet d'une adaptation constante, cette hypothèse s'en trouve confortée.

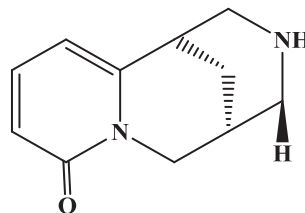
Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes [51-55]. Par exemple, la nicotine empêche la croissance des larves du tabac. En outre, certains alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante.

Les alcaloïdes sont totalement impliqués dans une chimie de communications inter et intra-espèce, intégrés dans une écologie chimique. Dans les relations inter-espèce, le goût amer est une approche non négligeable souvent suivie de la toxicité. Si le goût repousse, la toxicité affaiblit puis tue les herbivores. L'exemple du lupin est édifiant. Le genre lupin peut contenir environ 200 espèces de plantes fourragères et ornementales. Il faut reconnaître le rôle des lupins "doux" et des lupins "amers", les premiers servent à l'alimentation animale tandis que les seconds riches en alcaloïdes sont très toxiques. En résumé, le lupin se protège des herbivores par la production

d'alcaloïdes comme l'anagyrine et la cytisine. La toxicité de l'anagyrine se manifeste par une activité tératogène (malformation congénitale des veaux).



Anagyrine



Cytisine

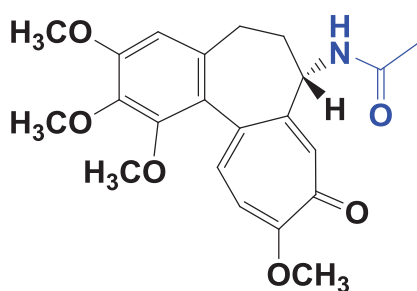
Par ailleurs, certains auteurs estiment que les alcaloïdes sont des métabolites terminaux, des « déchets » inutilisables, cette hypothèse est très peu probable. Alors que dans plusieurs cas il a été montré que ces alcaloïdes se comportent comme des métabolites intermédiaires. A l'heure où nous sommes, on n'arrive toujours pas à savoir la fonction exacte des alcaloïdes dans les végétaux. Une plante peut contenir plus de 100 alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Un certain nombre de questions restent sans réponse : les alcaloïdes sont-ils des substances de réserve ? Sont-ils des régulateurs de croissance ?

Ces questions ne seront probablement résolues qu'après de nombreuses études de ces plantes.

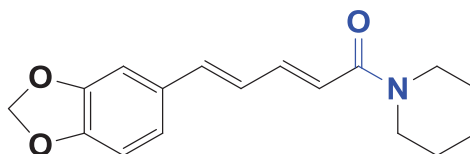
8. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées ayant des masses moléculaires très variables de 100 à 900 g/mol [14]. Les alcaloïdes non oxygénés sont pour la plupart liquides à température ambiante (nicotine, spartéine, coniine). Ceux contenant l'oxygène dans leur formule sont le plus souvent des solides cristallisables, rarement colorés. En règle générale, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires et solubles dans les alcools de titre élevé.

La basicité des alcaloïdes est très variable et dépend de la disponibilité du doublet libre de l'atome d'azote. Cette basicité est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote : les groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité tandis que les groupements électro-donneurs la renforcent. La colchicine et la pipérine sont, du fait de l'existence du carbonyle de l'amide, pratiquement neutres.

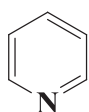


Colchicine

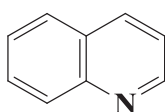


Pipérine

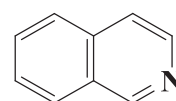
Le système hétérocyclique peut lui-même être de basicité variable : chez la pyridine à six électrons π , mais aussi chez la quinoléine et l'isoquinoléine, le doublet de l'azote est disponible et le caractère basique est affirmé.



Pyridine

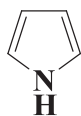


Quinoléine

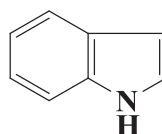


Isoquinoléine

Dans le cas du pyrrole ou de l'indole, le doublet de l'azote participe à l'aromaticité, ils ne sont pas basiques.

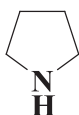


Pyrrole



Indole

La pyrrolidine insaturée est quant-à elle une base relativement forte.



Pyrrolidine

La basicité est également influencée par des contraintes stériques (au moins dans les molécules polycycliques complexes). La basicité peut être également un facteur d'instabilité pour ces molécules qui, à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène.

La basicité des alcaloïdes permet de former des sels avec des acides minéraux (chlorures, sulfates, nitrates) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont, sauf rares exceptions, insolubles dans les solvants organiques. Les sels cristallisés se conservant plutôt bien, ils constituent la forme commerciale habituelle pour ces molécules.

9. Détection et caractérisation des alcaloïdes

Les tests de caractérisation sont basés sur une extraction simple et rapide. Le plus généralement, on précipite les alcaloïdes par des réactifs généraux des alcaloïdes. L'extraction préliminaire, peut être une extraction classique qui consiste à une macération rapide dans un alcool : la solution alcoolique est évaporée et le résidu repris par de l'eau acidifiée ; après filtration les alcaloïdes sont recherchés dans le filtrat.

Un autre test consiste à réaliser une macération dans de l'eau acidifiée ; après filtration les alcaloïdes sont éventuellement révélés dans le filtrat par les réactifs généraux des alcaloïdes. Si la présence des alcaloïdes est douteuse, il faut alcaliniser la solution dans un milieu basique dilué (à moitié par exemple) puis l'extraire par un solvant chloré. Ainsi, le résidu obtenu est repris par l'eau acidifiée et la présence des alcaloïdes est révélée par les réactifs généraux des alcaloïdes (voir annexe 1 protocole DMT).

Ces réactions générales de précipitation sont fondées sur la capacité qu'ont les alcaloïdes de se combiner avec des métaux et des métalloïdes : bismuth, mercure, tungstène, iode, ... Dans la pratique, on emploie la solution iodo-iodurée, le tétraiodomercurate de potassium connu sous le nom de réactif de Mayer (qui donne des précipités blanc-jaunes) et le tétraiodobismuthate de potassium, plus connu sous le nom de réactif de Dragendorff (coloration rouge-orangée). Il est également possible d'utiliser le réactif silico-tungstique (mélange d'oxydes de tungstène et de silicium) ou des solutions d'iodo-platinates alcalins. La spécificité de ces réactifs n'est pas absolue : des protéines, des α -pyrones, certaines coumarines et des hydroxy-flavones, des lignanes et autres composés peuvent donner des réactions faussement positives avec le réactif de Dragendorff.

D'autres réactifs peuvent être utilisés pour mettre en évidence les alcaloïdes, notamment ceux qui donnent des réactions colorées caractéristiques de groupes d'alcaloïdes [14] :

- le para diméthylaminobenzaldéhyde pour les alcaloïdes de l'ergot de seigle ;
- le sulfate de cérium et d'ammonium qui différencie les indoles (jaunes), les dihydroindoles (rouges), les β -anilinoacrylates (bleus), les oxindoles ;
- la ninhydrine pour les arylalkylamines ;
- la réaction de Vitali-Morin pour les esters de l'acide tropique ;
- les réactifs au chlorure ferrique en milieu chlorhydrique (tropolones) ou perchlorique (*Rauwolfia*).

Les réactions citées ci-dessus permettent de caractériser la présence des alcaloïdes, mais sont insuffisantes pour vérifier l'identité d'une drogue ; elles ne donnent pas non plus de renseignements sur la composition d'un mélange.

Les méthodes les plus couramment mises en œuvre dans ce cas et comme pour la quasi-totalité des autres métabolites secondaires des végétaux, sont la CCM et la HPLC, en phase normale ou en phase inversée (avec des solvants de type eau-méthanol ou eau-acétonitrile). Le réactif de Dragendorff, la solution iodo-iodurée (ou les vapeurs d'iode), l'iodoplatinate de potassium ou le sulfate de cérium et d'ammonium sont couramment utilisés pour la révélation des plaques de CCM. La non-volatilité de la quasi-totalité des alcaloïdes limite l'utilisation de la CPG à quelques cas particuliers. Pour des exemples, on se reportera à la pharmacopée (drogues officinales) et aux diverses bibliographies spécialisées.

10. Extraction des alcaloïdes

Les alcaloïdes existent, dans les plantes, sous forme saline. L'extraction des alcaloïdes repose, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part, dans les solvants organiques d'autre part.

Les végétaux renferment des quantités appréciables de graisses, mais aussi de cires, de terpènes, de pigments et autres substances lipophiles dans ses différents organes (feuilles, écorces, racines, graines) qui peuvent perturber le processus d'extraction en induisant la formation d'émulsions. C'est pourquoi une délipidation préalable du matériel végétal finement broyé est nécessaire. Les solvants convenables les plus utilisés pour cette étape de délipidation sont, entre autres, l'hexane, l'éther de pétrole, le cyclohexane. D'autres solvants peuvent convenir à cette opération, la liste est loin d'être exhaustive.

L'extraction peut se faire par simple contact ou, par contacts multiples dans des installations fonctionnant sur le principe de l'appareil de Soxhlet. Ce genre d'appareil est utilisé industriellement, mais pour plus d'efficacité, on peut utiliser des extracteurs solide-liquide fonctionnant sur le principe du contre-courant.

11. Techniques de dosages des alcaloïdes

Il faut distinguer le dosage des alcaloïdes totaux et celui d'un alcaloïde particulier dans une drogue donnée.

- Le dosage des AT commence obligatoirement par leur extraction à l'aide d'une méthode générale : on préfère généralement l'extraction en milieu alcalin, en s'assurant à chaque étape que l'épuisement a été total.

Le résidu d'AT peut ensuite être apprécié par une méthode gravimétrique ou par un dosage volumétrique. Les méthodes gravimétriques sont facilement mises en œuvre, mais la simple pesée de résidu d'AT manque de précision : l'erreur par excès n'est pas négligeable et la méthode est avantageusement remplacée par d'autres procédés. Dans le dosage volumétrique on utilise soit l'acidimétrie directe, soit le plus souvent l'acidimétrie en retour : dissolution du résidu dans un excès d'acide titré et

dosage en retour de l'excès d'acide par une base de titre connu en présence d'un indicateur coloré (Solanaceae mydriatiques, boldo...). Dans le cas contraire on peut recourir à la protométrie en milieu non aqueux comme les bases faibles.

- Quant au dosage d'un constituant ou d'un groupe de constituants dans une drogue déterminée, on utilise des techniques spectrophotométriques, colorimétriques, fluorimétriques, densitométriques.

Les techniques spectrophotométriques sont très sensibles et assez fréquemment préconisées : dosage des alcaloïdes de genre quinine et cinchonine par mesure de l'absorbance à deux longueurs d'onde dans les écorces de quinquina, dosage de la caféine dans les feuilles de thé [14]. Si le dosage ne peut se faire directement, il est possible de séparer le composé à doser par chromatographie et de procéder à la mesure de l'absorbance après élution des taches : dosage de l'ajmalicine dans les racines de *Catharanthus*). Les techniques colorimétriques peuvent également être appliquées au dosage d'un alcaloïde ou d'un groupe d'alcaloïdes : dosage des bases faibles dans le *Rauwolfia*.

La technique la plus avantageuse demeure la HPLC qui supprime ces méthodes « classiques ». De nos jours, le dosage gravimétrique très complexe de la morphine dans l'opium est abandonné au profit de la méthode HPLC.

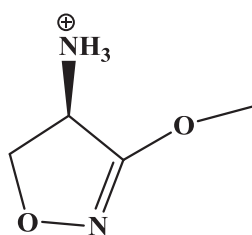
12. Utilité et usages pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont recherchés pour leurs effets physiologiques constituant ainsi des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

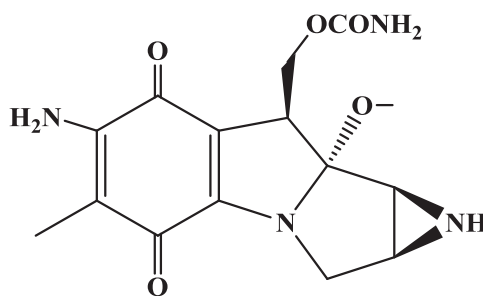
- les alcaloïdes qui agissent au niveau du système nerveux central sont soit dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine) ;
- les alcaloïdes qui interviennent au niveau du système nerveux autonome sont sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques (yohimbine), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anticholinergiques (atropine, hyoscyamine), ganglioplégiques (spartéine, nicotine).

Il est important de préciser l'existence des alcaloïdes utilisés dans d'autres domaines comme des curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'antitumoraux (vinblastine, ellipticine), d'antimalariques (quinine) et d'amoebicides (émétine).

Les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotique comme la cyclosérine, la mytomycine.



Cyclosérine

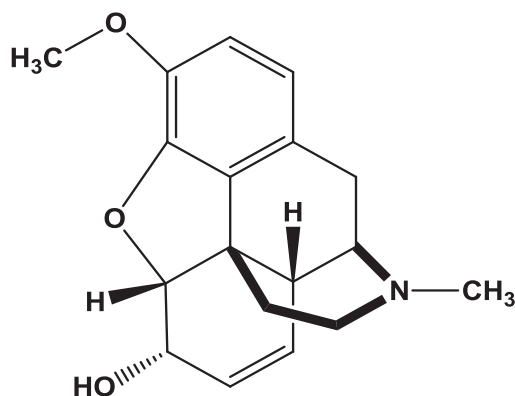


Mytomycine

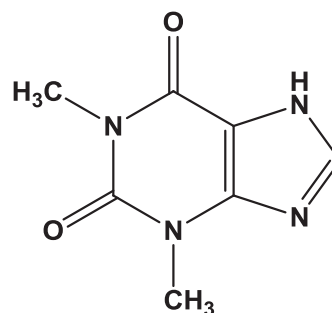
Ces différentes propriétés confèrent aux plantes alcaloïdiques une place de choix dans la pharmacopée tant traditionnelle que moderne compte tenu d'un panel d'activités thérapeutiques. Bien que certaines drogues à alcaloïdes soient synthétisées industriellement (préparations galéniques) comme la belladone, la stramoine ou la jusquiame noire, il n'en résulte que beaucoup ne sont que des matières premières pour l'extraction industrielle des alcaloïdes qu'elles renferment telles que la morphine de la paille de pavot ou de l'opium, la vincamine des feuilles de pervenche de Madagascar, la quinine des écorces de quinquina, ...

De ces alcaloïdes extraits une (faible) partie peut être transformée : la codéine est obtenue par méthylation de la morphine, la quinine est convertible en quinidine.

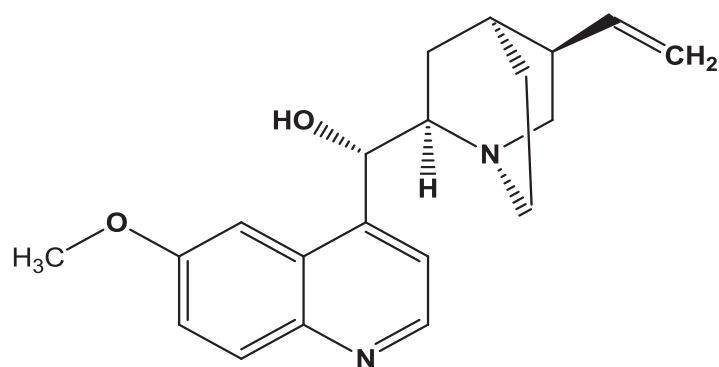
Rarement l'industrie produit directement des alcaloïdes par synthèse tels que la théophylline et la papavérine.



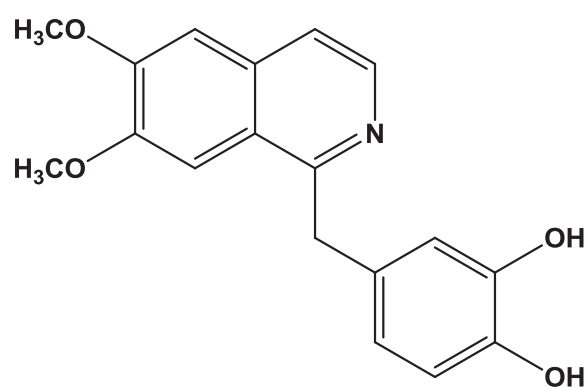
Codéine



Théophylline



Quinidine



Papavérine

CHAPITRE 2 : ETUDE MONOGRAPHIQUE DE *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH

Ce chapitre met en relief les études scientifiques liées à la nature de la plante.

1. Présentation botanique

- ❖ Nom scientifique : *Nauclea latifolia* Sm.
- ❖ Synonymes : *Sarcocephalus esculentus* Afzel.ex Sabine, *Sarcocephalus russeggeri* Kotchy ex Schweinf, *Sarcocephalus Sambucinus* K. Schum., *Nauclea esculenta* (Afzel. ex Sabine) Merrill.
- ❖ Nom commun : pêcher africain.
- ❖ Nom bambara : badi (bari ou baro).
- ❖ Nom peulh : dundaké, donnoso.
- ❖ Nom dogon : pembé, ayug, onobadji.
- ❖ Nom soninké et malinké : bati.

1.1. Systématique

- ❖ Règne : Végétal
- ❖ Sous-règne : Eucaryotes
- ❖ Embranchement : Spermaphytes
- ❖ Sous-embranchement : Angiospermes
- ❖ Classe : Dicotylédones
- ❖ Sous classe : Rosidae
- ❖ Ordre : *Rubiales*
- ❖ Famille : *Rubiacees*
- ❖ Genre : *Nauclea*
- ❖ Espèce : *N. latifolia* Sm.

Les *rubiacees* sont en général, réputées pour leur richesse en alcaloïdes [15]. Les parties de la plante utilisées sont, en générale, les racines, les feuilles, les écorces de tronc et les fruits. En effet ces parties végétales sont caractérisées par leurs activités antibactérienne (*Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*...) [28, 67-71], antimalarique (*Plasmodium falciparum*) [25, 37, 72-74], antiparasitaire (Leishmaniose) [75-76] ; ainsi que leurs effets neuropharmacologique et biochimique [77-78].

1.2. Caractéristique de la plante [3]

Le *N. latifolia* Sm. est un arbre ou arbuste plus ou moins sarmenteux, de 4 à 9 m de haut, à fût tortueux et pouvant atteindre 30 cm de diamètre, à cime étalée et ouverte avec des branches flexibles lianescentes, entremêlées, dressées puis retombantes.

Les écorces crevassées (fissures), gris-brun foncé, à tranche fibreuse rougeâtre, elles sont facilement détachables du tronc. Les stipules (chacune des deux petites expansions foliacées latérales de la feuille, situées vers son point d'attache ou adhérentes à son pétiole) disposées par 2 entre les feuilles, minces et crustacées, en collerette triangulaire avec le sommet pointu ou arrondi, de 0,3 à 0,7 cm de long.

Les feuilles sont opposées, grandes et elliptiques ou suborbiculaires pouvant atteindre sur les rejets plus de 20 cm de longueur sur 15 cm de large. Elles sont glabres c'est à dire dépourvues de poils (sauf sur le dessous des jeunes feuilles, où la nervure principale est typiquement tomenteuse), vert brillant et gras, au toucher dessus, au sommet courtement acuminé, à base variable, en coin large, arrondie ou subcordée. Les pétioles varient de 1 à 2 cm de long. La nervure est pennée, à 6 à 8 (voire 9) paires de nervures secondaires saillantes, se raccordant et portant dessous (surtout visible sur les jeunes feuilles) des touffes de poils aux aisselles. Au sommet des branches, sont disposées des boules sphériques, denses et composées de très nombreuses fleurs odorantes, de 3 à 5 (ou 4 à 5) cm de diamètre.

Les fleurs sont petites, blanches ou plus ou moins rosées, à corolle en tube à 4 lobes plus ou moins ciliés, avec le style en forme de massue de 5 à 8 mm. Le fruit est une baie charnue, irrégulièrement globuleuse, de 3 à 5 (voire 8) cm de diamètre, de couleur rouge à marron foncée à maturité, à surface criblée d'alvéoles peu profondes, contenant de très nombreuses graines noyées dans une chair rosée ayant une odeur de fraise.



Images 2 & 3 : Fleurs et fruits de *N. latifolia* Sm.



Images 4 & 5 : Fruits murs de *N. latifolia* Sm.



Images 6 & 7 : Troncs et feuilles de *N. latifolia* Sm.

1.3. Habitat naturel de la plante

Le *N. latifolia* Sm. est une plante à vertu médicinale surtout connue en Afrique sub-saharienne dans la pharmacopée traditionnelle pour ses nombreuses activités pharmacologiques. C'est un arbuste ou un arbre lianescent haut de 4 à 9 m selon son habitat très largement répandu en Afrique tropicale. Il est très commun dans des savanes arborées, des galeries forestières et des sous-bois de forêts sèches d'Afrique Occidentale (Mali, Guinée, Sénégal, Bénin, Nigeria...) voire Centrale (Congo...). On retrouve la plante, le long des pourtours de mares (étangs) et des bas-fonds des savanes soudano-guinéennes et guinéennes, sur les sols humides plus ou moins drainées. Il est très répandu sur la ceinture ouest, est et centre du continent africain, qui va du Sénégal au Cameroun, jusqu'au Soudan. La répartition est disséminée, commune et localement abondante. La floraison se fait plutôt en première partie de la saison des pluies.



Image 8 : Habitat naturel de *N. latifolia* sm.

2. Propriétés thérapeutiques de la plante décrites dans la littérature

Les indications thérapeutiques de la plante recensées dans la littérature sont nombreuses compte tenu de son pouvoir de guérison excellent. Le *N. latifolia* Sm. est très prisé par les tradipraticiens comme remède à des nombreuses maladies souvent mortelles, il est utilisé dans le traitement symptomatique de diverses affections comme le paludisme, la fièvre, le diabète, l'hypertension artérielle, les douleurs abdominales [32-33, 79-82].

Plusieurs auteurs ont mis en évidence, les multiples usages de ce végétal en pratique médicinale populaire ou pharmacopée africaine [83]. Nous détaillons ci-après les différentes applications thérapeutiques de cette plante en fonction des organes utilisés.

2.1. Les différents organes de *N. latifolia* Sm.

2.1.1. Feuilles

Les feuilles sont tenues pour fébrifuges, elles sont surtout utilisées pour leurs vertus laxatives, purgatives, antiparasitaires et leur décoction en instillations, jugule la filariose [84]. Des recherches intenses menées sur les extraits hydro-alcooliques obtenues à partir des feuilles de *N. latifolia* sm. ont mis en évidence des propriétés antibactériennes sur des couches enteropathogènes (*Escherichia Coli*) [28, 85]. L'utilisation combinée des différents organes de *N. latifolia* Sm. sert beaucoup dans la pharmacopée africaine. Les feuilles et racines mélangées jouent un rôle hémostatique contre la stérilité masculine, la plaie, l'enflure, l'hémorroïde, la lèpre, le chancre syphilitique, la blennorragie [3].

2.1.2. Ecorces de tronc

La combinaison des écorces de tronc de *N. latifolia* Sm., des feuilles de *C. glutinosum* et les racines de *T. bakis* sont utilisées par les tradithérapeutes burkinabè pour le soin des états d'affection du foie [86].

Les écorces de tronc qui sont très riches en gluco-alcaloïdes, sont considérées comme des fébrifuges puissants (antipyrétique c'est à dire utilisé dans le traitement symptomatique de la fièvre). Des activités antimalarique, antiblennorragique et laxative sont également rapportées [3]. Elles sont aussi recommandées contre l'ictère, l'otite, les maux de reins. Les extraits aqueux issus des écorces de tronc de *N. latifolia* Sm. ont produit des activités anthelminthiques (antiparasitaires) excellentes contre les vers nématodes présents chez les ovins [87]. Elles sont également utilisées en chasse comme poison de flèche [2].

Les études phytochimiques ont révélé que les écorces de tronc contiennent des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes et saponines qui sont des composés bioactifs utilisés comme cure-dents pour renforcer la résistance des dents [88-91]. Les alcaloïdes et les tanins issus de *N. latifolia* Sm. sont réputés pour leur propriété anti-inflammatoire et ils constituent un bon remède contre la Leucorrhée ou pertes blanches chez les femmes [92]. La macération des écorces de tronc associée aux extraits de feuilles donne un mélange de boisson tonique utilisée contre la fièvre. Ce macéré est très efficace dans le traitement du paludisme, de la dysenterie et de la diarrhée [93].

2.1.3. Racines

Les racines, en décoction ou infusion, soulagent la constipation, les troubles du foie, les ennuis gastro-intestinaux [94-95]. Elles permettent de guérir diverses plaies ainsi que les abcès [96]. Les racines de *N. latifolia* Sm. combinées aux racines

de *Anthocleista djalensis* et *Uvaria afzalii* sont utilisées comme antibactérien pour traiter traditionnellement certaines maladies sexuellement transmissibles au Nigeria [67]. Plusieurs auteurs ont prouvé ces activités antibactériennes liées aux racines de la plante [97-99]. Elles sont utilisées comme vermifuges et contre la carie dentaire [100]. Elles jouent un rôle anti-inflammatoire contre la taie de l'œil [101]. Les extraits aqueux des écorces de racine de *N. latifolia* Sm. ont produit des activités neuropharmacologiques intéressantes chez les rats et souris [77].

La décoction des écorces de racines est utilisée le plus souvent comme rince-bouche au Nigeria pour soulager les gencives enflées [92]. Les activités antipyrétique et anti-inflammatoire d'extraits hydro alcooliques des racines et feuilles de *N. latifolia* Sm. ont été testées et prouvées chez le rat.

Pour vérifier quelques unes de ces propriétés, les extraits des racines et des feuilles sont évalués sur l'hyperthermie induite par la levure de bière à 20% et l'œdème provoqué par la carrageenan à 2%. L'administration orale des extraits hydro alcooliques des racines et feuilles de *N. latifolia* Sm. à différents doses, réduit significativement l'hyperthermie et l'œdème. Ces résultats étayent, du moins partiellement, certaines indications thérapeutiques traditionnelles de la plante [102]. Les décoctions des écorces de racines de *N. latifolia* Sm. testées contre les convulsions et l'anxiété, ont donné des résultats encourageants chez les souris au Cameroun [1].

2.1.4. Sève des tiges

La sève produite à partir des tiges, soulage divers troubles oculaires (conjonctivites, plaies, taie, infections parasitaires), aussi bien pour la médecine humaine que vétérinaire [3].

2.1.5. Fruits

La tisane préparée avec les fruits de *N. latifolia* Sm. est réputée dépurative, en cas de furonculose [2], en même temps qu'efficace contre la blennorrhagie, la constipation, l'ictère, l'insuffisance rénale ou la malaria [3]. Les fruits sont comestibles, la pulpe est mangée fraîche ou sèche. Les fruits séchés sont souvent utilisés pour traiter la dysenterie amibienne [103]. Attention à ne pas manger en excès les fruits qui peuvent agir comme émétique [93]. On note également l'utilisation des fruits dans les rites mortuaires (chamanisme).

2.2. Autres utilités de la plante

2.2.1. Bois

Les bois sont durs et lourds, très souvent, ils servent de bois de chauffe et de charbon pour la cuisson des aliments dans les zones rurales. Les tiges compte tenu de leur flexibilité sont utiles dans la confection des toitures des greniers et des cases d'habitation africaines.

2.2.2. Utilité dans l'artisanat africain

La combinaison du bois, de l'écorce et de feuille donne un colorant jaune foncé pour teindre les cuirs dans l'artisanat africain. Cette pratique est très utilisée dans la tannerie artisanale africaine.

2.3. Remarques

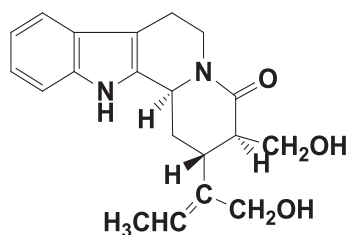
L'ensemble de ces observations liées aux différentes propriétés thérapeutiques de la plante, expliquent en partie sa prescription comme antimalarique [25]. Les différents organes de *N. latifolia* Sm. peuvent être combinés à d'autres plantes pour traiter efficacement certaines maladies. C'est ainsi, qu'il est souvent prescrit en association avec d'autres plantes pour traiter les formes résistantes du paludisme [36, 104]. Nous détaillerons ces applications dans les prochains chapitres.

3. Types d'alcaloïdes isolés à partir des différents organes de *N. latifolia* Sm.

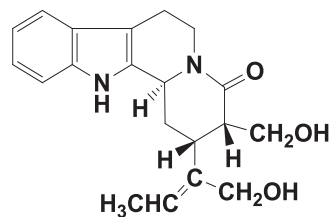
Les différents alcaloïdes identifiés à ce jour chez *N. latifolia* Sm. sont de types monoterpéniques à structure indolique ou indoloquinolizidine. Ces alcaloïdes possèdent surtout une activité antimalarique et la structure indolique leur confère le rôle majeur d'un très bon antalgique [10]. De ces alcaloïdes extraits des différents organes de *N. latifolia* Sm., nous pouvons en citer entre-autres une vingtaine.

C'est ainsi que les *Naucleamides* A à E ont été isolés à partir des écorces de *N. latifolia* Sm. en 2003 par une équipe japonaise [57].

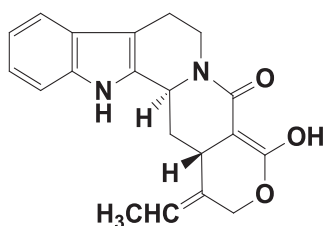
 Naucleamides A, B, C, D, E (Ecorces de tronc et bois)



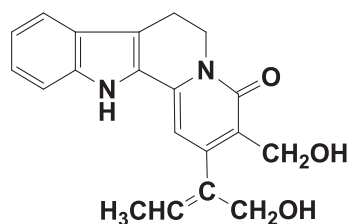
Naucleamide A (C₂₀H₂₄N₂O₃)



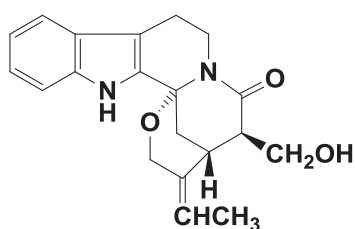
Naucleamide B (C₂₀H₂₄N₂O₃)



Naucleamide C (C₂₀H₂₀N₂O₃)



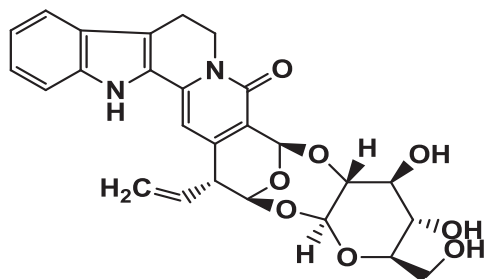
Naucleamide D (C₂₀H₂₂N₂O₃)



Naucleamide E (C₂₀H₂₂N₂O₃)

L'alcaloïde de type *Naucleamide* F, qui a été très récemment identifié par une autre équipe japonaise est également extrait des racines de cette plante [58].

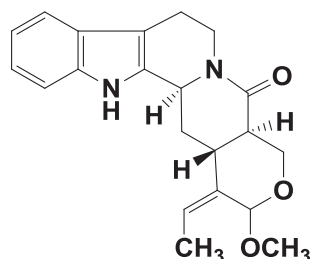
 Naucleamide F (Racines)



(C₂₆H₂₆N₂O₈)

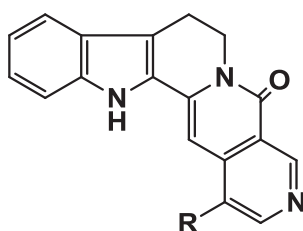
La *nauclefolinine* a été isolée à partir des écorces de racines de *N. latifolia* Sm. en 1976 par Hotellier et al. [59] et en 2003 par Ngnokam et al. [60].

✚ *Nauclefolinine* (Racines)



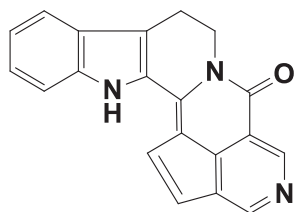
Françoise Hotellier et al. ont découvert successivement au cours de la même année, en 1975 [61], quatre alcaloïdes indoliques dont *l'Angustine*, *l'Angustoline*, *le Naucéléfine* [62] et *le Naucéléfine* issus des racines ; ainsi que trois autres alcaloïdes et gluco-alcaloïdes en 1979 [63], à savoir la *Naulafine*, la *Cadambine* et le *3 α – dihydrocadambine* isolés cette fois, à partir de feuilles de *N. latifolia* Sm.

✚ *Angustine, Angustoline, Naucéléfine et Naucéléfine* (Racines)

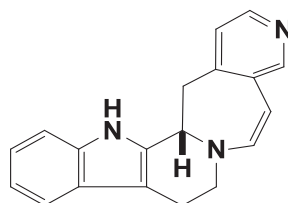


- (1) *Angustine*, R = CH=CH₂
- (2) *Angustoline*, R = CHOHCH₃
- (3) *Naucéléfine*, R = H
- (4) *Naucéléfine*, R = COCH₃

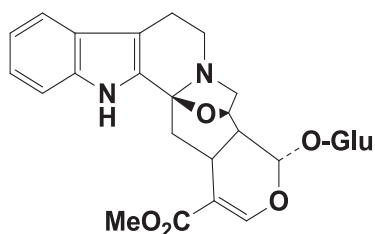
✚ *Naulafine, 3 α-dihydrocadambine, cadambine et Naulafine* (Feuilles)



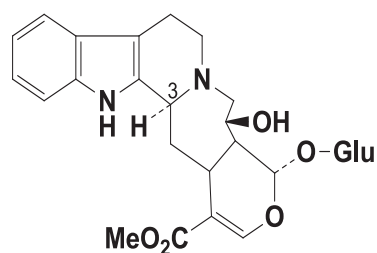
Naulafine



Naulafine (C₁₉H₁₇N₃)



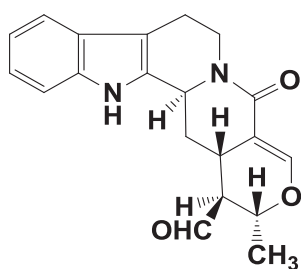
Cadambine



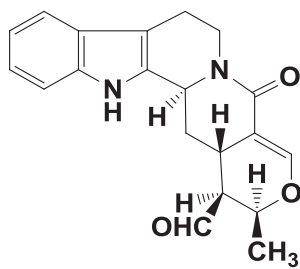
3 α -dihydrocadambine

Le *Naucléidinal* fut l'œuvre de Takayamah et al. en 1997 [15]. En 1980, F. Hotellier, P. Delaveau et JL. Pousset [64] ont également isolé à partir des écorces de racines de *N. latifolia* Sm. le *Naucléidinal* et l'*Epinaucléidinal* (épi-19 *naucléidinal*).

✚ *Naucléidinal et Epinaucléidinal* (Racines)



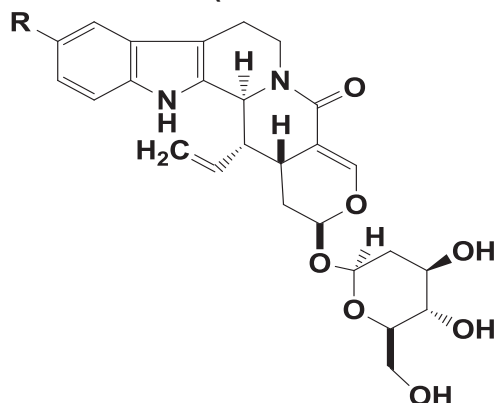
Naucleidinal (C₂₀H₂₀N₂O₃)



Epinaucleidinal (C₂₀H₂₀N₂O₃)

Les alcaloïdes de type *Isovincoside lactam* et le *10-Hydroxystriectosamide* ont été isolés à partir des écorces internes de *N. latifolia* Sm. par Richard T. Brown et al. en 1977 [27]. Les mêmes types d'alcaloïdes ont été isolés à partir des écorces de racine de la plante par Ata et al., en 2009 [65].

✚ **Isovincoside lactam (ou Strictosidine lactam ou Strictosamide) et le 10-HydroxystRICTOSAMIDE (Ecorces et Racines)**

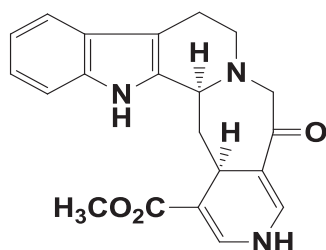


R=H: Strictosamide (C₂₆H₃₀N₂O₈)

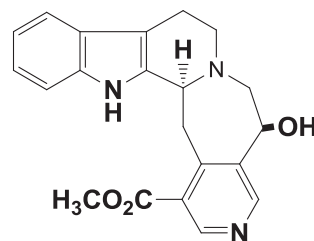
R=OH: 10-HydroxystRICTOSAMIDE (C₂₆H₃₀N₂O₉)

F. Hotellier en 1982 a isolé à partir des parties végétales de *N. latifolia* Sm. à la fois la *Naucleoline* et la *Nauclechine* [66].

✚ **Naucleoline et Nauclechine (Feuilles)**



Naucleoline



Nauclechine

Nous verrons ultérieurement que les extraits bruts d'alcaloïdes totaux issus des différents organes de *N. latifolia* Sm. joueront un rôle essentiel dans la prise en charge de la douleur.

C'est ainsi que d'énormes efforts sont consentis pour déterminer la nature de ces alcaloïdes afin de mesurer leur impact dans la médecine conventionnelle.

4. Conclusion

La large utilisation de *N. latifolia* Sm. en médecine traditionnelle nous a incités à réaliser une enquête ethnobotanique et un screening phytochimique afin de mettre en cohérence les prescriptions et les activités potentielles des constituants chimiques. En dépit de plusieurs utilisations de la plante en médecine traditionnelle, très peu d'études ethnobotanique et phytochimique approfondies ont été menées à ce jour [105-106].

Si plusieurs constituants chimiques de *N. latifolia* sm. ont été mis en évidence, cependant peu nombre d'entre eux n'ont pas été identifiés à ce jour. C'est ainsi que les prochains chapitres de la deuxième partie aborderont les études ethnobotanique et phytochimique que nous avons réalisé concernant *N. latifolia* Sm.

REFERENCES

- [1] Ngo Bum E., Taiwe G. S., Moto F. C. O., Ngoupaye G. T., Nkantchoua G. C. N., Pelanken M. M., Rakotonirina S. V. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* smith in mice. *Epilepsy & Behavior* (2009), 15, 434-440.
- [2] Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. (2000). CIRAD, MNHN, UICN. Edition 2.
- [3] Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. (2002), CIRAD, MNHN. Edition 2. Revue et augmentée.
- [4] Saulnier P. Plantes médicinales et soins en Afrique. Saint-Maur : Edition SEPIA ; 1998.
- [5] Hamburger M, Hostettman K. Bioactivity in plants: the link between Phytochemistry and medicine, Paris: Masson: 1991.
- [6] Dalziel, J.M. A Hausa Botanical Vocabulary. T. Fisher Unwin Ltd., London, 1916, pp 90.
- [7] Hutchinson, J. and Dalziel, J.M. *Flora of West Tropical Africa*, 2nd Edn., revised by Keay, R.W.J. and Hepper, F.N. (1963). Vol. 2. Crown Agents, London, p, 163.
- [8] Lombo, M. Contribution à l'étude pharmacologique de *nauclea latifolia* sm. (*Rubiaceae*) Thèse Doc. Pharmacie, n°68, Université de Dakar (1963).
- [9] Kaboré, I. Z. ; Guissou, I. P. ; Sourabie, S et Gngangao, G. Eléments de monographies sur *Nauclea latifolia* sm. (*Rubiaceae*) : Chimie, activités biologiques, toxicité. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 1998, vol. 10, pp. 42 – 54.
- [10] Hemingway, S.R. and Phillipson, J.D. Alkaloids of the Rubiaceae. In: J.D. Phillipson and M.H. Zenk (Eds.), *Indole and Biogenetically Related Alkaloids*. Academic Press, (1980) London, pp. 62-90.
- [11] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Technique et Documentation. Paris, 1^{ère} Edition (1987).
- [12] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Technique et Documentation. Paris, 2^{ème} Edition (1993).

- [13] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 3^{ème} Edition Lavoisier (1999).
- [14] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition Lavoisier (2009).
- [15] Takayama H., Ohmori O., Sakai M., Funahashi M., Kitajima, M., Santiarworn D., Liawruangrath B., Aimi N., *Heterocycles* (1997), **49**, 49-52.
- [16] Zhizhen Z, Hala N. El., Melissa R. J., David S. P., Larry A. W., and Alice M. C. New indole alkaloids from the bark of *Nauclea Orientalis*. *Journal of Naturel Products*, **2001**, Vol. 64, N°8.
- [17] Sofowora, E.A. *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. John Wiley and Sons, Chichester (1982), pp. 256.
- [18] Adegoke, E.A., Akinsanya, A. and Naqvi, S.H.Z. Studies of Nigerian medicinal plants. I. A preliminary survey of plants alkaloids. *Journal of West African Science Association* (1968). **13**, 13-33.
- [19] Fattorusso, E, et Tagliatela-Scafati, O., éd. *Modern alkaloids - Structure, isolation, synthesis and biology*, Wiley-VCH Weinheim (2008).
- [20] Roberts, M.F. et Vink, M. *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Plenum Press, New York (1998).
- [21] Gidado A, Ameh DA, Atawodi SE. Effect of *N. latifolia* leaves aqueous extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *Am J Biol*. **2005**, **4**:91-3.
- [22] Iwu MM. Handbook of African medicinal plants. London/New York: CRC Press; **2000**.
- [23] Ouattara YJ, Simporé BJ, Sakandé IP, Guissou IZ, Kaboré L, Sawadogo. Activité hépatoprotectrice de plantes de la pharmacopée africaine vis-à-vis d'une hépatopathie expérimentale provoquée chez la souris NMRI *Rev Sci Tech Sci Santé* **2002**, 25.
- [24] Gamaniel, K., Wambebe, C., Amupitan, J., Hussaini, I.M., Amos, S., Awodogan, A., Dunah, A.W., Ekuta, J.E., Akeju, M.O., Usman, H., Enwerem, N Active column fractions of *Nauclea latifolia* on Plasmodium berghei and rabbit ileum. *Journal of Pharmaceutical research and Developpment* **1997**, **2**, 44-47.

- [25] Benoit-Vical F., Valentin A., Cournac V., Pélissier Y., Mallié M., Bastide J-M : In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* sm. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* (1998) **61**, 173-178.
- [26] Abbah J., Amos S., Chindo B., Ngazal I., Vongtau H.O., Adzu B., Farida T., Odutola A.A., Wambebe C., Gamaniel K.S. Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* (2010), **127**, 85-90.
- [27] Brown, R.T., Chazze, C.L. and Lashford, A.G. Isolation of strictosidine (isovincoside) lactal from *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry* (1977), **16**, 1619-1620.
- [28] Deeni, Y.Y. and Hussain H.S.N. Screening for antimicrobial activity and for alkaloids of *Nauclea latifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, (1991), **35**, 91-96. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.
- [29] Abreu, P., Pereira, A. A new indole alkaloids from *Sarcocephalus latifolius*, Heterocycles, **1998**, **48**, 885-891.
- [30] Abreu, P.M., Martius, E.S., Kayser, O.O., Bindseil, K.U., Seeman, A., Frevert, J. Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau, *Phytomedicine*, **1999**, **6**, 187-195.
- [31] Abreu, P., Pereira, A. Two new indole alkaloids from *Sarcocephalus latifolius*, Natural Product letter, **2001**, **15**, 43-48.
- [32] Bouquet A. Plantes médicinales du Congo-Brazzaville. Paris, France, ORSTOM, **1969**, travaux et documents n°**36**, 306 p.
- [33] Bouquet A. Féticheurs et médecine traditionnelle du Congo-Brazzaville ; Mémoires ORSTOM., **1969**, pp : 282.
- [34] Pousset, J.L.; Touré P. ; Lo I. ; Cadoz M. ; Diop Mar I. Plantes médicinales Africaines XII. Mise au point d'un sirop Antitussif et étude clinique préliminaire, *Med. Afr. Noire*, (1983), **30(4)**, 191-192.
- [35] Malgras : D. R. P. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. Edition KARTHALA et ACCT, (1992), 478 p.
- [36] Traoré F., Gasquet M., Laget M., Guiraud H., Di Giorgio C., Azas N., Doumbo O. and Timon-David P. Toxicity and Genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitrogyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia* sm. *Phytother. Res.* (2000) **14**, 608-611.

- [37] Mesia G.K, Tona G.L, Penge O et al. Antimalarial activities and Toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo : *Croton mubango*, *Nauclea pobeguinii* and *Pyracantha staudtii*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, (2005) 4: 345-357. Pub. Med. 1594 9182.
- [38] Richter, G. *Métabolisme des végétaux – Physiologie et biochimie*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, **1993** (Traduction française de *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*, 1988, Georg Thieme Verlag, Stuttgart).
- [39] Cordell, G.A. *Introduction to alkaloids, a biogenetic approach*, John Wiley, New York (1981).
- [40] Waller, G.R. and Nowacki, E.K. *Alkaloids Biology and Metabolism in plants*. Plenum Press, New York, (1978) 294 p.
- [41] Hesse, M. *Alkaloids-Nature's curse or Blessing?*, VHCA, Zürich, **2002**.
- [42] Mann, J. ; Davidson, R. S. ; Hobbs, J. B. ; Banthorpe, D. V. ; Harborne, J. B. *Natural Products*. Longman, **1994**, Ch. 7, 389.
- [43] Mothes, K., Schütte, H.R. et Luckner, M., eds. *Biochemistry of alkaloids*, VCH, Berlin (1985).
- [44] Pelletier, S.W. The nature and definition of an alkaloid, in "*alkaloids, chemical and biological perspectives, opt. cit.* (1983) **1**, pp. 26 sq.
- [45] Dalton, D.R. *The alkaloids-The fundamental chemistry, a biogenetic approach*, Marcel Dekker, New York (1979).
- [46] Lin, M., Liu, X., Yu, D.Q. Alkaloids of *Nauclea officinallis*. *Planta Med.*, **1984**, 50, 459-461.
- [47] Lin, M., Liu, X., Yu, D.Q., Dou, S.Q., Zhang, Y.J., Li, Q.M. The structure determination of new alkaloid-nauclefidine in *Nauclea officinallis*. *Acta Pharm. Sin.*, **1985**, 20, 902-905.
- [48] Lin, M., Li, S.Z., Liu, X., Yu, D.Q. Studies on the structures of two new alkaloidal glycosides of *Nauclea officinallis* Pierre ex Ppitard. *Acta Pharm. Sin.*, **1989**, 24, 32-36.
- [49] Mauro Neves Munis : Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs: la (+) anatoxine-a et la (±)-camptothécine. Thèse Doc. Chimie. Université Joseph Fourier GRENOBLE (10-07-2006).

- [50] De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **2000**, **20**, 323.
- [51] Harborne, J. B., and Herbert B. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis. **1995**.
- [52] Harborne, J.B. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall, London, **1973**, pp. 221–232.
- [53] Wink, M. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield, UK, and Boca Raton, FL: *Sheffield Academic Press and CRC Press*. **1999**.
- [54] Kutchan, T. M. *Plant Cell*. **1995**, **7**, 1059.
- [55] Bhat, S. V. Nagasampagi, B. A. ; Sivakumar, M. *Chemistry of Natural Products*. Narosa, New Delhi, India. **2005**, Ch. 4, 237.
- [56] Facchini, P.J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (**2001**), **52**, 29-66.
- [57] Shigemori H., Kagata T., Ishiyama H., Morah F., Ohsaki A., Kobayashi J. Naucleamides A-E, new monoterpene indole alkaloids from *nauclea latifolia* *Chem. Pharm. Bull.* (**2003**) **51(1)** 58-61.
- [58] Kakuguchi, yuka ; Ishiyama, Haruaki ; Kubota, Takaaki ; Kobayashi, Jun'ichi : *Naucleamide F* : a new monoterpene indole alkaloid from *Nauclea latifolia*. *Heterocycles, Journal* **2009**, volume **79**, Pages 765-771.
- [59] Hotellier F. Naufoline et descarbométhoxy-nauclechine, deux nouveaux alcaloïdes isolés de *Nauclea latifolia* sm. (*Rubiaceae*) C.R., *Acad. Sc.*, Paris, t., (29 mars **1976**), **282**, série C, 595.
- [60] Ngnokam D., Ayafor J.F., Connolly J.D. and Nuzillard J.M. *Nauclefolinine*: A new alkaloid from the roots of *Nauclea latifolia*. *Bull. Chemical Society of Ethiopia*. **2003**, **17(2)**, 173-176.
- [61] Hotellier F., Delaveau P., Pousset J.L. *Nauclefine et Naucleline* deux nouveaux alcaloïdes de type indoloquinolizidine isolés du *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry*, (**1975**), vol. **14**, pp. 1407-1409.
- [62] Kametani, T., Takeshia, M. A total synthesis of a nauclefine. *Heterocycles*, (**1976**). **4**, 247-250.

- [63] Hotellier F., Delaveau P., Pousset JL. Alcaloïdes et Gluco-Alcaloïdes des feuilles de *Nauclea latifolia* sm. *Planta medica, Journal of Medicinal Plant Research*, (1979), vol. **35**, pp. 242-246.
- [64] Hotellier F., Delaveau P. et Pousset JL. *Naucleïdinal et Epinaucleïdinal*, Alcaloïdes du *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry*, (1980), Vol.**19**, pp. 1884-1885. Pergamon Press Ltd. Printed in England.
- [65] Ata, A.; Udenigwe, C. C.; Matochko, W.; Holloway, P.; Eze, M. O.; Uzoeguri, P. N.: *Natural product communications*, Journal **2009**, volume **4**, Issue **9**, pages 1185-1188.
- [66] Hotellier F., Delaveau P. and Pousset JL. *Nauclefoline*, a new alkaloid from *Nauclea latifolia* sm. *Centre de Recherches des Sciences Académie*, (1982), *Séries* **293**, 1884-1885.
- [67] Okoli, A. S., Iroegbu, C. U. Evaluation and extracts of *Anthocleista djalensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalii* for activity against bacterial isolates from cases of non gonococcal urethritis. *Journal of Ethnopharmacology* (2004), **92**,135–144.
- [68] De Souza, C.; Koumaglo, K. et Gbeassor, M.-Evaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales-*Pharm. Méd. Tra. Afr.* **1995**, pp 103-112.
- [69] Edward, D.I. *Antimicrobial Action*, 1st Edn. The Mc-millan Press Ltd., London and Basingstoke, (1980), pp. 8-30.
- [70] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution in Antimicrobial Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A5. Villanova, P.A., NCCLS, **1993**.
- [71] Sanogo, R.; Crisafi, G.; Germano, M. P.; De Pasquale, R.; Bisignano, G., Evaluation of Malian traditional medicines: screening for antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*, **1998**, **12** (Suppl. 1, Second International Symposium on Natural Drugs, 1997).
- [72] He Z.D., Ma C.Y., Zhang H.J., et al. Antimalarial constituents from *Nauclea orientalis* (L.). *Chem. Biodevers.* (2005), **2**, 10: 1378-1386. Pub. Med. 17191939.

- [73] Zirihi G.N., Mambu L., Guede-Guinea F. et al. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West Africa plants used for treatment of malaria. *J. Ethnopharmacol.* (2005), **98**, 3: 281-285.
- [74] Jingyong Sun, Hongxiang Lou, Shengjun Dai, Hui Xu, Feng Zhao, Ke Liu. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. *Phytochemistry*, (2008), **69**, 1405–1410.
- [75] Di Giorgio C., Lamidi M., Delmas F. et al. Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from *Nauclea diderrichii*. *Planta Med.*, **2006**, **72**: 1396-1402.
- [76] Lamidi, M., Gasquet, M., Olivier, E., Nze-Ekekang, L., Balansard, G., Boudon, G. Antiparasitic studies of *Nauclea diderrichii* bark. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **1996**, **6**, 31-33.
- [77] Amos S., Abbah J., Chindo B., Edmond I., Binda L., Adzu B., Buhari S., Odutola A.A., Wambebe C., Gamaniel K. Neuropharmacological effects of the aqueous extract of *Nauclea latifolia* root bark in rats and mice. *Journal of ethnopharmacology*, **2005**, **97** 53 – 57.
- [78] Tona L., Kambu K., Ngimbi N., et al. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa. *Congo Phytomedicine*, **2000**, **7**, 1: 31-38. Pub. Med. 11113997.
- [79] Kerharo, J. and Adam, J. G. La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes Médicinales et Toxiques. Editions *Vigot Press*, Paris **1974**, p. 1011.
- [80] Adjanohoun, E. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en république populaire du Congo. ACCT. Paris, **1988**. **605 p.**
- [81] Adjanohoun, E., M. R. A. Ahyi, J. J. Floret, S. Guinko, M. Koumaré, A. M. R. Ahyi, J. Raynal : Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. Agence de Coopération Culture et Technique, (A. C. C. T.), Paris **1981**, **291 p.**
- [82] Adjanohoun, E. L'homme et la plante médicinale en Afrique, In *Aménager le milieu naturel*, **1982**. Notre librairie. n° double 66 – 67 : 51 – 57.
- [83] Morah FNI. Naucleidal and Epinaucleidal from antiviral preparation from *Nauclea latifolia*. *Jamaican J. Sci. Technol.*, **1994**, **5**: 22-24.
- [84] Traoré Dominique. Médecine et Magie africaines ou Comment le Noir se soigne-t-il. *Présence africaine*. **1983**, 29.

- [85] Gbeassor, M. ; Viho, G.K. et coll. 1989-Contribution à l'étude des propriétés pharmacodynamiques de *Azadirachta indica* Ann. Univ. Bénin, Séries sciences **1988-1989**.
- [86] Ouattara Y. ; Sakandé B. ; Simporé J ; Pr Kaboré I. Z.; Pr Guissou I. P.; Sawadogo Pr. L. - Evaluation de l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux de plantes médicinales face à une hépatotoxicité létale induite chez la souris – Annales de l'Université de Ouagadougou. **Série c, 2003, Vol. 001**.
- [87] Onyeyili P. A., Nwosu C.O., Amin J.D., Jibike J.I. Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes. *Fitoterapia*, **2001, 72**, 12-21.
- [88] Okwu D.E, Ekeke O. Phytochemical Screening and Mineral composition of chewing sticks in South Eastern Nigeria. *Global J. Pure Appl. Sci.*, **2003, 9(2)**: 235-233.
- [89] Okwu DE. Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigeria Medicinal plants. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, **2005, 1(4)**: 375-381.
- [90] Okwu DE, Josiah C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian Medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, **2006, 5(4)**: 357-361.
- [91] Okwu DE. Nigerian medicinal and Aromatic Plant. *Science and Biotechnology*. **2007, 1(1)**: 90-96.
- [92] Ntiejumokwu S, Kolawole JO. Antimicrobial and Preliminary phytochemical screening of the bark of *Nauclea latifolia*: *West Afr. J. Pharmacol. Drug Res*. **1990, 9**: 67-90.
- [93] Okwu DE and Uchenna NF. Exotic multifaceted medicinal plants of drugs and pharmaceutical industries. *African Journal of Biotechnology*, December, **2009, Vol. 8 (25)**, pp. 7271-7282, 29.
- [94] Sourabie, S. Contribution à l'étude chimique et pharmacologique de *Nauclea latifolia* sm. et *Holarrhea floribunda* (G. DON) DUR et SCHINZ : plantes de la pharmacopée traditionnelle burkinabé préconisées dans le traitement des gastro-entérites infantiles. Mémoire de DEA, FAST, Université de Ouagadougou, déc. **1990**.

- [95] Sourabie, S. ; Guinko, Sita ; Kaboré, I. Z. Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Nauclea latifolia* sm. (Rubiaceae) : Possibilité d'utilisation des feuilles succédanées des racines dans le traitement traditionnel des gastro-entérites. *Revue Méd. Pharm. Afr.* , **1995**, vol. **9**, n°1, pp 7 – 12.
- [96] Kaboré, I. Z. ; Sawadogo, A. Effets toxiques de *Nauclea latifolia* sm. Séminaire de pédiatrie africaine : communication, Ouagadougou, **1986**, 7 – 9 novembre.
- [97] Irvine, F.R. Woody Plants of Ghana. *Oxford University Press*, London. **1961**.
- [98] Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G. Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. Edinburgh, E and S. **1967**.
- [99] Zhang Z., ElShhly H. N., Jacob M. R., Pasco D. S., Walker L. A., Clark A. M. New indole alkaloids from the bark of *Nauclea orientalis*. *Journal Natural Products*, **2001**, **64**, N° 8, 1001-1005.
- [100] Koch, M. Gentianine et Swertinamarine de l'*Anthocleista procera*. Le prieur ex Burea (Loganiacees). These de Doctorat de Pharmacie, Université de Paris. **1965**.
- [101] Okoli, A.S. In vitro evaluation of antibacterial activities of some Nigerian plants used in treatment of some diseases. Unpublished M.Sc. Thesis, University of Nigeria, Nsukka, **2001**.
- [102] Amouzou L, Agbonon A, Eklou Gadedbeku K, Aklikokou K, Gbéassor M. *Phytothérapie*, August **2008**, vol. **6**, number 4, pp. 228-231 (4) – publisher Springer.
- [103] Oliver-Berver. Medicinal plants in Tropical West Africa. *Cambridge University Press*, (**1986**), pp. 123-143.
- [104] Jansen O., Frédéric M., Tits M., Angenot L., Cousineau S., Bessot L., Crunet C., Nicolas J.-P. Ethnopharmacologie et paludisme au Burkina Faso: Sélection de 13 espèces à potentialités antiparasitaires méconnues *Ethnopharmacologia*, juin **2008**, n°41.
- [105] Bourobou B. H. Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires : Etude des cas. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* **2004**, vol. **13**, pp. 35 – 48.

- [106] Betti, J. L. Vulnérabilité des plantes utilisées comme antipaludiques dans l'arrondissement de Mintom au sud de la réserve de biosphère du Dja (Cameroun). *Syst. Géogr. Pl.*, **2001**, **71** : 661 – 678.

DEUXIEME PARTIE

ETUDES EXPERIMENTALES

PARTIE 2 : ETUDES EXPERIMENTALES

Nous présenterons dans cette partie l'enquête ethnobotanique réalisée au Mali sur *N. latifolia* Sm., puis les études concernant la composition chimique des différents organes de la plante. Un troisième chapitre sera consacré à l'extraction des alcaloïdes totaux des différentes parties de la plante.

Introduction

Dans les sociétés africaines, les plantes ont toujours constitué la principale médication pour différentes pathologies. Au fil du temps et à force d'expérimenter les effets des différents traitements à base de plantes, les hommes ont finalement créé un lien de complémentarité avec la nature pour mieux utiliser la flore. C'est ainsi que la médecine traditionnelle s'est développée en se basant largement sur l'utilisation des végétaux. La médecine traditionnelle reste un savoir empirique, qui se repose en grande partie sur la culture des populations locales.

Contrairement à la médecine conventionnelle, qui recherche les origines et les causes des maladies et infections, la médecine traditionnelle s'attaque directement aux maux. L'étude scientifique de l'utilisation des plantes permet donc de faire un lien entre les deux médecines et pourrait éventuellement, à terme, soulager les populations concernées.

C'est ainsi que de nombreuses plantes utilisées en Afrique ont été étudiées sur le plan botanique, chimique et pharmacologique [1]. De nombreuses recherches scientifiques actuelles concernent les plantes médicinales. La recherche de nouveaux principes actifs menée par les laboratoires pharmaceutiques et universitaires a permis d'expliquer certaines utilisations traditionnelles. Il s'est avéré que les produits naturels issus de certaines plantes ont donné des résultats prometteurs dans le traitement de certaines pathologies aiguës comme le cancer, l'hypertension artérielle, le diabète, le paludisme, les douleurs, etc. C'est le cas notamment du **taxol** et de **vinblastine**.

Au Mali, les médicaments à base de plantes médicinales traditionnelles sont inscrits depuis 1968 dans le formulaire national des médicaments. Ces médicaments à base de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle sont dits "améliorés" car leur composition chimique a été testée avec efficacité aussi bien sur le plan de la toxicité sur les animaux que sur le plan de suivi thérapeutique, il faut souligner que leur production est aussi sous contrôle strict.

Sept Médicaments Traditionnels Améliorés (MTA) ont obtenus une autorisation de mise sur le marché et sont inscrits dans le formulaire national de médicaments au Mali [2].

Les sept MTA élaborés par le Département de Médecine Traditionnelle (DMT) sont :

- Le sirop de Balembo : c'est un antitussif préparé à partir des fruits de *Crossopterix febrifuga* ;
- Le Gastrosédal : utilisé dans le traitement de la gastrite et de l'ulcère gastro-duodénal à base de poudre de racines de *Vernonia kotschyana*.
- L'Hépatisane : Décoction d'un cholagogue, cholérétique et diurétique à base des feuilles de *Combretum micranthum* ;
- Le Dysenterial (tisane) : préconisé dans le traitement de la dysenterie amibienne et de la diarrhée à base d'*Euphorbia hirta* ;
- Le Laxacassia (tisane) : un laxatif à base des feuilles de *Cassia italica* ;
- Le Psorospermine (pommade): utilisé dans le traitement des infections cutanées à base d'un extrait de *Psorospermum guineense* ;
- Le Malarial-5 : un antipaludique obtenu par association de 3 plantes entre-autres *Lippia chevalieri* (32%), *Cassia occidentalis* (62%) et *Spilanthes oleracea* (6%).

Les autorités sanitaires maliennes visent un intérêt particulier sur la production des MTA afin de contribuer à diminuer fortement l'importation des produits pharmaceutiques conventionnels. La production des MTA aidera beaucoup les ménages maliens car leur prix est accessible pour la grande majorité. Les prix des MTA varient de 220 à 1120 FCFA soit (0,33 à 1,70 €) [3].

De nos jours, les industries pharmaceutiques, surtout occidentales, font de la recherche sur les plantes médicinales en général et africaines, en particulier pour identifier les molécules chimiques cibles.

Au cours de ces dernières années, plusieurs molécules isolées des plantes sont devenues des médicaments efficaces et intéressants, qui ont prouvé leur efficacité dans plusieurs traitements, entre autres :

- ✓ Anticancéreux : vinblastine, vincalcoblastine, taxol, vincristine, camptothécine, castanospermine, swainsonine.
- ✓ Antalgiques : morphine, codéine.
- ✓ Vasodilatateurs : vincamine, ajmalicine.
- ✓ Antitussifs : codéine.
- ✓ Antimalarique : quinine, cinchonidine.
- ✓ Antiarythmiques : quinidine, ajmaline.
- ✓ Antidiabétique : miglitol.
- ✓ Spasmolytiques : tubocurarine, papavérine.
- ✓ Emétique : émétine.
- ✓ Contre l'Alzheimer : galanthamine.

Il est important de souligner que la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes et des saponosides dans les plantes explique en grande partie l'activité antitumorale.

Objectif

Pour mener à bien cette étude sur le *N. latifolia* Sm., un certain nombre d'objectifs ont été fixés.

- Réaliser un screening phytochimique complet à partir des différents organes de la plante pour déceler la présence d'alcaloïdes et d'autres groupes de familles chimiques.
- Procéder à l'extraction des alcaloïdes totaux contenus dans les différents organes de la plante.
- Déterminer le pourcentage des alcaloïdes totaux par organe et par site de récolte de la plante.
- Fractionner et purifier les fractions par les méthodes chromatographiques les alcaloïdes totaux issus des différents organes de la plante.
- Analyser et identifier les éventuels produits isolés des différentes fractions de la séparation par les techniques appropriées (GC / MS, LC / MS, RMN...).

L'obtention des alcaloïdes totaux, des fractions et éventuellement de composés isolés permettra ensuite d'étudier leur activité biologique, notamment comme anticancéreux et comme antalgique.

CHAPITRE 1 : Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique est un travail de terrain qui consiste à aller à la rencontre des praticiens traditionnels pour s'enquérir de leur méthode de traitement des maladies. Cette enquête est indispensable dans la mesure où elle nous permet de nous orienter afin de cibler certains tests biologiques. L'outil de travail est élaboré en une série de questionnaires (voir annexe 1).

Les différentes investigations menées ont permis de comprendre que les populations rurales en grande majorité utilisent les plantes pour se soigner avec les recettes des tradipraticiens. L'usage traditionnel des plantes médicinales constitue la base de la médecine tant préventive que curative des populations de couche sensible [4, 5]

L'enquête ethnobotanique sert de trait d'union entre les deux médecines aussi bien traditionnelle que conventionnelle.

1. Description et choix des localités de l'enquête

N. latifolia Sm. présente une gamme élargie d'activités biologiques, il est très connu dans la pharmacopée traditionnelle africaine. Son efficacité a été prouvée soit utilisée seule soit en association avec d'autres plantes pour soigner diverses pathologies. Chez le peuple Dogon, la médecine traditionnelle est très développée et occupe une place de choix. C'est pour quoi d'ailleurs la capitale du pays Dogon (Bandiagara) abrite un centre régional de médecine traditionnelle (CRMT). Les Dogons ont accordé un intérêt particulier au *N. latifolia* Sm. de par ses nombreuses vertus médicinales appréciables. Cela justifie en grande partie le choix du pays Dogon pour réaliser l'enquête ethnobotanique.

Pour cette étude nous avons choisi plusieurs sites d'enquêtes.

Nous nous intéressons d'abord aux différents sites de récoltes. Nous avons choisi 4 sites de récoltes : Kanadjiguila, Lafiabougou, Lassa et Koulouba.



Image 9 : zones d'enquête et de récoltes

2. Méthodologie

Ces enquêtes ont été réalisées entre mai et août 2009 auprès des tradithérapeutes, des herboristes et des personnes en contact avec les plantes médicinales à travers le Mali. Ces sites d'enquête ont été choisis pour leur divergence de climat bien que relativement proches les uns des autres. L'enquête a été menée en grande partie dans la 5^e région administrative du Mali (région de Mopti), principalement au pays Dogon compte tenu de l'importance accordée à la pharmacopée traditionnelle africaine.

Le nombre de tradipraticiens interrogés est de 25 à travers le pays repartis entre les 2 sexes (23 masculins et 2 féminins), dont 6 à Bandiagara, 5 à Banani, 3 à Bamako, 3 à Gologouda, 2 à Endé, 2 à Sangha, 1 à Bodio, 1 à Kassa, 1 à Sibi-Sibi et 1 à Soroli. Cette disparité en fonction des sites est due au fait de la proximité ou non d'un centre urbain et aussi au nombre d'habitants. Les sites de Gologouda, Bodio, Kassa, Sibi-Sibi et Soroli dépendent du Cercle de Bandiagara, qui est le chef lieu du cercle à quelques 735 km de Bamako et à 72 km de la capitale régionale, Mopti. La ville de Bandiagara dispose d'un CRMT (centre régional de médecine traditionnelle) et abrite le siège de la FATTB (fédération des associations des tradithérapeutes de

Bandiagara). Le village de Banani est administré par le cercle de Sangha qui à son tour relève de Bandiagara. Le site d'Endé se situe dans le cercle de Bankass à environ 800 km de Bamako.

L'outil de notre enquête est un formulaire constitué de 8 questions (voir annexe 1) permettant d'évaluer la connaissance de la plante, l'utilisation, la prescription et le mode de préparation préconisé de chacun des tradipraticiens ou herboristes interrogés.

2.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique

Les résultats de l'enquête ethnobotanique sont rassemblés dans les tableaux 1 à 7.

Tableau 1 : Utilisations des feuilles de *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Bilharziose et constipation	Boire le décocté de poudre de rameaux feuillés matin et soir. Une semaine de traitement contre la bilharziose, une à deux prises par jour contre la constipation.	Bandiagara
Céphalées	Prendre un bain avec le décocté de fagots de feuilles suivi d'une fumigation et d'une boisson 3 à 4 paumées respectivement homme et femme en 2 prises matin et soir.	Soroli
Hémorroïdes	Le décocté de feuilles en association avec l' <i>Acacia seyal</i> à boire 2 fois par jour (matin et soir).	Bandiagara
Mal de poitrine	Boire 3 à 4 paumées selon les sexes male et femelle de décocté de fagots de feuilles matin et soir suivi d'une fumigation.	Lafiabougou (Bamako)
Malaria	Le macéré de poudre de rameaux feuillés en association avec les fruits de <i>Balanites Aegyptiaca</i> à mélanger avec l'eau du 2 ^e rinçage de mil. Boire le mélange 2 à 3 fois par jour en fonction de la gravité, traitement de 3 jours en une semaine.	Sibi-Sibi
	Le décocté de feuilles à boire matin et soir pendant 3 jours.	Bandiagara
	Prendre un bain avec le décocté de 2 fagots de feuilles et boire un bol à café de décocté matin et soir pendant 3 jours pour traiter la malaria et la bilharziose. Utiliser le beurre de Karité comme pommade pour baisser la fièvre.	Marché Médine (Bamako)

Tableau 2 : Utilisations des fruits de *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Bilharziose	Les fruits murs tranchés et séchés sont réduits en poudre. Mélanger la poudre au sel gemme pour faire une macération. Boire ½ bol à café aux enfants matin et soir pour un traitement de 3 jours.	Banani
Toux chez les enfants (nourrissons)	Fumer les fruits et les réduire en poudre. Ajouter du sel gemme pour donner une pincée aux nourrissons avant allaitement matin et soir.	Endé
Peur de nuit	Les tranches de fruits séchées sont permanemment gardées sur soi les soirs ou placées à côté des cheveux le moment du coucher.	Gologouda

Tableau 3 : Utilisations des écorces de *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Bilharziose	Boire 1 verre à thé du décocté de fagot des écorces internes 3 fois par jour. En cas de fièvre prendre un bain corporel 3 fois par jour pour un traitement d'une semaine.	Banani
	Boire une louche du décocté des écorces matin et soir accompagné d'un bain corporel.	Banani
	Confectionner une ceinture à partir des écorces internes et l'enrouler au tour des reins, à ne pas toucher, au pourrissement elle tombe et la maladie est guérie.	Sangha
Lavage anal chez les enfants et nourrissons	Faire une décoction avec les écorces internes et pulvériser le sujet avec le décocté par voie anale accompagné d'un bain corporel matin et soir pour un traitement de 3 jours.	Sangha
Malaria (Paludisme)	Boire le macéré des foins des écorces matin et soir pendant 3 jours à une semaine.	Lafiabougou (Bamako)
Maux de ventre	Pour les maux de ventre simples, boire une louche du décocté de fagot d'écorces accompagné d'un bain corporel matin et soir pour un traitement de 3 jours.	Bodio
	Pour les maux de ventre des enfants, faire boire le macéré des fibres de l'écorce interne matin et soir. Ensuite pulvériser par voie anale l'enfant avec le macéré matin et soir.	Kassa

Tableau 4 : Utilisations du gui *N. latifolia* Sm.

Gui : plante à feuillage persistant (*Loranthaceae*), couvertes des baies blanches et qui parasite les arbres.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Maladie inconnue	Le décocté du gui asséché est utilisé pour la fumigation, le bain corporel et la boisson matin et soir. Pour la boisson, prendre 3 à 4 paumées selon les sexes male et femelle. En cas d'insuffisance de gui, ajouter les feuilles de la même plante.	Gologouda

Tableau 5 : Utilisations des racines de *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Bilharziose	Boire un verre à thé du macéré issu du fagot (botte) d'écorces internes de la racine 2 à 3 fois par jour. Durée traitement : 3 jours.	Banani
Gonflement du sexe chez les sujets males	Boire 3 paumées du décocté des tranches de racine par jour pour soulager le sexe.	Bandiagara
Maux de ventre simples	Préparer une décoction avec le fagot des racines et boire 3 à 4 paumées selon les sexes male et femelle matin et soi.	Bandiagara
Maux de ventre chez les enfants et les femmes après accouchement	Préparer une macération avec les fibres internes des racines. Donner à boire ½ à 1 verre à thé du macéré par jour à l'enfant en fonction de l'âge (de 0 à 10 ans). Pour les femmes souffrant des maux de ventre après accouchement, boire 1 à 2 verre à thé du macéré mielleux (miel de plus d'un an).	Bandiagara
Maux de ventre	Faire une infusion de 5 à 10 mn avec 1 à 2 cuillerées à café de poudre d'écorces internes des racines et boire 1 verre à thé d'infusé.	Gologouda

Tableau 6 : Utilisations du mélange fruits + racines *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Bilharziose infantile	Boire 1 verre et ½ à thé du décocté issu du mélange des tranches de fruits + racines matin et soir. En cas de soulagement, boire 1 verre matin et soir.	Banani

Tableau 7 : Utilisations du mélange écorces + racines *N. latifolia* Sm.

Maladies traitées	Posologie	Sites
Accès pernicieux	Préparer une décoction du mélange écorces + racines. Le décocté servira à la fumigation, la boisson et le bain corporel 2 à 3 fois par jour en fonction de la gravité. Boire 3 à 4 paumées selon les sexes male et femelle.	Endé

2.2. Analyse et discussion des résultats

L'enquête ethnobotanique réalisée sur l'ensemble des zones d'enquête, de Bamako jusqu'au pays Dogon met en évidence l'usage de *N. latifolia* Sm. par les tradipraticiens comme agent fébrifuge.

N. latifolia sm. est une plante médicinale qui a prouvé son évidence thérapeutique dans les zones rurales africaines, les guérisseurs locaux utilisent les recettes de la plante en fonction des sujets et des maladies pour traiter diverses pathologies tropicales [6,7]. Il s'est avéré que les feuilles, les écorces de tronc, les racines et mêmes les fruits de la plante sont utilisés pour traiter divers types de maladies [8-10].

Au cours de notre enquête, nous avons recensé environ 13 pathologies et infections que les tradithérapeutes traitent avec les différents organes de *N. latifolia* Sm., qui sont entre-autres : l'accès pernicieux, la bilharziose, les céphalées, la constipation, le gonflement de sexe chez le garçon, les hémorroïdes, les infections anales chez les nourrissons, le mal de poitrine, la maladie inconnue, la malaria (ou paludisme), les maux de ventre, la peur de nuit, la toux infantile.

Pour les maux de ventre, le lavage anal (ou lavement) chez les enfants, le traitement de la fièvre et du paludisme des décoctions de feuilles et de rameaux feuillés sont prescrites. Ces traitements correspondent à l'utilisation de *N. latifolia* Sm. déjà décrit dans la littérature [11,12]. Dans certains cas, les tradithérapeutes rencontrés au cours de l'enquête, utilisent les feuilles comme « régulateur des fonctions intestinales » qui a déjà été évoqué par Hotellier et al. en 1979 [13].

En réalité, la majeure partie de ces observations sur le terrain corrobore celle mentionnée dans la littérature par d'autres chercheurs [14-21]

De toutes les zones d'enquête, nous avons compris que parmi les maladies recensées, 3 étaient les plus citées, à savoir : la malaria, les douleurs abdominales et la bilharziose. En outre, les tradipraticiens traitaient différemment ces maladies soit

avec les feuilles, soit avec les écorces de tronc ou soit avec les racines de *N. latifolia* sm.

Les écorces en général, sont utilisées comme fébrifuges [13], d'où une macération des foins internes des écorces recommandée contre la fièvre qui accompagne le paludisme et contre les maux de ventre.

Les extraits d'écorces de racines sont utilisés dans la littérature pour traiter la malaria, les complications abdominales, ils sont utilisés aussi comme anti-inflammatoire et antipyrétique [22]. D'autres l'utilisent contre l'hypertension artérielle [23] et pour réguler le cycle menstruel féminin [24].

C'est ainsi qu'à Bandiagara, les racines sont utilisées en décoction par quelques tradipraticiens contre les infections liées au gonflement de sexe chez les garçons et en macération contre la bilharziose infantile. Ces activités pourront être liées à la présence des coumarines et des composés polyphénoliques qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticoagulantes remarquables [25].

Les tradipraticiens de Banani et d'Endé préconisent que les fruits murs consommés régulièrement sans excès soulagent la constipation chronique et préviennent la bilharziose infantile.

Les tradipraticiens de Bamako et de Sibi-Sibi préconisent l'utilisation de décoction des rameaux feuillés en association avec d'autres plantes (*Opilia celtidifolia*, *Mitragyna inermis*, *Anogeissus leiocarpus*, *Trichilia emetica*, *Acacia seyal*...) pour apaiser la forme grave du paludisme.

La diversité des effets bénéfiques attribués à *N. latifolia* Sm. en font une plante prescrite dans le cas des maladies dont le diagnostic est inconnu. Cette pratique a été observée sur le site de Gologouda.

Nous avons observé que souvent différents organes de la plante sont utilisés pour traiter une même maladie (comme la malaria), bien que des différences peu notables de posologie (décoction de feuilles en 3 prises ou macération d'écorces en 2 prises) soient mises en évidence ça et là.

2.3. Conclusion

L'enquête ethnobotanique que nous avons menée prouve l'utilisation abondante et variée, tant en terme de prescriptions que de posologies, de *N. latifolia* sm. par les tradithérapeutes et par les populations en zone rurale.

Plusieurs utilisations de différents organes de *N. latifolia* sm. recensées au cours de notre enquête peuvent être considérées comme nouvelles. C'est notamment le

cas de l'utilisation des décoctés de racines pour lutter contre les infections liées au gonflement de sexe chez le genre masculin par les tradipraticiens de Bandiagara. La poudre de fruits fumée associée au sel gemme est prescrite pour traiter la toux chez les nourrissons à Endé. La maman avant d'allaiter son nourrisson dépose juste une pincée du mélange poudre-sel sur le bout du sein et le bébé en tétant digère une partie qui agira contre la toux. Le gui est employé pour traiter les maladies inconnues et les fruits séchés sont utilisés contre la peur nocturne. L'utilisation abondante des feuilles sous diverses formes est à mettre en parallèle avec l'abondance des familles chimiques présentes dans cet organe et la facilité de cueillette.

Enfin, il est notable que cette plante est souvent utilisée pour traiter les maux de ventre et aurait donc une activité antalgique sur la douleur viscérale.

CHAPITRE 2 : Caractérisation chimique

1. Lieu de cueillette des différents organes des plantes

Les différents organes (feuilles, écorces de tronc, racines) de la plante ont été récoltés dans leur habitat naturel. Toutes les récoltes ont été effectuées dans le district de Bamako et ses environs à l'exception des échantillons des feuilles du site de Kita. Nous avons réalisé, à la même période, des récoltes sur les sites présentant des différences climatiques ou de nature du sol afin de réaliser des études phytochimiques comparatives. Les échantillons récoltés ont été formellement identifiés par les herboristes, les tradithérapeutes et un botaniste de l'IPR/ISFRA.

1.1. Site de Kanadjiguila : récolte au bord d'une rivière

Plante adulte fructifère de 4 à 5 m de haut prélevée le 18 septembre 2008 en matinée au bord d'une rivière en sol argileux à Kanadjiguila aux environs de Bamako sur la route menant en Guinée. Les parties végétales ont été facilement prélevées.

1.2. Site de Lafiabougou : récolte au flanc de la colline

Jeune plante de 2 à 3 m de haut sans fruit prélevée le 13 septembre 2008 à midi au pied de la colline de Lafiabougou dans la partie ouest du district de Bamako. Les feuilles, les racines et les écorces sont prélevées en partie saillante sur sol rocheux.

1.3. Site de Lassa : récolte sur la colline

Très jeune plante de 2 m de haut sans fruit prélevée le 13 septembre 2008 en matinée sur une des collines ouest du district de Bamako loin des habitations. Les feuilles, les racines et les écorces sont cueillies en hauteur sur une surface plane rocheuse et dure (cueillette difficile).

1.4. Site de Koulouba : récolte sur la colline

Plante adulte fructifère de plus de 6 m de haut prélevée le 29 septembre 2008 vers midi sur les hauteurs rocheuses en zone d'escarpement de la colline de Koulouba dans le district de Bamako. Plante ayant des ramifications dans le lit d'un ruissellement. Les parties végétales sont cueillies sans difficulté. La zone de Koulouba est la plus exposée aux pollutions environnementales.

1.5. Site de Kita

Aucun renseignement sur le lieu de cueillette idem sur l'état de la plante. Les échantillons représentent les feuilles de *N. latifolia* Sm. prélevés dans le cercle de Kita à plus de 200 km de Bamako.

2. Végétation et pluviométrie

Le site de Kanadjiguila dans les environs de Bamako, localisé au Sud Ouest de la capitale du pays sur la route de Guinée dans une zone de savane, a un climat de type soudano-guinéen caractérisé par une pluviométrie annuelle de 950 mm à 1250 mm avec une saison pluvieuse unique de 5 mois (entre mai à octobre).

Les sites de Lafiabougou et Lassa, sont situés dans la commune IV et le site de Koulouba en commune III du district de Bamako. Ces sites présentent le même indice de pluviométrie que celui de Kanadjiguila. Les sites de récolte de Lassa et Koulouba sont situés en hauteur sur colline en zone rocheuse, celui de Lafiabougou se trouve au pied de la colline aussi en zone rocailleuse. Seul le site de Kanadjiguila se trouve dans le lit d'une rivière sur terrain argileux et celui de Koulouba ayant une ramification dans un point de ruissellement.

Cette diversité climatique nous permettra d'étudier son influence éventuelle sur la composition chimique des différents organes de la plante. Les organes récoltés sur les sites de Kanadjiguila et Koulouba ont été prélevés sur les plantes adultes fruitières et ceux des sites de Lassa et Lafiabougou sur les jeunes plantes n'ayant pas encore atteintes tous leurs stades de développement.

3. Période et choix de prélèvements

Les prélèvements ont eu lieu en journée et en plein hivernage (période de grande pluie) au mois de septembre en des endroits différents. Les différents organes de *N. latifolia* Sm. (les feuilles, les écorces de tronc et les racines) ont été récoltés entre le 13 et le 29 septembre 2008 dans chacun des quatre sites choisis.

Les cueilletes ont été espacées et distancées pour éviter de retrouver les mêmes traces de pollution et les mêmes teneurs de toxicité dans chacune des plantes. Le choix des quatre prélèvements sur les quatre sites différents prenait en compte la notion de chémotype.

4. Préparation des échantillons

Une fois, la récolte du matériel végétal réalisée, les parties végétales sont ensuite séchées à l'ombre à température ambiante (environ 30 à 35°C) pendant 2 semaines. Puis, elles sont écrasées dans un mortier avant de passer au travers d'un tamis ensuite finement pulvérisées au moulin.

Les tests de caractérisations chimiques ont été réalisés sur les poudres préalablement préparées à partir de chacun des organes de la plante avec l'aide des réactifs de caractérisation classiques [25].

Le principe de la caractérisation chimique consiste à révéler par l'analyse qualitative des extraits issus des différents organes de *N. latifolia* Sm. la présence des familles chimiques.

5. Réactions de caractérisation

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Toute fois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative.

Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou insaturation dans une molécule).

5.1. Matériel et méthodes

5.1.1. Caractérisation des alcaloïdes

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du réactif de Mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium) [26].

A 10 g de poudre on ajoute 50 ml de H_2SO_4 à 10%. Après 24 heures de macération à température ambiante, le macéré est filtré et lavé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Prélever 1 ml de filtrat y ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer et attendre 15 minutes.

La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune-clair (protocole D.M.T).

Cette présence est illustrée par une extraction rapide avec un solvant chloré ($CHCl_3$). Prélever une quantité nécessaire de filtrat ensuite l'alcaliniser par une solution diluée de NH_4OH à 50% et ajouter le solvant chloré de même volume (25 ml). Après agitation, soutirer la phase organique, filtrer puis évaporer à sec. Mettre 2 ml de solution acide (HCl ou H_2SO_4) à 10% au résidu obtenu et partager entre 2 tubes à essais. Révéler le premier tube par 5 gouttes du réactif de Mayer et le second servira de témoin. L'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune-clair confirme la présence des alcaloïdes (protocole D.M.T).

N.B : Il est important de souligner que le réactif de Draggendorff est aussi un révélateur potentiel des alcaloïdes. Dans notre étude son usage est limité, en tenant compte de sa forte affinité avec les acides aminés. Le réactif de Draggendorff peut se révéler avec les faux positifs.

5.1.2. Caractérisation des tanins

La présence de tanins galliques et catéchiques a été mise en évidence à l'aide de perchlorure ferrique [25].

Préparer un infusé à 5% à partir de 5 g de poudre de l'échantillon dans 100 ml d'eau bouillante. Après 15 minutes, la suspension est filtrée et rincée pour obtenir 100 ml d'infusé à 5%. Cet infusé servira également à caractériser les flavonoïdes.

Les tanins galliques, hydrolysables, sont mis en évidence par ajout de 15 ml de réactif de Stiasny à 30 ml de l'infusé à 5%. Après 15 minutes de chauffage au bain marie à 90°C, le mélange est filtré et saturé par 5 g d'acétate de sodium, ensuite ajouter 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques.

Les tanins catéchiques, non hydrolysables, sont caractérisés par addition de 1 ml de HCl concentré à 5 ml d'infusé préalablement préparé. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins catéchiques un précipité rouge, insoluble dans l'alcool iso-amylque, se forme. Les tanins catéchiques sont aussi mis en évidence après l'addition du réactif de Stiasny par la formation de précipité.

5.1.3. Caractérisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes, pigments quasiment universels des végétaux, constituent une grande famille de composés très souvent abondamment présents dans les plantes. Plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence différents types de flavonoïdes [25].

La réaction à la cyanidine permet de révéler la présence de flavonoïdes libres (flavones et dihydroflavonols). A 5 ml d'infusé à 5% préparé précédemment pour caractériser les tanins, ajouter 5 ml d'une solution de HCl concentré à 50% dans l'éthanol (alcool chlorhydrique). Ensuite, ajouter 1 ml d'alcool iso-amylque et quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration rose-orange (flavones) ou rose violacée (flavanones) révèle la présence de flavonoïdes libres.

Les leucoanthocyanes sont également révélés par la réaction à la cyanidine mais sans ajout de copeaux de magnésium. Après 15 minutes de chauffage au bain marie, l'apparition d'une coloration rouge (rouge cerise) est caractéristique de leur présence (flavonols et flavanonols).

Les anthocyanes sont révélés par ajout à 5 ml d'infusé à 5% de 5 ml de H_2SO_4 à 10% et 5 ml de NH_4OH à 50%. Si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyane.

5.1.4. Caractérisation des dérivés anthracéniques

On retrouve les dérivés anthracéniques dans les plantes, sous forme de génines (ou aglycones) libres quinones ou sous forme combinée d'hétérosides anthracéniques. La présence des dérivés anthracéniques est mise en évidence à l'aide de la solution NH_4OH diluée à 50% [25].

Un extrait chloroformique est préparé à partir de 1 g de poudre d'échantillon dans 10 ml de CHCl_3 , suivi d'un chauffage pendant 3 minutes au bain-marie. La solution est filtrée à chaud. Le résidu de la poudre épuisée par CHCl_3 servira à mettre en évidence les formes hétérosidiques (O-hétérosides et C-hétérosides). Les anthracéniques libres, sont mis en évidence en ajoutant 1 ml de solution NH_4OH diluée à 1 ml d'extrait chloroformique, suivi d'une agitation. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique leur présence.

Les O-hétérosides sont caractérisés par ajout au résidu de la poudre épuisée par CHCl_3 précédemment, 10 ml d'eau plus 1 ml de HCl concentré, chauffer l'ensemble pendant 15 minutes au bain-marie, puis refroidir sous courant d'eau froide et filtrer. A 5 ml du filtrat sont ajoutés 5 ml de CHCl_3 , après agitation soutirer la phase organique. 1 ml de solution NH_4OH diluée est ajouté à la phase organique. L'apparition d'une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des O-hétérosides.

Les C-hétérosides sont caractérisés par ajout de 10 ml d'eau et 1 ml de solution FeCl_3 à 10% à la phase aqueuse obtenue précédemment avec les O-hétérosides, le mélange est chauffé 30 minutes au bain-marie et refroidi sous courant d'eau. La phase organique est séparée après agitation avec 5 ml de CHCl_3 et 1 ml de NH_4OH diluée est ajouté. L'apparition de la coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des C-hétérosides.

5.1.5. Caractérisation des stérols et triterpènes

La présence des stérols et triterpènes est mis en évidence à l'aide de H_2SO_4 concentré [25].

Un extrait est tout d'abord réalisé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1 g de poudre de l'échantillon dans 20 ml d'éther. L'extrait obtenu servira en plus des stérols à la caractérisation des caroténoïdes et des coumarines.

Les stérols et triterpènes sont mis en évidence par ajout de 1 ml de CHCl_3 au résidu de 10 ml du macéré évaporé. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1 à 2 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés au fond de l'un des tubes, l'autre servira de témoin. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, révèle leur présence.

Les caroténoïdes, pigments terpéniques utiles à la photosynthèse, sont mis en évidence par SbCl_3 [25].

On ajoute 2 à 3 gouttes de solution saturée de SbCl_3 dans CHCl_3 pour reprendre le résidu de 5 ml d'extrait étheré évaporé à sec. Le développement d'une coloration bleue devenant rouge indique la présence des caroténoïdes.

La présence de coumarines (composés polyphénoliques) est réalisée en évaporant à sec 5 ml d'extrait étheré. 2 ml d'eau chaude sont ajoutés puis 1 ml de NH_4OH à 25%. Le mélange est observé sous UV à 366 nm. L'observation d'une fluorescence bleue intense indique leur présence.

5.1.6. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques

La présence d'hétérosides cardiotoniques a été mise en évidence à l'aide de KOH en présence de réactifs appropriés [25].

Une phase chloroformique est tout d'abord réalisée à partir de 1 g de poudre de l'échantillon, à laquelle sont ajoutés 10 ml de EtOH à 60% et 5 ml de solution $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à 10%. Après chauffage du mélange pendant 10 minutes au bain-marie bouillant, on y ajoute 10 ml de CHCl_3 , suivi d'une agitation. La phase organique est séparée et partagée entre deux tubes à essais, puis suivi d'une évaporation à sec du contenu de chacun des tubes au bain-marie bouillant. Le résidu de chaque tube est repris avec 0,4 ml d'isopropanol. On ajoute dans le premier tube 1 ml du réactif de Baljet et dans le second 1 ml du réactif de Kedde.

On introduit dans chacun des tubes 5 gouttes de KOH à 5% dans EtOH. Le développement après 10 minutes d'une coloration orange dans le premier tube et rouge violacée dans le second indique leur présence.

5.1.7. Caractérisation des saponosides

Les saponosides sont des substances très fréquentes chez les végétaux, ils sont caractérisés par leur pouvoir moussant en solution aqueuse qui donne l'indice de mousse [25].

Un décocté à 1% est préparé avec 1 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante et maintenir une ébullition légère pendant 15 minutes puis la suspension est filtrée. On introduit dans 10 tubes à essai successivement 1 à 10 ml de filtrat en complétant le contenu de chaque tube à 10 ml avec de l'eau. On agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde. La hauteur de mousse est mesurée 15 minutes après l'agitation. L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube (N) dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm. $I_m = 1000/N$.

5.1.8. Caractérisation des composés réducteurs

Plusieurs composés réducteurs peuvent être mis en évidence, il s'agit des oses et holosides et des mucilages, en préparant un décocté aqueux à 10% à partir de 10 g de poudre de matière végétale dans 100 ml d'eau pendant 15 minutes.

Après évaporation à sec de 5 ml du décocté à 10%, 3 gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutées puis 4 gouttes d'une solution saturée de thymol dans EtOH. L'apparition d'une solution rouge révèle la présence d'oses et holosides.

Les mucilages sont caractérisés par l'apparition d'un précipité floconneux en ajoutant 5 ml d'EtOH absolu à 1 ml du décocté aqueux préalablement préparé.

Les hétérosides cyanogénétiques sont également des composés réducteurs souvent présents dans les plantes. Ils sont mis en évidence en réalisant une suspension de 1 g de poudre végétale dans 5 ml d'une solution de même volume d'eau et de toluène. Un papier picrosodé imbibé de réactif de Guignard (2 g d'acide picrique et 20 g de carbonate de sodium dans 200 ml d'eau distillée) est alors déposé dans le tube. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'hétérosides cyanogénétiques.

5.2. Résultats des caractérisations phytochimiques

Les résultats du screening phytochimique sont classés en fonction des différents critères d'observation, entre autres :

- Réaction très positive :	+	+	+	+
- Réaction positive :	+	+	+	
- Réaction moyennement positive :	+	+		
- Réaction douteuse:	+			
- Test négatif :	0			

Les résultats du screening phytochimiques sont consignés dans les tableaux 8 à 14.

Tableau 8 : Résultat de recherche des alcaloïdes dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

Sites	Alcaloïdes		
	Feuilles	Écorces	Racines
Lafiabougou	++	++	++
Koulouba	+	+	+++
Kanadjiguila	+++	+++	+++
Lassa	++	+	++
Kita	+++		

Tableau 9 : Résultat de recherche des substances polyphénoliques dans les différents organes de *Nauclea latifolia* sm.

Tanins

Sites	Tanins	Organes	
		Feuilles	Racines
Kanadjiguila	Catéchiques	++++	0
	Galliques	+++	+++
Koulouba	Catéchiques	+++	0
	Galliques	+++	0
Lafiabougou	Catéchiques	++	+
	Galliques	+++	++
Lassa	Catéchiques	++++	0
	Galliques	++++	++

Flavonoïdes

Sites	Flavonoïdes	Organes	
		Feuilles	Racines
Kanadjiguila	Flavonoïdes libres	+++	++
	Anthocyanes	0	0
	Leucoanthocyanes	+++	++
Koulouba	Flavonoïdes libres	++	++
	Anthocyanes	0	0
	Leucoanthocyanes	++	++
Lafiabougou	Flavonoïdes libres	+++	++
	Anthocyanes	0	0
	Leucoanthocyanes	+++	++
Lassa	Flavonoïdes libres	++++	++
	Anthocyanes	0	0
	Leucoanthocyanes	++++	++

Tableau 10: Résultat de recherche des dérivés anthracéniques dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

SITES	ANTHRACENIQUES LIBRES		ANTHRACENIQUES O-Hétérosides		COMBINES C-Hétérosides	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Kanadjiguila	0	+	0	0	+	0
Koulouba	0	0	0	0	0	0
Lafiabougou	0	+	0	0	0	0
Lassa	0	0	+	0	+	0

Tableau 11 : Résultat de recherche des stérols, triterpènes et coumarines dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

SITES	STEROLS, TRITERPENES ET COUMARINES	ORGANES	
		Feuilles	Racines
Kanadjiguila	Liebermann-Burchard	+ + +	+ + +
	Caroténoïdes	+	+ +
	Coumarines	+ +	+ +
Koulouba	Liebermann-Burchard	+ + +	+ + +
	Caroténoïdes	+ +	+ +
	Coumarines	+ +	+ +
Lafiabougou	Liebermann-Burchard	+ + +	+ + +
	Caroténoïdes	+ +	+ + +
	Coumarines	+ +	+ +
Lassa	Liebermann-Burchard	+ + +	+ + +
	Caroténoïdes	+ +	+ +
	Coumarines	+ +	+ +

Tableau 12 : Résultat de recherche des hétérosides cardiotoniques dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

SITES	Réactif de Baljet		Réactif de Kedde	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Kanadjiguila	+	+	0	0
Koulouba	+	+	0	+
Lafiabougou	+	+	+	+
Lassa	+	+	+	0

Tableau 13 : Résultat de recherche des saponosides dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

SITES	TESTS		Indice de mousse	
	Caractère moussant		Feuilles	Racines
Kanadjiguila	+	+	0	200
Koulouba	+	+	0	142,85
Lafiabougou	+	+	0	333,33
Lassa	+	+	500	333,33

Tableau 14 : Résultat de recherche des composés réducteurs dans les différents organes de *Nauclea latifolia* Sm.

SITES	COMPOSES REDUCTEURS		OSES HOLOSIDES		ET MUCILAGES		HETEROSIDES CYANOGENETIQUES	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
Kanadjiguila	+	+	+	+	+	+	0	0
Koulouba	+	+	+	+	+	+	0	0
Lafiabougou	+	+	+	+	+	0	0	0
Lassa	+	+	+	+	+	+	0	0

6. Analyse et discussion

Les résultats des tests de caractérisation pour les alcaloïdes définis dans le tableau 8 indiquent la présence des alcaloïdes dans les 3 organes de *N. latifolia* Sm.

Le test avec le réactif de Mayer révèle la présence des alcaloïdes dans les feuilles, dans les écorces de tronc et dans les racines de *N. latifolia* sm. Cette présence est très marquée sur le site de Kanadjiguila au niveau des trois organes, elle est présente dans les extraits des sites de Lafiabougou et de Lassa par contre douteuse au niveau du site de Koulouba. Il en ressort qu'au cours du balayage, qualitativement les feuilles et les racines en contiennent plus que les écorces. La faible présence des alcaloïdes à Koulouba peut être expliquée par l'exposition de la zone à un degré de pollution élevé par rapport aux autres.

Les alcaloïdes issus de *N. latifolia* sm. possèdent une activité antimalarique, antimicrobienne et une faible cytotoxicité [27], ce qui pourrait justifier la prescription de décoctés de feuilles et d'écorces de tronc pour lutter contre le paludisme [12, 28-29]. De plus, la présence de ces alcaloïdes pourrait impliquer des activités biologiques intéressantes, notamment antiproliférative et antalgique comme cela a déjà été établi précédemment [30].

Pour la détermination des autres familles chimiques, nous avons réalisé le criblage phytochimique au niveau des feuilles et des racines. Ces 2 organes possèdent une proportion élevée en alcaloïdes par rapport aux écorces, lesquelles d'ailleurs seront exemptées des prochaines récoltes d'échantillons.

L'étude complète du screening phytochimique chez *N. latifolia* Sm. met en évidence la présence d'autres composés chimiques qui possèdent à leur tour des activités biologiques intéressantes. Il s'agit entre autres des substances polyphénoliques (tanins et flavonoïdes), des stérols et triterpènes, des hétérosides cardiotoniques, des saponosides, des composés réducteurs (oses et holosides, coumarines) et des polyuronides (mucilages). La présence des anthracéniques (quinones) est douteuse, notons tout de même des traces dans les organes de certains sites. L'absence totale des hétérosides cyanogénétiques diminue fortement les risques toxicologiques liés à l'usage de *N. latifolia* Sm. Ces résultats sont en conformité avec les travaux de Kaboré et al., réalisés en 1995 [27].

Les flavonoïdes sont présentes sous 2 formes : les flavonoïdes libres (flavones et dihydroflavonols) et les leucoanthocyanes (flavonols et flavanonols). Notons tout de même l'absence totale des flavonoïdes sous forme d'anthocyanes.

On reconnaît principalement le rôle « veinoactif » des flavonoïdes c.à.d. diminution de la perméabilité des capillaires sanguins et le renforcement de leur résistance [25]. On leur attribue aussi certaines propriétés antiallergiques, hépatoprotecteurs et antispasmodiques [31].

Les flavonoïdes possèdent des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et jouent un rôle positif dans le traitement des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [32]. Dans certains cas, ils sont connus pour leur activité antivirale, antimicrobienne et antitumorale [33,34]. Dans la littérature, on dit qu'en réalité c'est un petit nombre de flavonoïdes qui sont anticancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales in vitro [35].

Les tanins existent soit sous la forme catéchique soit sous la forme gallique. Les 2 formes sont présentes dans les feuilles, par contre la forme catéchique est quasi-absente dans les racines (présence sous forme de traces dans les racines du site de Lafiabougou).

Les tanins (surtout galliques) sont tenus comme bons remèdes dans le traitement des maladies respiratoires et contre la toux [36]. Par voie interne, les

tanins exercent une activité antidiarrhéique certaine. Ses propriétés antiseptique, antibactérienne et antifongique sont clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et des dermatites [37]. Les tanins possèdent une forte activité antioxydante, ce sont des très bons piègeurs des radicaux libres (spin trapping) et inhibent la formation du radical superoxyde.

La présence des tanins dans les différents organes de *N. latifolia* Sm. pourrait expliquer sa prescription comme antidiarrhéique ou comme régulateur des fonctions gastro-intestinales.

La présence des hétérosides cardiotoniques est révélée à la fois par le réactif de Baljet et celui de Kedde. Dans notre cas, le réactif de Baljet est le plus précis. Nous concluons la présence des hétérosides cardiotoniques dans les feuilles et dans les racines.

Les stérols et les triterpènes sont présents aussi bien dans les feuilles que dans les racines. Le criblage a décelé aussi la présence des coumarines et des caroténoïdes dans les 2 organes. La coumarine, connue pour ses propriétés anti-œdémateuses a fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés : elle est immunostimulante et développerait une activité cytotoxique [25]. Traditionnellement, la coumarine est utilisée pour faciliter les fonctions d'élimination urinaire et digestive.

La présence des dérivés terpéniques pourrait expliquer les nombreuses activités biologiques de la plante par exemple contre la forme résistante du paludisme [38].

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. Ces propriétés tensioactives sont très marquées dans les feuilles et racines de *N. latifolia* Sm. Le caractère moussant est très important dans les 2 organes mais l'indice de mousse qui traduit la présence des saponosides est plus visuelle dans les racines que dans les feuilles. Souvent dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois inactifs, *in vitro*, sur des virus (par exemple : glycyrrhizine). Il n'est pas rares que les saponosides soient cytotoxiques, voire même antitumoraux *in vivo* [25].

Plusieurs plantes connues et utilisées pour leur effet anti-inflammatoire et anti-œdémateux doivent ces propriétés à des saponosides : la racine de la réglisse, la graine du marronnier d'Inde, le *Bupleurum* (Apiaceae) une plante de la médecine traditionnelle chinoise [39].

En somme, le criblage phytochimique réalisé au niveau des feuilles et racines de *N. latifolia* Sm. montre la présence d'alkaloïdes, des composés polyphénoliques, des saponosides et des composés glycosides. Ces résultats corroborent ceux mentionnés par d'autres chercheurs [40].

Le *N. latifolia* Sm. de par la présence de ses nombreuses familles chimiques révèle des activités pharmacologiques potentielles. Cette plante constitue donc une cible de choix pour enrichir la production de médicaments traditionnels améliorés (MTA).

Les alcaloïdes étant des molécules possédant des propriétés biologiques très intéressantes, comme nous l'avons vu précédemment, nous nous sommes consacrés à leur extraction à partir des différents organes récoltés dans le but d'évaluer leur activité anticancéreuse et antalgique. En effet, les alcaloïdes possèdent plusieurs applications pharmaceutiques chez l'être humain, ces applications ont été prouvées cliniquement [41-44].

CHAPITRE 3 : Méthodes d'extraction des alcaloïdes et dérivés alcaloïdiques.

1. Extraction des alcaloïdes

1.1. Matériel et méthodes : Extraction par un solvant en milieu alcalin

➤ Première Etape

Le matériel végétal finement pulvérisé est délipidé par macération dans le cyclohexane à la température ambiante durant 24H. Il est ensuite alcalinisé pendant 48H par une solution d'ammoniaque concentrée puis du méthanol est ajouté pour extraire les alcaloïdes. La solution est filtrée sous vide et lavée avec de l'eau. Le filtrat est ensuite partiellement concentré sous pression réduite. Cette opération permet de déplacer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines ; les bases ainsi libérées sont ensuite solubilisées dans un solvant organique comme le dichlorométhane ou le chloroforme.

Tableau 15 : Quantité des différents organes et volume de solvants utilisés par site pour la 1ere étape.

Sites	Poids du matériel végétal			Volume cyclohexane			Volume NH ₄ OH			Volume MeOH		
	F	E	R	F	E	R	F	E	R	F	E	R
Ka	256g	163g	28g	700ml	600ml	200ml	200ml	200ml	35ml	700ml	600ml	150ml
Ko	37g	212g	105g	150ml	1l	600ml	40ml	300ml	200ml	120ml	1,2l	600ml
Lf	456g	42g	26g	1,5l	200ml	200ml	500ml	100ml	35ml	1,5ml	200ml	150ml
Ls	208g	69g	22g	600ml	300ml	150ml	200ml	60ml	30ml	600ml	200ml	100ml
Ki	893g			2l			1l			2,5l		

➤ Deuxième Etape

Le solvant organique (phase chlorée) contenant les "alcaloïdes bases" est séparé du marc (phase non organique) et, concentré partiellement par distillation sous pression réduite. La phase organique est agitée avec une solution aqueuse acidifiée (fortement diluée à 5%) : les alcaloïdes se solubilisent dans la phase aqueuse sous forme de sels tandis que les impuretés neutres restent dans la phase organique.

Il est indispensable d'épuiser la phase organique par l'eau acidifiée, c'est-à-dire que l'opération est répétée autant de fois qu'il est nécessaire jusqu'à ce que la phase organique n'en contienne plus d'alcaloïdes (test de Mayer).

Les acides utilisés dans ce cas sont variables, mais toujours employés en solutions très diluées de 1 à 5 %: acides chlorhydrique, sulfurique, sulfamique, tartrique. Dans notre cas, nous avons utilisé de l'acide chlorhydrique.

Tableau 16 : Volume de solvants par organe et par site nécessaire pour la 2^e étape.

Sites	Volume CH ₂ Cl ₂			Volume HCl 5%		
	Feuilles	Ecorces	Racines	Feuilles	Ecorces	Racines
Kanadjiguila	3 l	2 l	1 l	400 ml	400 ml	150 ml
Koulouba	800 ml	2,5 l	2,5 l	200 ml	400 ml	300 ml
Lafiabougou	5 l	1,5 l	1 l	400 ml	200 ml	150 ml
Lassa	3 l	1,5 l	800 ml	400 ml	200 ml	200 ml
Kita	5 l			400 ml		

➤ Troisième Etape

Les solutions aqueuses de sels d'alcaloïdes sont alcalinisées par une base (hydroxyde de sodium) en présence d'un solvant organique chloré non miscible à l'eau.

L'apparition d'une émulsion peut être palliée par le lavage de la phase aqueuse avec un solvant apolaire comme l'hexane.

Les alcaloïdes bases précipitent et se dissolvent dans la phase organique. Reprendre la même opération jusqu'à épuiser la phase aqueuse en faisant repasser tous les alcaloïdes en phase organique. L'épuisement de la phase aqueuse en alcaloïde est vérifié par un test de Mayer.

Tableau 17 : Volume de solvants par organe et par site nécessaire pour la 3^e étape.

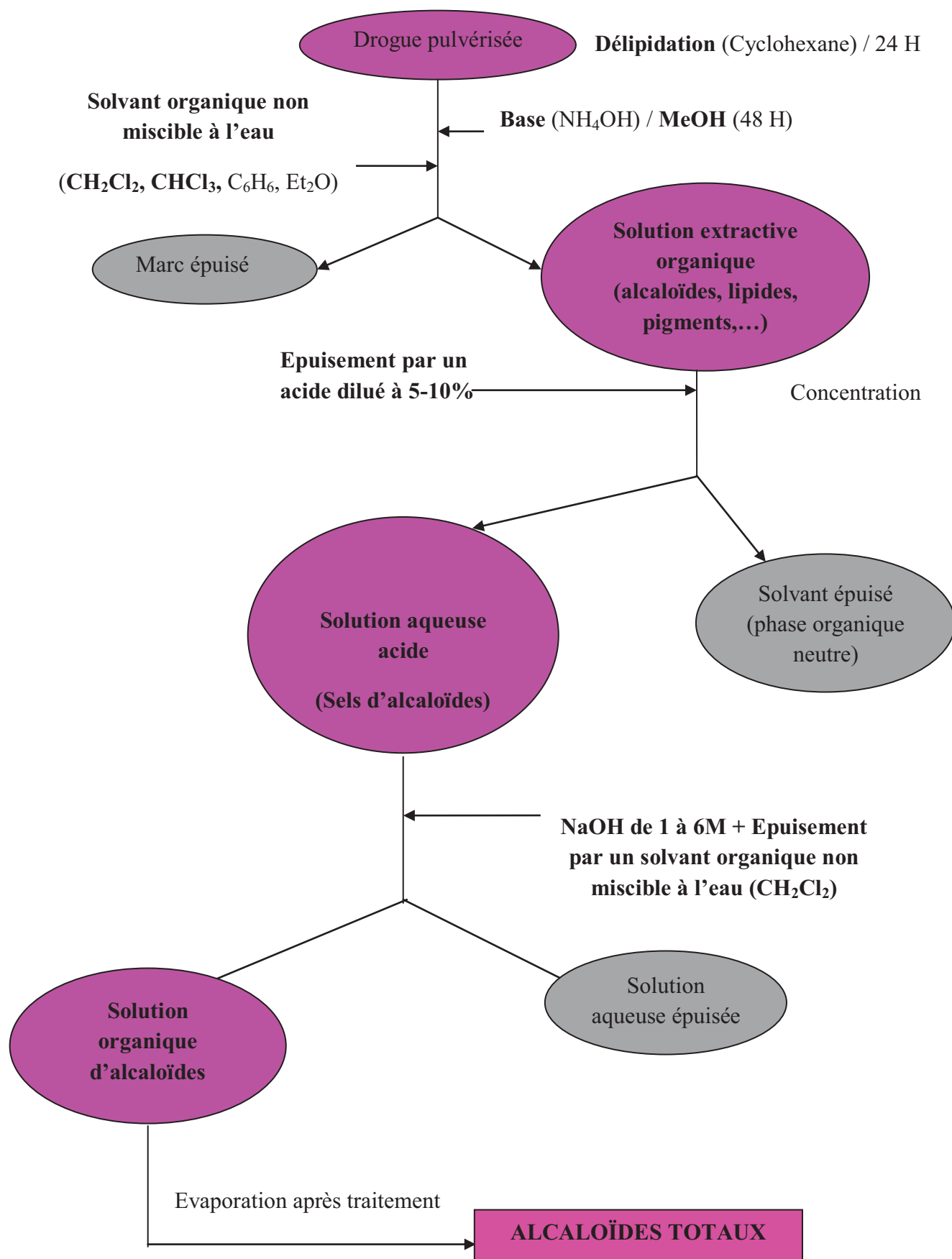
Sites	Volume CH ₂ Cl ₂			Volume NaOH à 1 à 5 M		
	Feuilles	Ecorces	Racines	Feuilles	Ecorces	Racines
Kanadjiguila	500 ml	500 ml	300 ml	500 ml	500 ml	700 ml
Koulouba	250 ml	500 ml	300 ml	850 ml	500 ml	1600 ml
Lafiabougou	500 ml	300 ml	250 ml	500 ml	1000 ml	700 ml
Lassa	500 ml	500 ml	200 ml	500 ml	1000 ml	800 ml
Kita	500 ml			500 ml		

➤ Quatrième Etape

Le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est décanté, séchée par du sulfate de magnésium et évaporé sous pression réduite. Le résidu sec obtenu est la somme des alcaloïdes totaux (AT).

1.2. Isolement des alcaloïdes

Quelle que soit la méthode choisie pour extraire les alcaloïdes, ce ne sont pas des produits purs qui sont obtenus mais plutôt des alcaloïdes totaux (AT), mélanges complexes de bases qu'il est nécessaire de séparer. Dans le meilleur des cas, l'un des alcaloïdes est majoritaire et peut être obtenu par cristallisation directe : on peut citer l'exemple de la quinine qui se cristallise sous forme de sulfate basique par simple neutralisation des liqueurs acides d'extraction par du carbonate de sodium jusqu'à l'obtention d'un milieu dont le pH avoisine 6. Dans certaines situations, les divers alcaloïdes du mélange ont des basicités différentes ce qui permet d'envisager des réextractions par une phase non miscible et ce à des pH variables. Dans de très nombreuses circonstances il est obligatoire de recourir aux méthodes classiques de résolution d'un mélange complexe, en particulier aux techniques de séparation chromatographiques (sur colonne de gel de silice, sur alumine, sur résines échangeuses d'ions,...).



Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin

1.3. Résultats d'extraction des alcaloïdes

Avant l'extraction des alcaloïdes, un criblage phytochimique est nécessaire pour vérifier la présence de ceux-ci dans les organes récoltés (voir Chapitre 2).

Qualitativement au vu des résultats, le criblage phytochimique nous révèle la présence des alcaloïdes dans les 3 organes de *N. latifolia* Sm. (feuilles, écorces et racines). Cependant, les tests révèlent une très faible présence dans certains organes comme les feuilles du site de Koulouba ou les écorces du site de Lassa. Compte tenu des résultats globalement positifs des tests, nous avons réalisé les extractions sur tous les organes récoltés.

Le tableau 18 récapitule les masses obtenues lors de ces extractions et les rendements en alcaloïdes totaux.

SITES	Feuilles		Ecorces		Racines	
	Matériel végétal	A.T	Matériel végétal	A.T	Matériel végétal	A.T
Kanadjiguila	256 g	1,0 g 0,41%	163 g	80 mg 0,05%	28 g	91 mg 0,32%
Koulouba	37 g	12 mg 0,03%	212 g	13 mg 0,006%	105 g	280 mg 0,26%
Lafiabougou	456 g	0,9 g 0,19%	42 g	39 mg 0,09%	26 g	42,5 mg 0,16%
Lassa	208 g	1,36 g 0,65%	69 g	22 mg 0,03%	22 g	11,25 mg 0,05%
Kita	893 g	1,8 g 0,20%				

La présence d'alcaloïdes après extraction au niveau des feuilles est bien visible dans tous les sites à l'exception de Koulouba où le rendement est très faible. Les sites de Kanadjiguila et de Kita présentent des rendements intéressants au niveau des feuilles. Par contre, le bon rendement observé pour le site de Lassa est dû en grande partie aux graisses accumulées suite à une mauvaise opération au cours de l'étape de délipidation. Or, l'âge jeune de la plante pourrait intervenir au cours de ce processus et explique que la plante n'a pas encore fini d'élaborer les étapes importantes de son métabolisme secondaire. A Koulouba, le site est plus exposé à la pollution cela peut expliquer aussi la présence moindre des alcaloïdes au niveau des feuilles. La présence des alcaloïdes dans les écorces est beaucoup plus marquée dans le site de Kanadjiguila, elle est moyenne à Lafiabougou et très

douteuse à Lassa ainsi qu'à Koulouba. Toute fois, les racines en contiennent plus que les écorces de la plante sur tous les sites de récoltes.

Notre approche repose sur un fractionnement "bio-guidé". Il conviendrait donc en premier lieu de réaliser les tests anticancéreux et antalgiques sur les extraits bruts afin de nous intéresser à ceux montrant une activité réelle.

Cependant, pour des contraintes de temps (durée de séjours en France) et techniques (disponibilité des tests) nous avons souhaité anticiper et réaliser les premiers fractionnements à partir des extraits bruts de feuilles, disponibles en quantité suffisante.

2. Fractionnements

Il s'agit d'appliquer les techniques de séparation chromatographiques en utilisant soit une colonne sur gel de silice classique soit par méthode flash automatisée. Dans les 2 cas, le principe est le même, il permet de réaliser une méthode physique de séparation de l'échantillon basé sur sa polarité. Nous avons mis en application les 2 méthodes.

➤ Séparation des extraits bruts d'alcaloïdes totaux des feuilles

Pour cette étude, nous nous sommes limités à la séparation des extraits d'alcaloïdes totaux issus uniquement des feuilles. Nous avons réalisé une série de séparation grossière des composés en fonction de leur polarité un gradient de polarité croissant. Nous avons choisi comme mode d'élution cyclohexane / acétate d'éthyle / méthanol en variant à chaque fois la polarité du solvant. Nous commençons toujours par l'éluant le moins polaire (cyclohexane / acétate d'éthyle) en augmentant au fur et à mesure le gradient et nous terminons par le plus polaire (méthanol). Les différentes fractions obtenues sont suivies par la méthode CCM et par rayonnement UV ($\lambda=254$ nm) ensuite révélées à l'aide de l'acide phosphomolybdique et/ou le para-anisaldéhyde.

Pour chaque site, un dépôt de l'extrait brut d'alcaloïdes totaux est effectué sur la colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck).

2.1. Séparation des alcaloïdes totaux issus des feuilles de *N. latifolia* Sm. du site de Kanadjiguila par chromatographie sur colonne

Nous avons procédé à un fractionnement de 435 mg d'extrait brut en utilisant une chromatographie sur colonne "classique". Les résultats sont représentés dans le tableau suivant (tableau 19).

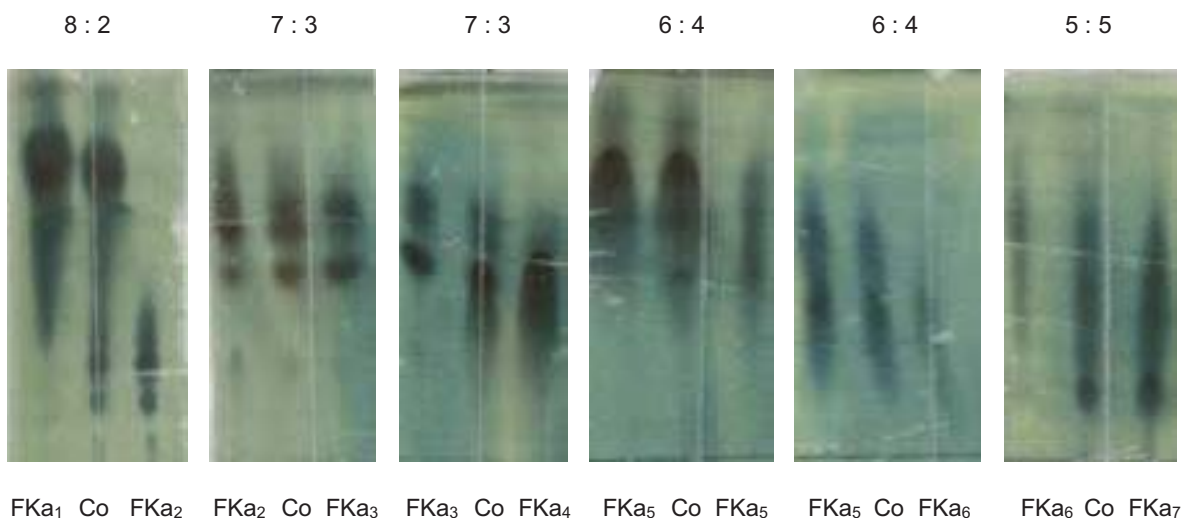
Un gradient de polarité nous a permis d'isoler 12 fractions de polarité croissante représentant un total de 433 mg.

Tableau 19: Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles du site de Kanadjiguila

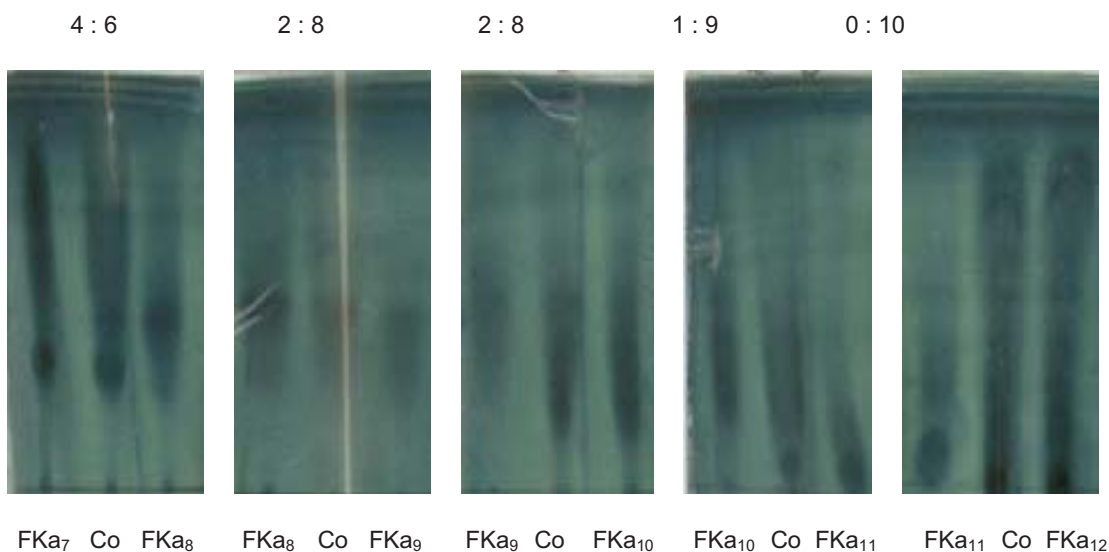
Fractions	Eluant	Aspect	Masse
FKa ₁	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Huileux	37,4 mg
FKa ₂	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	8,4 mg
FKa ₃	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	12,3 mg
FKa ₄	Cyclo : AcOEt 90 : 10 80 : 20	Solide	90,3 mg
FKa ₅	Cyclo : AcOEt 80 : 20	Solide	22,5 mg
FKa ₆	Cyclo : AcOEt 80 : 20 70 : 30	Solide	13 mg
FKa ₇	Cyclo : AcOEt 70 : 30 60 : 40	Solide	38 mg
FKa ₈	Cyclo : AcOEt 60 : 40 50 : 50	Solide	23,1 mg
FKa ₉	Cyclo : AcOEt 50 : 50 40 : 60	Solide	13,1 mg
FKa ₁₀	Cyclo : AcOEt 40 : 60 30 : 70	Solide	12,1 mg
FKa ₁₁	Cyclo : AcOEt 30 : 70 20 : 80	Solide	12,2 mg
FKa ₁₂	Cyclo : AcOEt : MeOH 20 : 80 10 : 90 0 : 100 90 : 10 ... 0 : 100	Solide	150,9 mg

L'analyse CCM de chacun de ces fractions révèle que toutes sont constituées de plusieurs composés.

Cyclo : AcOEt



Cyclo: AcOEt



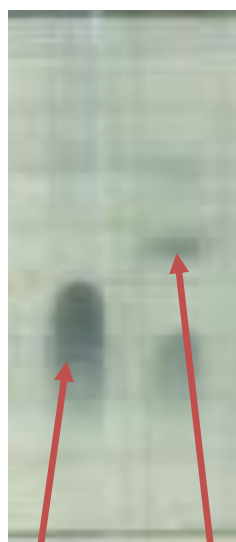
Remarque : Co = Co-spot ; révélateur : acide phosphomolybdique ; $\lambda=254$ nm

Les fractions FKa₁ (produit huileux), FKa₄ (solide jaune-pâle) et FKa₁₁ (solide jaune-pâle) sont injectées en GC / MS pour identifier les composés présents. Les résultats montrent qu'en réalité ces fractions renferment plusieurs produits et sont constituées en majorité des esters d'acides gras. Leur formation pourrait provenir d'une mauvaise séparation lors du traitement du matériel végétal avec le cyclohexane. La présence d'acides gras résiduels donnerait alors les esters correspondants au cours des différents traitements chimiques.

La fraction FKa₄ subira à son tour un fractionnement chromatographique.

❖ Fractionnement de FK_{a4} par chromatographie sur colonne

La fraction FK_{a4} de masse 90,3 mg est séparée par chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant cyclohexane : acétate d'éthyle dans le rapport 90 : 10. Aussitôt les premières taches apparaissent puis le produit se dégrade progressivement en contact avec la silice. Ces taches donneront lieu à **un produit pur noté FK_{a4} A de masse 34,7 mg** sous l'aspect des « **cristaux jaune-pâle** » dont la détermination de structure est actuellement en cours (voir spectres annexe 4).



Eluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 9/1

Révélateur : acide phosphomolybdique

$\lambda=254$ nm

FK_{a4}A

Dégradation

Plaque CCM illustrant le produit A isolé et la dégradation du reste de produit.

2.2. Séparation des alcaloïdes totaux issus des feuilles de *N. latifolia* Sm. du site de Kita par chromatographie sur colonne

755 mg d'extrait brut ont été séparés par chromatographie "classique" pour conduire à un total de 735 mg soit l'obtention de 19 fractions notées FK_{i1} à FK_{i26} de polarité croissante.

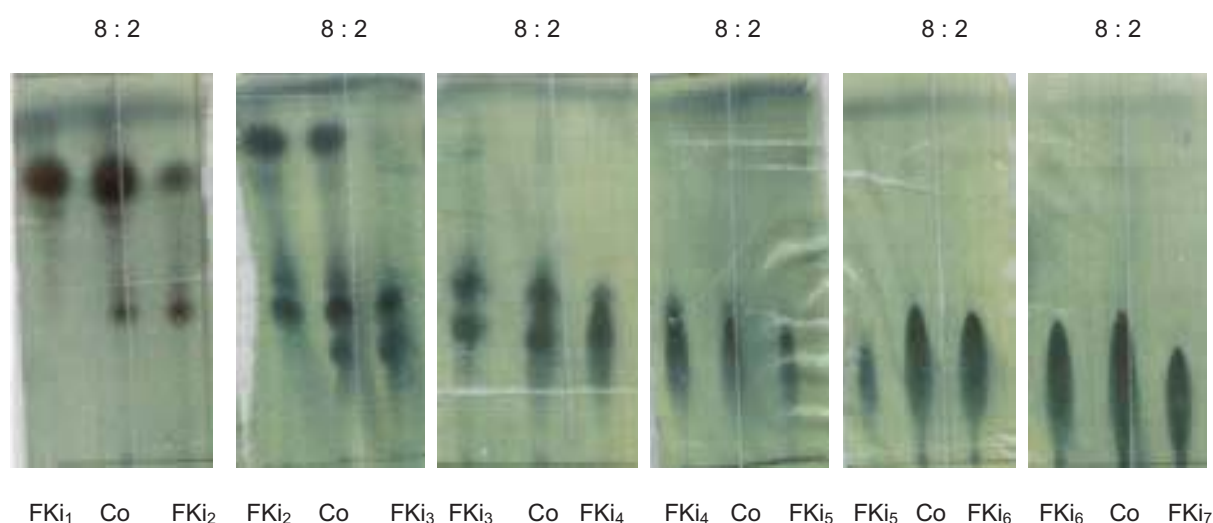
Mis à part la fraction FK_{i1} qui donne l'aspect huileux, toutes les autres se présentent sous forme solide. Cette fois encore, toutes ces fractions présentent un mélange de composés.

Tableau 20 : Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles du site de Kita

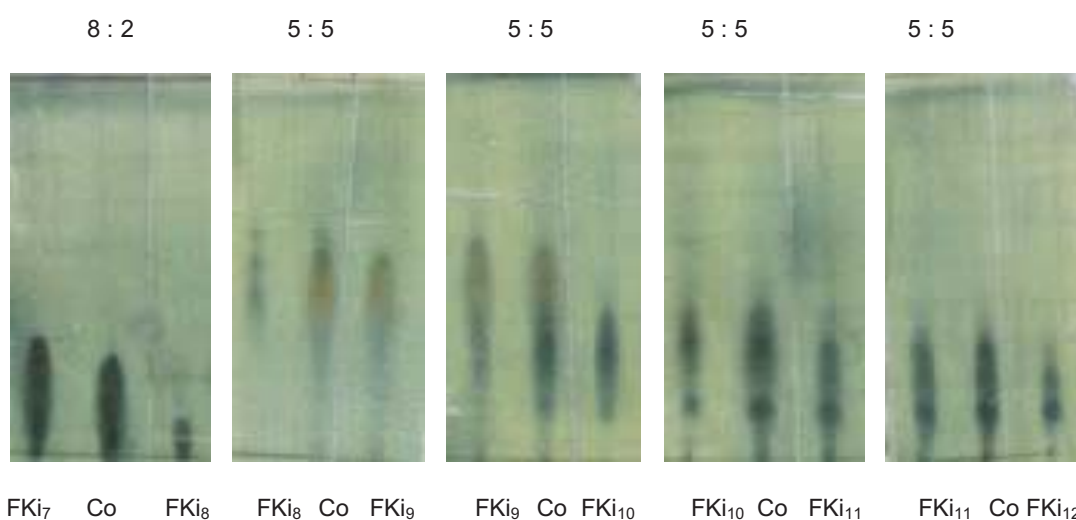
Fractions	Eluant	Aspect	Masse
FKi ₁	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Huileux	70,5 mg
FKi ₂	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	24,2 mg
FKi ₃	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	26,3 mg
FKi ₄₋₇	Cyclo : AcOEt 90 : 10 80 : 20 70 : 30	Solide	144,7 mg
FKi ₈	Cyclo : AcOEt 70 : 30	Solide	10 mg
FKi ₉	Cyclo : AcOEt 70 : 30	Solide	60,8 mg
FKi ₁₀	Cyclo : AcOEt 70 : 30 60 : 40	Solide	10,2 mg
FKi ₁₁	Cyclo : AcOEt 60 : 40	Solide	14,5 mg
FKi ₁₂	Cyclo : AcOEt 60 : 40 50 : 50	Solide	12,2 mg
FKi ₁₃₋₁₆	Cyclo : AcOEt 50 : 50 40 : 60 30 : 70 20 : 80	Solide	94,8 mg
FKi ₁₇	Cyclo : AcOEt 10 : 90	Solide	12,3 mg
FKi ₁₈	Cyclo : AcOEt 0 : 100	Solide	5 mg
FKi ₁₉	AcOEt : MeOH 100 : 0 95 : 5	Solide	4,8 mg
FKi ₂₀₋₂₁	AcOEt : MeOH 95 : 5 90 : 10	Solide	149,5 mg
FKi ₂₂	AcOEt : MeOH 80 : 20	Solide	19,1 mg
FKi ₂₃	AcOEt : MeOH 80 : 20 70 : 30	Solide	22,1 mg
FKi ₂₄	AcOEt : MeOH 70 : 30 60 : 40	Solide	18,8 mg
FKi ₂₅	AcOEt : MeOH 40 : 60 50 : 50	Solide	26,7 mg
FKi ₂₆	AcOEt : MeOH 50 : 50 ... 0 : 100	Solide	7,6 mg

Les fractions présentant apparemment une seule tache en CCM, FK_{i1}, 3, 4- 7, 8, 10, 13-16 et 20-21 ont été injectées en GC / MS pour identifier les composés. Ces fractions de composés peu polaire sont en majorité des esters d'acides gras. Leur présence pourrait s'expliquer par le même phénomène que dans le cas des extraits bruts des feuilles de Kanadjiguila. Le problème lié à la délipidation nous conduit à élaborer d'autres solutions, soit en effectuant une série de lavages au cyclohexane soit à procéder à l'extraction au Soxhlet.

Cyclo : AcOEt



Cyclo : AcOEt



Remarque: Co = Co-spot ; révélateur : acide phosphomolybdique ; $\lambda=254$ nm

Cyclo : AcOEt

5 : 5

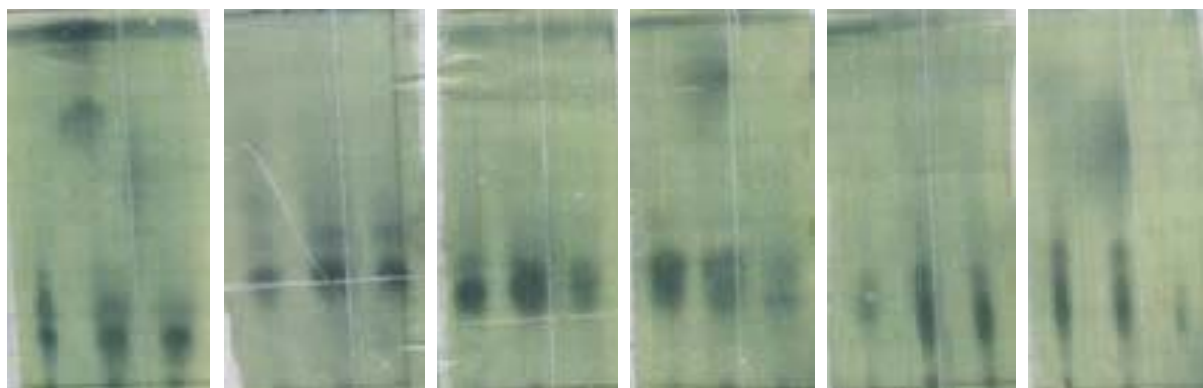
7 : 3

7 : 3

7 : 3

7 : 3

7 : 3



FKi₁₂ Co FKi₁₃

FKi₁₃ Co FKi₁₄

FKi₁₄ Co FKi₁₅

FKi₁₅ Co FKi₁₆

FKi₁₆ Co FKi₁₇

FKi₁₇ Co FKi₁₈

Cyclo : AcOEt

AcOEt : MeOH

7 : 3

0 : 10

8 : 2



FKi₁₈ Co FKi₁₉

FKi₁₉ Co FKi₂₀

FKi₂₀ FKi₂₁

FKi₂₁ FKi₂₂

FKi₂₂ FKi₂₃

FKi₂₃ FKi₂₄

Remarque: Co = Co-spot ; révélateur : acide phosphomolybdique ; $\lambda=254$ nm

L'analyse de ces plaques CCM nous a conduit à rassembler les fractions FKi₄ à FKi₇, notée FKi₄₋₇ et à la repurifiée.

De même, la fraction Fki₉ subira à nouveau une séparation chromatographique.

❖ Fractionnement de FKi₄₋₇ par chromatographie sur colonne

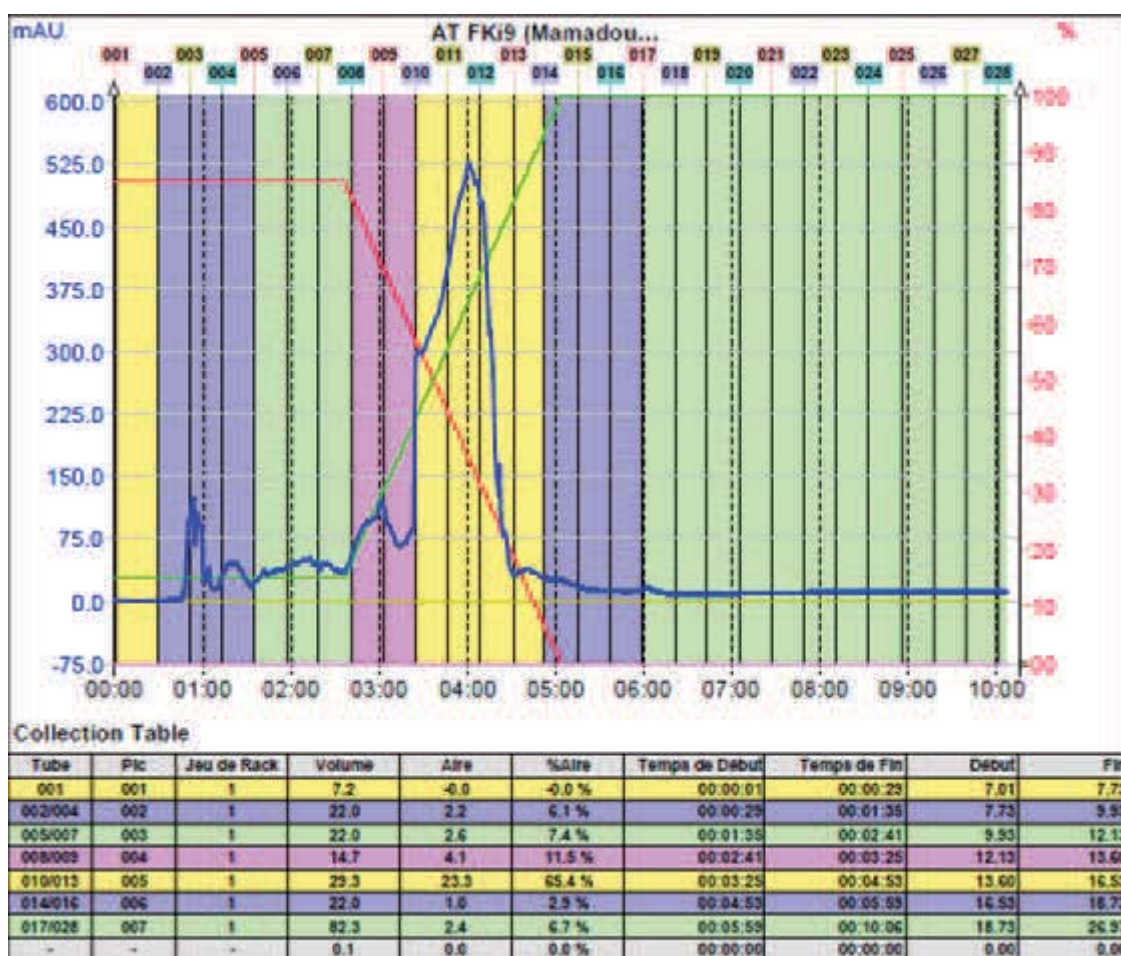
La fraction FKi₄₋₇ est purifiée par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'élution croissant. Si les CCM de contrôle font apparaître assez rapidement les

premiers composés, nous avons observé une dégradation progressive du produit sur colonne de silice. Le rapport massique montre une perte de 22 mg de produit.

Sur 144 mg de produit initial, on récolte 122 mg au final avec 2 fractions **FKi₄₋₇ A** (pure) et FKi₄₋₇ B (issue de la dégradation donc, impure). Le produit FKi₄₋₇ A a été isolé (46 mg) et des analyses CCM et RMN ont prouvé sa similitude avec le composé FKa₄ A isolé précédemment. L'analyse structurale est actuellement en cours.

❖ Fractionnement de FKi₉ par chromatographie flash

La fraction FKi₉ de masse 60,8 mg est séparée par la chromatographie flash avec l'éluant cyclohexane : acétate d'éthyle dans le rapport 50 : 50. On récolte 5 sous-fractions de FKi₉ : FKi₉A (13 mg), FKi₉B (4,6 mg), FKi₉C (1 mg), FKi₉D (13,2 mg), FKi₉E (4,1 mg). A l'issue de la séparation on récupère 35,9 mg. Soit une perte de 24,9 mg. Aucune de ces fractions n'apparaît pure, donc une série de fractionnements est envisagée. La FKi₉D présente un profil CCM intéressant avec, semble-t-il, un composé majoritaire. C'est pourquoi, cette fraction étant en quantité suffisante, elle a été repurifiée.

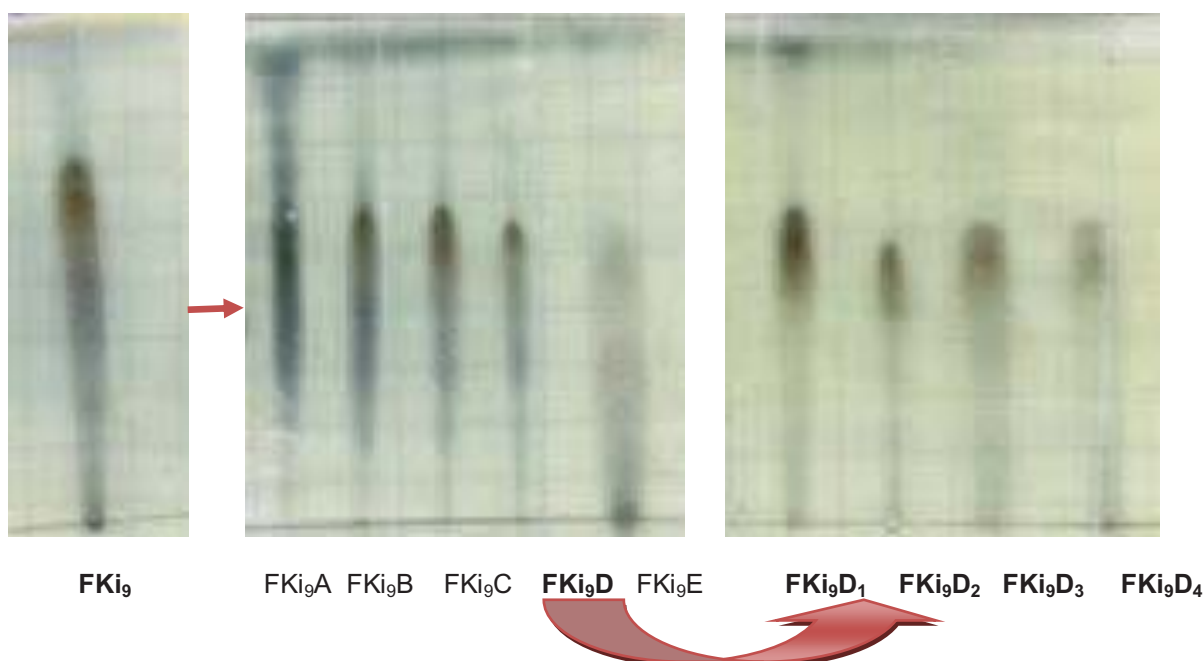


Elution Steps				
N°	Temps	Débit	%A	%B
01	00 s	6.7	85	15
02	20 s	20.0	85	15
03	02:36	20.0	85	15
04	05:06	20.0	00	100
05	10:06	20.0	00	100

Detection Steps			
N°	Temps	LI (nm)	FI
01	00 s	254	1

Collection Steps						
N°	Temps	Niveau	Local	Volume	Mode	Action
01	00 s	0	Non	7.4	Tout	Aucune

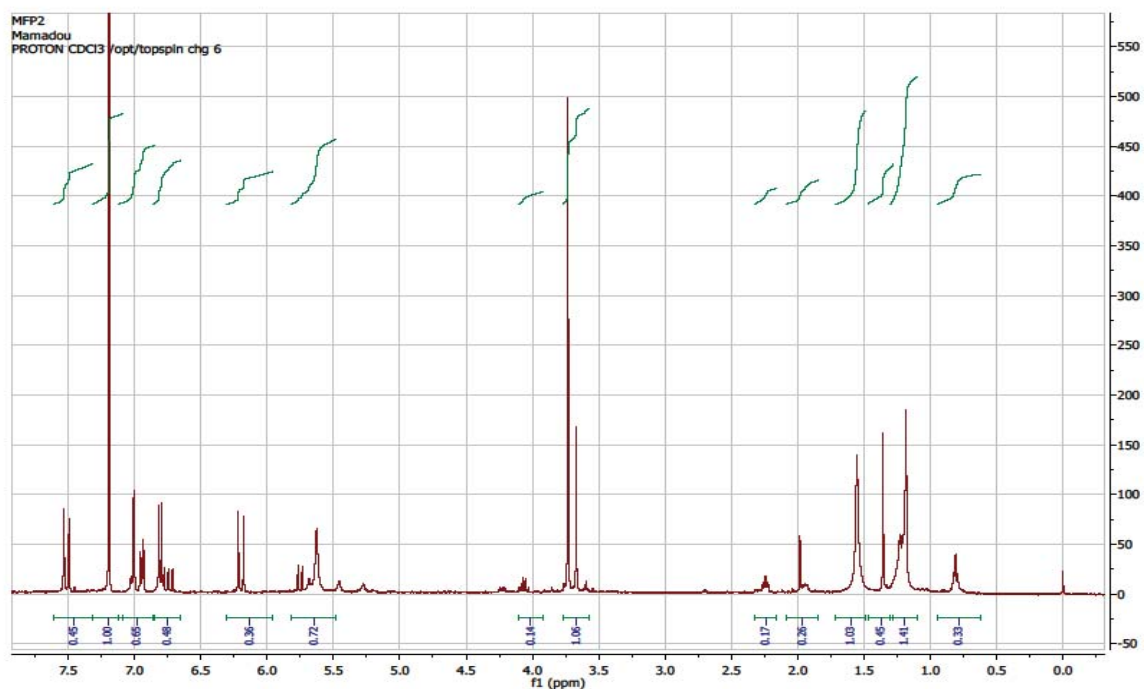
Résultats obtenus par l'appareil de chromatographie flash à la suite du fractionnement de la fraction FK₉.



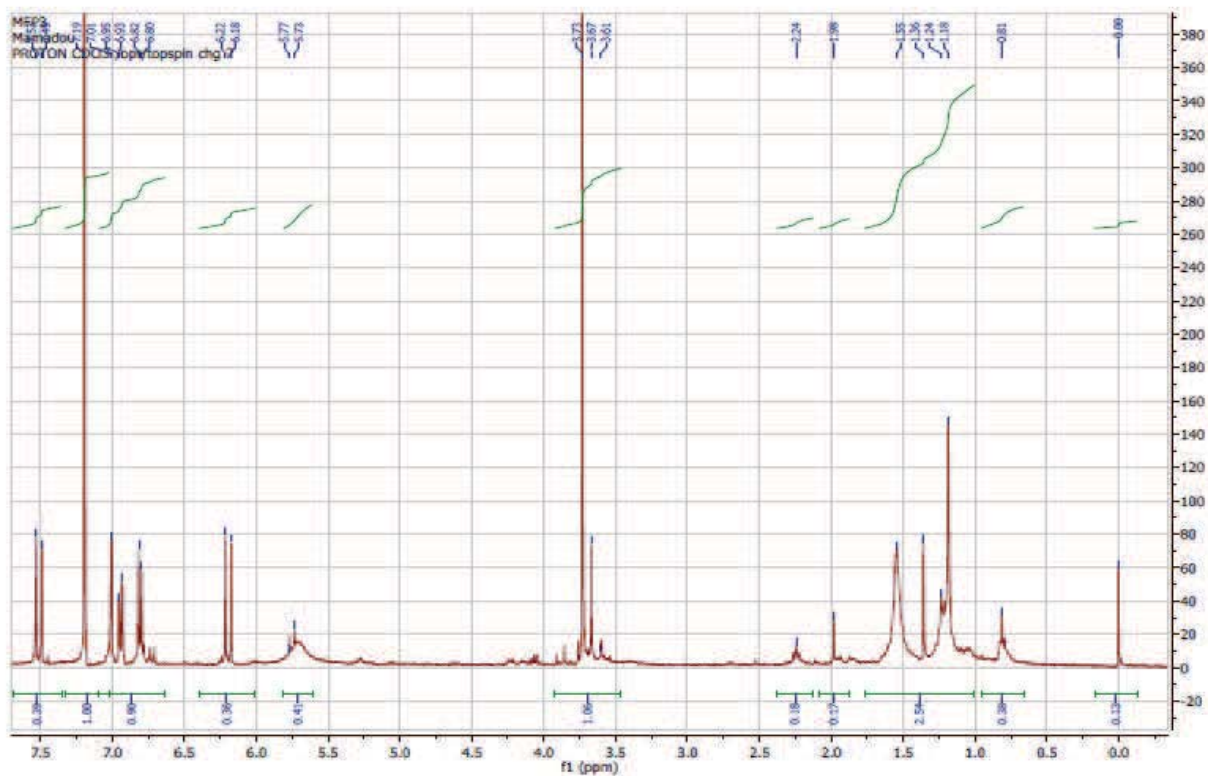
Remarque : révélateur : acide phosphomolybdique ; $\lambda=254$ nm

✓ Fractionnement de FK₉ D par chromatographie sur colonne

La sous-fraction FK₉D a un aspect solide jaune-pâle, la séparation a lieu par chromatographie sur colonne avec un éluant cyclohexane : acétate d'éthyle de proportion égale 50 : 50. Le fractionnement conduit à quatre autres sous-fractions notées respectivement de FK₉D₁ à FK₉D₄ (FK₉D₁= 5mg, FK₉D₂=2mg, FK₉D₃=4,4 mg et FK₉D₄=0,1 mg). Nous avons réalisé les spectres RMN ¹H des fractions FK₉D₁ et FK₉D₂. Ces spectres offrent des similitudes, avec la présence probable des dérivés aromatiques. Des analyses complémentaires sont en cours afin de déterminer la structure de ces composés.



Spectre 1 : RMN ^1H du produit FK₉D₁



Spectre 2 : RMN ^1H du produit FK₉D₂

2.3. Séparation des alcaloïdes totaux issus des feuilles de *N. latifolia* Sm. du site de Lassa par chromatographie sur gel de silice

Tout comme les sites de Kita et Kanadjiguila, les extraits bruts d'alcaloïdes totaux issus des feuilles de Lassa sont aussi séparés sur colonne de silice avec des éluants à polarité croissante. Nous avons engagé 500 mg pour réaliser cette séparation. Nous avons récolté 492,7 mg en 10 fractions notées de FLs₁ à FLs₁₀.

Tableau 21: Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles du site de Lassa

Fractions	Eluant	Aspect	Masse
FLs ₁	Cyclo : AcOEt 100 : 0 95 : 5 90 : 10	Huileux	87,1 mg
FLs ₂	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	2,85 mg
FLs ₃	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	6,8 mg
FLs ₄	Cyclo : AcOEt 90 : 10 80 : 20	Solide	38,3 mg
FLs ₅	Cyclo : AcOEt 80 : 20	Solide	24,3 mg
FLs ₆	Cyclo : AcOEt 80 : 20	Solide	9,9 mg
FLs ₇	Cyclo : AcOEt 80 : 20 70 : 30	Solide	60,8 mg
FLs ₈	Cyclo : AcOEt 70 : 30 60 : 40 50 : 50 40 : 60 30 : 70 20 : 80 10 : 90	Solide	94,9 mg
FLs ₉	Cyclo : AcOEt : MeOH 10 : 90 0 : 100 90 : 10 70 : 30 60 : 40 50 : 50	Solide	14,5 mg
FLs ₁₀	MeOH 100%	Solide	153 mg

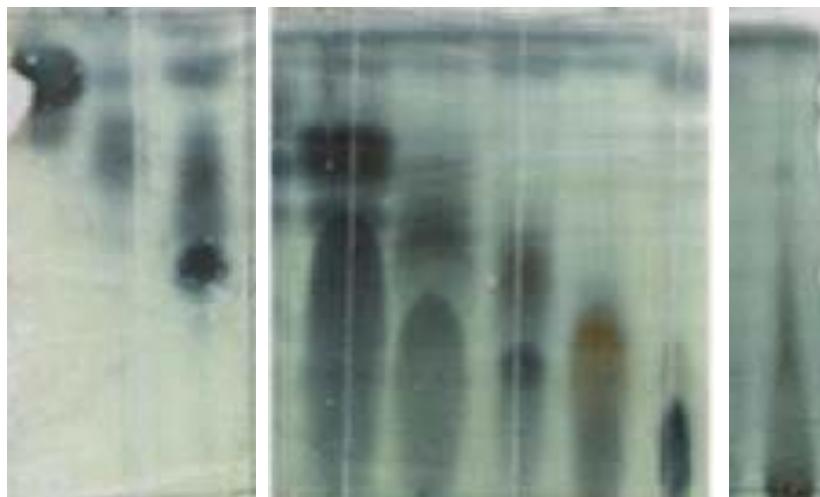
Aucune des fractions obtenues n'est pure. La fraction FLs₄ présentant semble-t-il un composé majoritaire sera soumise à une série de fractionnements.

Cyclo : AcOEt

8 : 2

7 : 3

1 : 9



FLs₁ FLs₂ FLs₃ FLs₄ FLs₅ FLs₆ FLs₇ FLs₈ FLs₉

❖ Fractionnement de FLs₄ par chromatographie flash

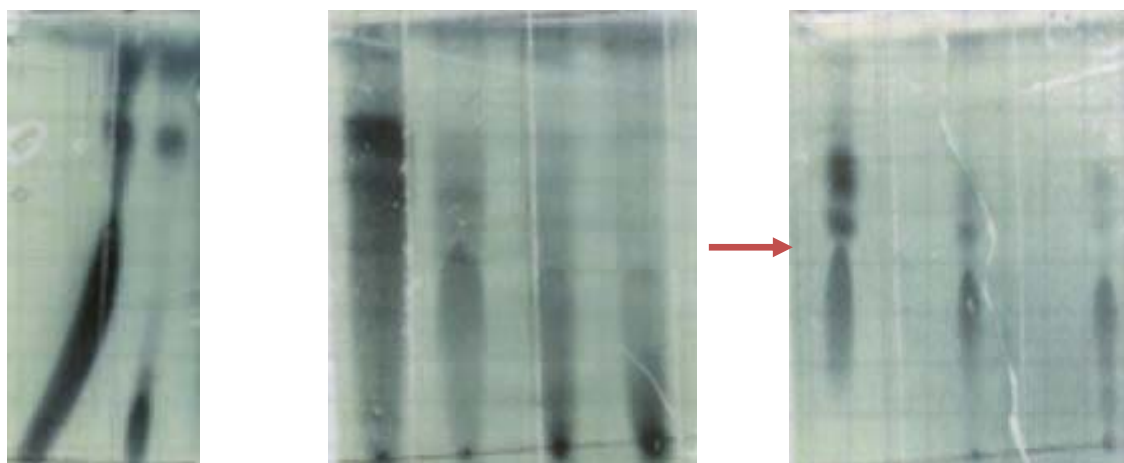
La fraction FLs₄ (38 mg) sera fractionnée à son tour par la chromatographie flash avec un éluant cyclohexane : acétate d'éthyle 70 : 30 pour obtenir 2 sous fractions A (31 mg) et B (1,3 mg). La sous fraction A sera à son tour fractionnée.

Cyclo : AcOEt

7 : 3

7 : 3

7 : 3



FLs₄A FLs₄B

FLs₄A₁ FLs₄A₂ FLs₄A₃ FLs₄A₄

FLs₄A₁₋₁ FLs₄A₁₋₂ FLs₄A₁₋₃

✓ Fractionnement de FLs₄A par chromatographie sur colonne

La sous fraction FLs₄A (31 mg) est fractionnée par la technique de chromatographie classique sur colonne de silice pour recueillir les produits FLs₄A₁ (18 mg) ; FLs₄A₂ (1 mg) ; FLs₄A₃ (3 mg) ; FLs₄A₄ (9 mg). Toutes ces fractions sont impures. FLs₄A₁ sera à nouveau purifiée.

▪ Fractionnement de FLs₄A₁

Le fractionnement de FLs₄A₁ (18 mg) donne lieu à 3 autres sous-fractions FLs₄A₁₋₁ ; FLs₄A₁₋₂ ; FLs₄A₁₋₃. La séparation à ce stade devient difficile compte tenu d'une faible différence de R_f entre les composés.

Des essais de purification par CCM préparative se sont révélés inefficaces.

2.4. Séparation des alcaloïdes totaux issus des feuilles de *N. latifolia* Sm. du site de Lafiabougou par chromatographie sur colonne

Pour cet extrait brut, nous avons engagé lors de la séparation 303 mg. Cependant, seuls 252 mg ont été obtenus repartis en 10 fractions. La perte de 50 mg d'extrait brut est probablement due à une dégradation partielle lors de la séparation (apparition de "trainée" lors du contrôle par CCM).

Tableau 22: Résultats de séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles du site de Lafiabougou

Fractions	Eluant	Aspect	Masse
FLf ₁	Cyclo : AcOEt 95 : 5 90 : 10	Huileux	40,3 mg
FLf ₂	Cyclo : AcOEt 90 : 10	Solide	5 mg
FLf ₃	Cyclo : AcOEt 90 : 10 80 : 10	Solide	4,1 mg
FLf ₄	Cyclo : AcOEt 80 : 20	Solide	26,1 mg
FLf ₅	Cyclo : AcOEt 80 : 20 70 : 30	Solide	13,4 mg
FLf ₆	Cyclo : AcOEt 60 : 40 50 : 50	Solide	20,6 mg
FLf ₇	Cyclo : AcOEt 50 : 50 40 : 60 30 : 70	Solide	10,8 mg
FLf ₈	Cyclo : AcOEt 20 : 80 10 : 90	Solide	28,5 mg
FLf ₉	Cyclo : AcOEt 10 : 90 0 : 100	Solide	6,1 mg
FLf ₁₀	AcOEt : MeOH 90 : 10 70 : 30 50 : 50 30 : 70 10 : 90 0 : 90	Solide	97,9 mg

La fraction FLf₄ sera à son tour fractionnée.

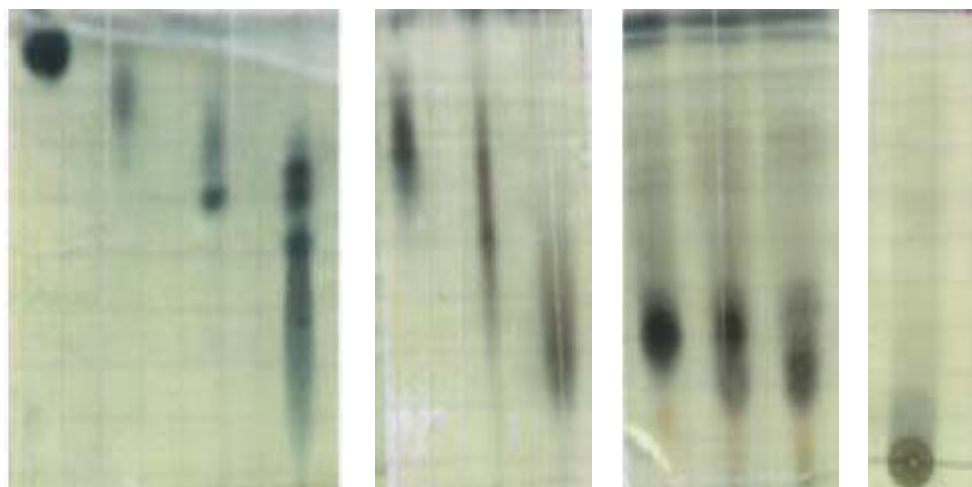
Cyclo: AcOEt

7: 3

5: 5

2: 8

0: 10



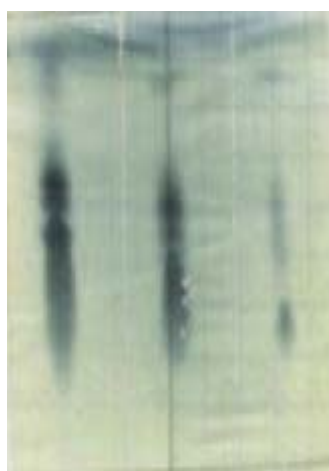
FLf₁ FLf₂ FLf₃ FLf₄ FLf₅ FLf₆ FLf₇ FLf₈ cospot FLf₉ FLf₁₀

❖ Fractionnement de FLf₄ par chromatographie sur colonne

La fraction FLf₄ de masse 26 mg sera fractionnée pour donner 3 sous fractions : FLf₄A (20 mg), FLf₄B (5 mg) et FLf₄C (1 mg). Une fois encore, le résultat ne permet pas d'obtenir un composé pur et des séparations par CCM préparatives devront être envisagées dans ce but.

Cyclo : AcOEt

7 : 3



FLf₄A FLf₄B FLf₄C

3. Conclusion

Les tests de caractérisation chimique que nous avons réalisés confirment les résultats de travaux antérieurs par d'autres chercheurs [45-46]. Nous avons constaté une certaine homogénéité quand à la présence de certaine famille chimique au niveau des feuilles, écorces et racines de *N. latifolia* Sm. en fonction des zones de récolte.

Ainsi, le *N. latifolia* sm., compte tenu des nombreuses familles chimiques qu'il renferme, se présente comme une plante médicinale pouvant intervenir dans la production d'un grand nombre de médicaments traditionnels améliorés aux activités pharmacologiques multiples.

Certaines de ses propriétés : antimalarique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antidiabétique, anti-œdémateuse, antalgique, antimicrobienne et hypertenseur ont été mises en évidence expérimentalement ou font l'objet des tests biologiques et justifient la place de *N. latifolia* sm. dans la pharmacopée d'Afrique sub-saharienne. Si plusieurs constituants chimiques de *N. latifolia* sm. ont été mis en évidence, isolés, et caractérisés, comme les alcaloïdes, nombre d'entre eux n'ont pas été identifiés à ce jour. Par ailleurs, les différentes recherches menées pour identifier les composés actifs potentiels de la plante pourront constituer un enthousiasme sans précédent dans le développement de la phytothérapie.

Les rendements obtenus lors de l'extraction des alcaloïdes sont relativement faibles en fonction des organes considérés. Les feuilles présentent le meilleur rendement (en moyenne 0,5%) alors que les écorces fournissent une faible quantité d'extrait brut (0,05%)

Il convient de noter que les extraits d'alcaloïdes totaux ne contiennent pas uniquement des alcaloïdes : ils peuvent en effet renfermer d'autres composés, tels que les esters acides gras, les stérols,...comme nous l'avons vu.

Nous avons réalisé le fractionnement des alcaloïdes totaux des feuilles de différents sites afin de tenter d'obtenir des composés purs et pour anticiper un fractionnement futur dépendant des tests d'activités biologiques réalisés sur les extraits bruts.

Ainsi, nous avons pu isoler un composé FK_{a4} A à partir des feuilles du site de Kanadjiguila. Il semblerait que ce composé soit de structure identique à celui que nous avons également isolé à partir des feuilles en provenance du site de Kita, FK_{i4-7} A. Deux autres composés extraits de ces mêmes feuilles du site de Kita ont été isolés : FK_{i9D1} et FK_{i9D2} et présentent des structures voisines, voire identiques.

Tous ces composés sont actuellement en cours d'étude afin de déterminer leur structure.

REFERENCES

- [1] Pousset J-L., Plantes Médicinales d'Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser ? Edisud., éd, **2004**, 284 p.
- [2] Formulaire Thérapeutique National, Edition **1998**, Mali.
- [3] Pousset J-L., Place des médicaments traditionnels en Afrique. Médecine Tropicale, **2006**, **66** : 606-609.
- [4] Dounias E., Rodrigue W et Petit C., Revue de la littérature ethnobotanique pour l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Ouest, *in* : Bulletin du Réseau Africain d'Ethnobotanique n°2 Unesco, **2000**, 5-117.
- [5] Cunningham A.B., African medicinal plants setting priorities at the interface between conservation and primary health care. People and plants, working paper n°1, Unesco, Paris, **1993**, 1-50.
- [6] Dalziel, JM. The useful plants of West Tropical Africa. **1957**. PP. 405.
- [7] Traoré-Keïta, F., Gasquet, M., Di Giorgio, C., Olivier, E., Delmas, F., Keïta, A., Doumbo, O., Balansard, G., Timon-David, P., Anti-malarial activity of four plants uses in traditional medicine in Mali. *Phytotherapy Research*, **2000**, **14**, 45-47.
- [8] Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. CIRAD, MNHN. Edition 2. **2002**.
- [9] Pousset J-L., Plantes médicinales. Paris : ACCT, Edition Marketing, **1989**.
- [10] Saulnier P., Plantes médicinales et soins en Afrique. Saint-Maur : Edition SEPIA, **1998**.
- [11] Pousset J-L., Touré P., Lo I., Cadoz M., Diop Mar I., Plantes médicinales Africaines XII. Mise au point d'un sirop antitussif et étude clinique préliminaire, *Med. Afr. Noire*, **1983**, **30(4)**, 191-192.
- [12] Malgras, D.R.P., Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. Edition KARTHALA et ACCT, **1992**, 478 p.
- [13] Hotellier F., Delaveau P., Pousset JL., Alcaloïdes et gluco-alcaloïdes des feuilles de *nauclea latifolia* Sm. Planta medica, *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol. **35**, **1979**, pp. 242-246.
- [14] Ogunlana, E.O., Ramstad, E., Investigation into the antibacterial activities of local plants. *Planta Medica*, **1975**, **27**, pp 354.

- [15] Madubunyi, I.I., Antihepatotoxic and trypanocidal activities of the ethanolic extract of *Nauclea latifolia* root bark. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, **1995**, **3**, 23-35.
- [16] Morah, F.N., Naucleal and epinaucleal from an antiviral preparation from *Nauclea latifolia*. *Global Journal of Pure and Applied Science*, **1995**, **1**, 59-62.
- [17] Benoit-Vical F., Valentin A., Cournac V., Péllisier Y., Mallié M., Bastide JM : In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *nauclea latifolia* Sm. (*Rubiaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, **1998**, **61**, 173-178.
- [18] Udoh, F.V., Lot, T.Y., Effects of the leaf and root extracts of *Nauclea latifolia* on cardiovascular system. *Fitoterapia*, **1998**, **LXIX**, 141-146.
- [19] Abreu, P.M., Martins. E.S., Kayser, O.O., Bindseil, K.U., Siems, K., Seeman, A., Frevert, J., Antimicrobial, antitumor antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine*, **1999**, **6**, 187-195.
- [20] Marshall, S.J., Russell, P.F., Philipson, J.D., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Weight, C.W., Antiplasmodial and antiamoebic activities of medicinal plants from Sierra-leone. *Prostate*, **2000**, **14**, 356-358.
- [21] Gamaniel, K., Wambebe, C., Amupitan, J., et al., Active column fractions of *Nauclea latifolia* on *Plasmodium berghei* and rabbitileum. *Journal of Pharmaceutical research and development*, **1997**, **2**, 44-47.
- [22] Abbah J., Amos S., Chindo B., et al. Pharmacological evidence favouring the use of *nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy : Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, **127**, 85-90.
- [23] Akubue, P.I., Mittal, G.C., Clinical evaluation of a traditional herbal practice in Nigeria: a preliminary report. *Journal of Ethnopharmacology*, **1982**, **6**, 355 359.
- [24] Elujoba, A.A., Female infertility in the hands of traditional birth attendants in South western Nigeria. *Fitoterapia*, **1995**, **66**, 239-248.
- [25] Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{eme} Edition Lavoisier, **2009**.
- [26] Sofowora, E.A., *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. John Wiley and Sons, Chichester, **1982**, pp.256.
- [27] Kaboré, Z.I. ; Guissou, I.P. ; Sourabie, S. Etude pharmaco-chimique de *Nauclea latifolia* Sm. (*Rubiaceae*). *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **1995**, pp 43-54.

- [28] Ntiejumokwu S, Kolawole JO., Antimicrobial and Preliminary phytochemical screening of the bark of *Nauclea latifolia*: *West Afr. J. Pharmacol. Drug Res.*, **1990**, **9**: 67-90.
- [29] Okwu DE, Josiah C., Evaluation of the chemical composition of two Nigerian Medicinal Plants. *Afr. J. Biotechnol.*, **2006**, **5(4)**: 357-361.
- [30] Aimé Ainin Somboro: Thèse de Doctorat Chimie Organique, Contribution à l'étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale malienne : *Guiera senegalensis* (Combretaceae). Cotutelle Université de Bamako Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (**2010**).
- [31] Andersen, Ø.M. et Markham, K.R. éds., *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*, CRC Press, Boca Raton (**2006**).
- [32] Wang, J. and Mazza, G., Effects of anthocyanins and other Phenolic compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ Activated RAW 264. 7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, **50**, 4183.
- [33] Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K., Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of Phytochemistry.*, **2006**, **67**: 2058.
- [34] Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishina D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential *Indian Journal of Pharmacology*, (**2001**), 33:2.
- [35] Harborne, J.B. et Williams, C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **2000**, **55**, 481-504.
- [36] Bouchet N., Lévesque J., Pousset J-L., HPLC isolation, identification and quantification of tannins from *Guiera senegalensis*. *Phytochem. Anal.*, **2000**, **11**, 52-56.
- [37] Aron, P.M. et Kennedy, J.A., Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, **52**, 79-104.
- [38] Benoit F., Valentin A., Pelissier Y., Diafouka F., Marion C., Koné-Bamba D., Koné M., Mallie M., Yapo A., Bastide J.M., In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in West Africa traditional medicine. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, **1996**, **54** (1), 67.
- [39] Ikegami, F., Sumino, M., Fujii, Y. et al., Pharmacology and toxicology of *Bupleurum* root-containing Kampo medicines in clinical use, *Hum. Exp. Toxicol.*, **2006**, **25**, 481-494.
- [40] Ngo Bum E., Taiwe G.S., Moto F.C.O., et al. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the root of *Nauclea latifolia* Smith in mice. *Epilepsy & Behavior* (**2009**), **15**, 434-440.

- [41] Mc Calley, D.V., Analysis of the cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Review Journal of Chromatography A*, **2002**, **967**, 1-19.
- [42] Lendvai B., Zelles T., Rozsa B., and Vizi ES., A vinca alkaloid enhances morphological dynamics of dendritic spines of neocortical layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*, **2003**, Vol. 59, N°4, pp. 257–260.
- [43] Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I, Warzecha, H., Stöckigt, D., High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*, **2002**, **967**, 85-113.
- [44] Silvestrini A., Pasqua G., Botta B., Monacelli B., Heijden R. van der, Verpoorte R. Effects of alkaloid precursor feeding on a *camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (**2002**) 749-753.
- [45] Y. Boily and L. Van Puyvelde. Screening of medicinal plants of Rwanda (Central Africa) for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 16 (**1986**) 1-3.
- [46] Okwu D.E. and Uchenna N.F., Exotic multifaceted medicinal plants of drugs and pharmaceutical industries. *Afri. Journ. Of Biotech.* **2009**, Vol. 8(25), pp 7271-7282.

TROISIEME PARTIE

ACTIVITES BIOLOGIQUES

PARTIE 3 : ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ALCALOÏDIQUES DE *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH.

Introduction

Ce chapitre est consacré aux activités anticancéreuses et antalgiques des alcaloïdes totaux obtenus précédemment à partir des différents organes récoltés sur les différents sites :

- Dans un premier temps, il s'agit de déterminer l'activité anticancéreuse par la mesure de l'activité antiproliférative des extraits d'alcaloïdes totaux élaborés à partir des différents organes de *N. latifolia* Sm. sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type MCF-7.

La lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 tire son nom du sigle « Michigan Cancer Foundation-7 » en référence à un institut américain basé à Detroit où la lignée fût établie pour la première fois en 1973 par Herbert SOULE et al [1-3]. Depuis l'hors, cette technique a pris de l'ampleur et est de plus en plus utilisée de par le monde dans les laboratoires de recherche en vue d'éradiquer le cancer du sein.

Le test antiprolifératif des extraits d'alcaloïdes totaux sur les MCF-7, permet de mesurer le potentiel réducteur des cellules tout en déterminant l'intensité de leur activité métabolique en présences d'une gamme de concentrations spécifique en alcaloïdes.

- Dans un second temps, de définir l'activité antalgique par l'évaluation de l'inhibition par les extraits d'alcaloïdes totaux de la douleur provoquée par l'acide acétique (diminution du nombre de crampes) chez la souris.

L'activité antalgique est mise en œuvre par le test de «KOSTER» qui consiste à la recherche éventuelle d'une méthode de protection vis-à-vis des crampes induites par l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 0,6% sur un lot de souris [4]. L'acide acétique administré chez la souris provoque une douleur ventrale aiguë (test de torsion) qui donne des crampes. L'évaluation de la diminution du nombre de crampes chez les souris permet d'explorer l'action antalgique périphérique des extraits d'alcaloïdes totaux testés.

1. ACTIVITE ANTICANCEREUSE

1.1. Généralités

Le sein et ses attributs

La fonction biologique du sein est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né.

Chaque sein contient une glande mammaire (elle-même composée de quinze à vingt compartiments séparés par du tissu graisseux) et du tissu de soutien qui contient des vaisseaux, des fibres et de la graisse.

Chacun des compartiments de la glande mammaire est constitué de lobules et de canaux. Le rôle des lobules est de produire le lait en période d'allaitement. Les canaux transportent le lait vers le mamelon.

Le sein joue 2 rôles majeurs :

- D'une part, il joue un grand rôle dans l'image que la femme a de son corps et de sa féminité.
- D'autre part, c'est l'organe de la lactation, c'est à dire produire du lait pour nourrir le nouveau-né.

Le sein est sous l'influence d'hormones sexuelles, fabriquées par les ovaires, de la puberté à la ménopause :

- Les œstrogènes favorisent le développement des seins au moment de la puberté. Ces hormones sont fabriquées au cours de la première partie du cycle menstruel.
- La progestérone est principalement présente lors de la seconde partie du cycle menstruel. Elle complète l'action des œstrogènes.

Par ailleurs, la sécrétion de lait (lactation) est sous l'influence de la prolactine, hormone fabriquée au niveau de l'hypophyse.

Le cancer du sein

Un cancer signifie la présence de cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée.

Le cancer se caractérise par un développement anarchique et interrompu de cellules « anormales » dans l'organisme qui aboutit à la formation d'une tumeur ou « grosseur ». Cette population de cellules agresse et détruit l'organe dans le quel elle est implantée et peut migrer dans d'autres parties du corps (on parle alors de

métastases). Si la prolifération n'est pas stoppée, le cancer se généralise plus ou moins rapidement.

La grande majorité des cancers du sein sont des « adénocarcinomes » qui se développent dans la glande mammaire, à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) ou des lobules (cancer lobulaire).

Types de cancers du sein

- Les cancers sont dits « infiltrants » lorsque les cellules cancéreuses franchissent la paroi des canaux ou des lobules. Le cancer canalaire infiltrant est la forme la plus fréquente tandis que le cancer lobulaire infiltrant est relativement plus rare. Les cancers infiltrants peuvent disséminer vers les ganglions (ganglions axillaires situés sous les aisselles) ou d'autres parties du corps, à l'origine de tumeurs secondaires ou métastases. Les organes les plus susceptibles d'être le siège de métastases d'un cancer du sein sont les os, les poumons, le foie et le cerveau.
- Les cancers sont dits « intracanaux » ou encore « in situ » si les cellules cancéreuses demeurent à l'intérieur des canaux. Ils sont le plus souvent découverts lors d'un examen de dépistage systématique par mammographie. Dans certains cas, ce cancer in situ peut être révélé par un écoulement de sang du mamelon ou un eczéma à ce niveau.

Epidémiologie

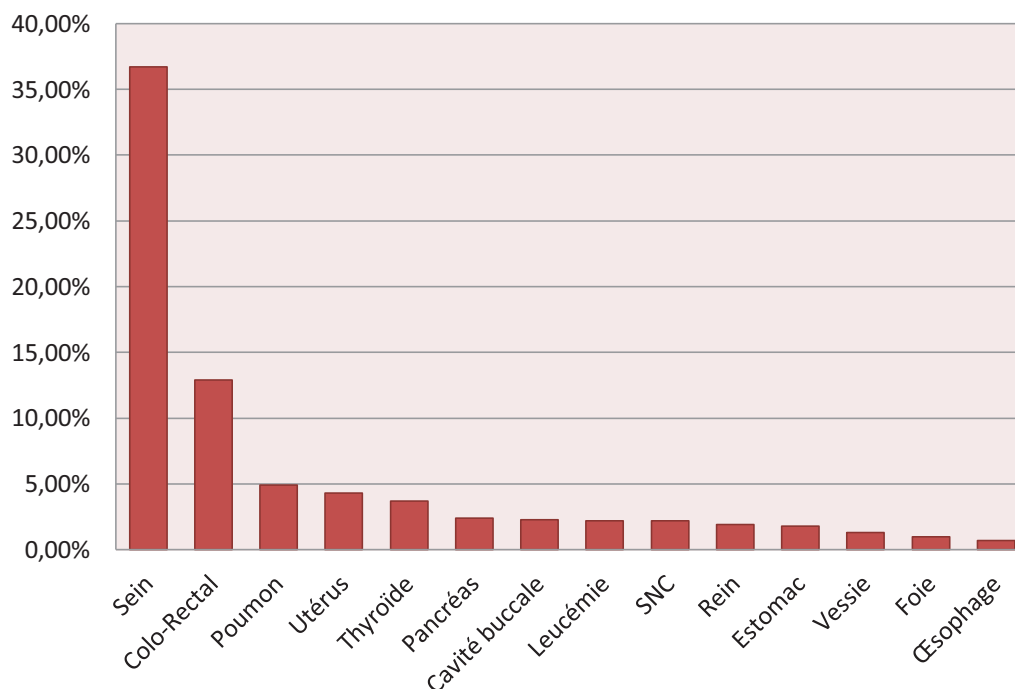
De nos jours, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. En France, le cancer est depuis 2004 la première cause de mortalité générale et prématurée (avant 65 ans) avant les maladies cardio-vasculaires. Chaque année, en France, 146.000 cas de décès sont imputables au cancer [5]. On estime à environ 320.000 (180.000 chez les hommes et 140.000 chez les femmes) nouveaux cas de cancer diagnostiqués [6-7]. Pour le cancer du sein, environ 42.000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. A terme, il est probable qu'une femme sur dix sera confrontée au cours de sa vie à cette maladie [8-9].

Un cancer du "sein" peut survenir chez l'homme, mais cette situation reste exceptionnelle.

Les pays industrialisés semblent plus exposés à cette pathologie que les pays en voie de développement avec un taux 5 à 6 fois supérieur. Les continents africain et asiatique seraient moins touchés avec un taux inférieur à 30 pour 100.000. Cependant, il convient de pondérer ces conclusions car les pays industrialisés sont aussi ceux pour lesquels le dépistage est efficace si ce n'est systématique. Le traitement de cette maladie demeure donc un enjeu majeur au niveau mondial.

La France fait partie des pays où le taux d'incidence du cancer de sein a augmenté le plus vite (+2,4 pour 100.000 femmes par an) sur la période 1980-2005, avec un faible ralentissement entre 2000 et 2005 (+2,1 pour 100.000 femmes par an) [10-11].

Au niveau mondial, on recense plus d'un million de nouveaux cas par an et 400.000 décès liés à cette affection. Près de 4 millions de femmes dans le monde seraient atteintes [12].



Graphique 1 : Différents cas de cancers chez la femme répertoriés en France en 2005.

Les facteurs de risque liés au cancer du sein

Les causes de développement d'un cancer du sein ne sont pas complètement connues, mais on a pu identifier quelques facteurs de risque qui peuvent agir conjointement pour favoriser le développement d'un cancer :

➤ Les mastopathies bénignes

Certaines mastopathies bénignes ont une propension plus grande que d'autres à se transformer en cancer.

➤ La fécondité ou la vie reproductive

Les femmes qui n'ont pas eu d'enfant ou qui ont eu à leur première grossesse tardive (après 30 ans) ont un risque sensiblement doublé de développer un cancer de sein, par rapport à celles ayant eu au moins un enfant avant 30 ans.

➤ L'alimentation

La quantité de calories absorbées via l'alimentation augmente le risque du cancer de sein. Il semblerait que l'obésité, une consommation d'alcool relativement importante (1/2 à 1 litre de vin par jour), la faible consommation de fruits et légumes sont également suspectées d'augmenter le risque. La pratique d'un exercice physique régulier semble efficace et serait protecteur contre le cancer.

➤ Les risques familiaux

Ils sont de 2 ordres :

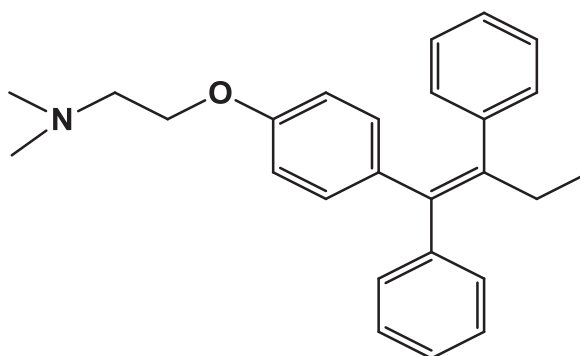
- Simple susceptibilité familiale : on retrouve plusieurs cas dans la famille, mais sans transmission systématique. Il s'agit plutôt de transmission de certains facteurs de risque : hypofécondité, tendance à avoir une mastopathie bénigne, obésité... Dans ces familles, les risques sont multipliés par 2 à 3.
 - Prédiction génétique forte : dans environ 5 à 8% des cas un gène anormal, dit « muté » est susceptible d'être transmis d'une génération à l'autre. Dans ce cas, les risques encourus par les femmes d'une famille dans la quelle un gène prédisposant est présent « gène BRCA 1 ou BRCA 2 » dépendent du fait qu'elles ont ou non hérité du gène normal. Si elles n'ont pas le gène, leur risque est le même que celui des femmes n'ayant pas de prédisposition au cancer du sein. Mais celles qui sont porteuses du gène, 7 à 8 cas sur 10 pourront développer un cancer du sein.
- Les traitements hormonaux prescrits à titre de contraception ou de traitement substitutif de la ménopause [13].
- D'autres facteurs liés à l'âge, à la croissance rapide pendant l'adolescence et au tabagisme élevé de longue durée sont susceptibles d'augmenter les risques de cancer du sein [14-15].

Traitements du cancer du sein

Plusieurs traitements du cancer du sein sont aujourd'hui mis en pratique faisant appels à la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie.

Les cancers du sein métastatiques sont principalement traités par chimiothérapie et hormonothérapie. Près des deux tiers des cancers du sein

impliquent des cellules présentant un excès de récepteurs hormonaux. Un des traitements possible est donc de bloquer ces récepteurs. C'est notamment le cas du **tamoxifène**, anti-œstrogène antagoniste des récepteurs à l'œstradiol qui est un des médicaments de référence pour ce type de pathologie. Cette molécule est prescrite dans le traitement du cancer du sein en phase précoce ou avancée, chez les femmes pré et post-ménopausées.



Tamoxifène

Cependant, en dépit de bons résultats, ce traitement n'est pas universel et est inefficace pour les cancers non hormonaux dépendants. Ceci justifie les investigations pour trouver de nouveaux principes actifs permettant un traitement efficace du cancer.

1.2. Matériel et méthodes

Les tests antitumoraux ont été menés sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires de type MCF-7 au Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques pharmaceutiques de l'équipe EA 4233 « Nutrition, Cancérogenèse et Thérapie antitumorale » de la Faculté de Pharmacie de l'Université d'Auvergne.

Le principe consiste à évaluer l'activité antiproliférative des extraits d'alcaloïdes totaux sur les cellules MCF-7.

Les cellules ont étéensemencées sur les plaques à 96-puits à une concentration de 50000 cellules/ml. 200 µl ayant été déposés dans chaque puits, nous avons donc 10000 cellules par puits. Après incubation 24 heures à l'étuve à 37°C, 5% CO₂, ces cellules sont mises en présence des extraits à différentes concentrations. Pour chaque échantillon, nous avons réalisé un témoin avec du DMSO (solvant de dilution de l'extrait)

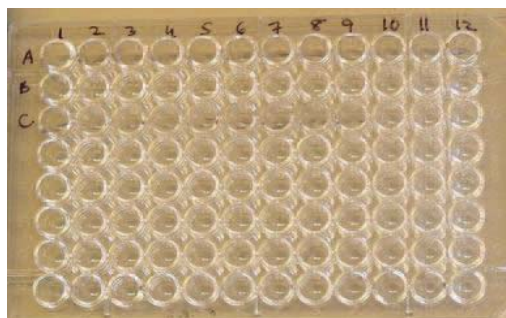


Image 10 : Plaque à 96 puits

La mesure de la prolifération cellulaire a été réalisée indirectement par une technique utilisant la résazurine. Après 72 heures d'incubation, le milieu de culture a été substitué par une solution de résazurine (25 µg/ml), qui, en présence de cellules métaboliquement actives, est réduite en résorufine fluorescent à 590 nm (Figure 10), et dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules viables. La fluorescence a ensuite été mesurée grâce à un lecteur de plaque (Fluoroskan Ascent FI[®], Thermo Electron Corporation, France) à 590 nm.

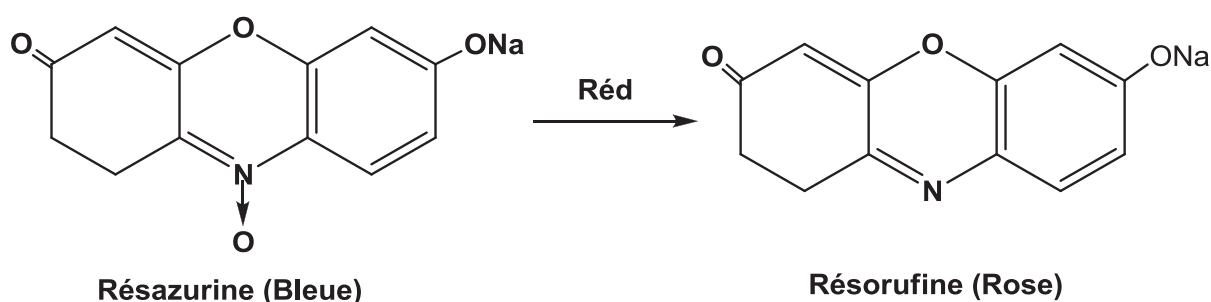


Image 11 : Réduction de la résazurine en résorufine

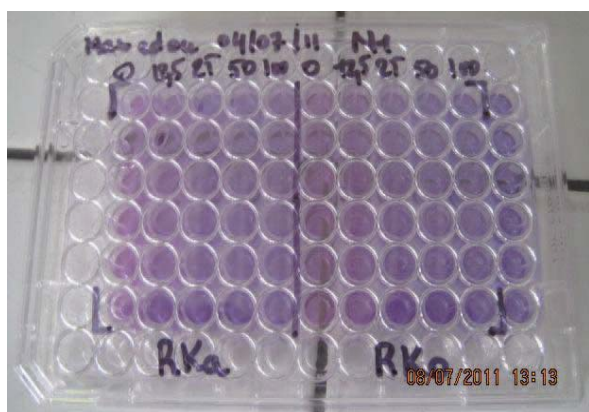
L'intensité de fluorescence obtenue après lecture au Fluoroskan Ascent (exprimée en unité arbitraire de fluorescence) est convertie en pourcentage d'inhibition de la prolifération par rapport à la prolifération des cellules témoins (témoin DMSO). Nous avons établi que le DMSO n'a aucune influence sur la prolifération des cellules, ceci en comparaison avec un témoin sans DMSO réalisé dans les mêmes conditions.

Pour chaque extrait, la CI 50 a été calculée. La CI 50 ou la concentration inhibitrice de 50% est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique. Cette mesure quantitative indique quelle quantité de substance ou inhibiteur est nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné. Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± ESM (Ecart Standard à la Moyenne). Dans la plupart des cas, nous avons réalisé 3 mesures ou plus pour chaque échantillon et pour chaque gamme de concentration. Dans certains cas, nous n'avons pas pu réaliser plusieurs fois les mesures avec des

données fiables ce qui conduit à la mesure d'écart types non représentatifs, ce qui explique l'absence de ESM dans le tableau.

Pour chaque extrait testé, une gamme de criblage est tout d'abord testée avec les concentrations suivantes :

0 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml et 100 µg/ml.



Images 12 et 13 : Disposition des différentes concentrations d'extraits en alcaloïdes totaux dans la plaque.

1.3. Résultats

Les extraits alcaloïdiques issus des feuilles, des écorces et racines de la plante à différentes concentrations ont été testées sur les cellules MCF-7 afin d'étudier leur activité proliférative. Les résultats sont consignés dans les tableaux 23 à 35.

Pour des raisons de facilité de lecture, nous présentons ci-après les tableaux avec les moyennes et les écarts types, les tableaux complets avec toutes les mesures effectuées sont donnés en annexe 5.

Le seuil d'activité antitumorale généralement admis pour ce test est de 30 µg/ml. La référence que nous prenons est le **tamoxifène** qui, dans les mêmes conditions sur ce même test réalisé au laboratoire possède une CI 50 de $4,42 \pm 0,34$.

1.3.1. Les extraits d'alcaloïdes totaux issus des feuilles de *N. latifolia* Sm.

Pour simplifier les tableaux, nous avons utilisé les abréviations suivantes :

FKa : extrait des feuilles de Kanadjiguila

FKi : extrait des feuilles de Kita

FLf : extrait des feuilles de Lafiabougou

FLs : extrait des feuilles de Lassa

FKo : extrait des feuilles de Koulouba

Tableau 23 : Extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Kanadjiguila.

FKa	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	10,15	6,94	6,46	21,03	50,07
SEM	-	-	-	-	-

$$CI_{50_{FKa}} = 99,8 \mu\text{g/ml}$$

Tableau 24 : Extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Kita.

FKi	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	7,25	8,14	-	46,83	90,38
SEM	-	-	-	-	0,62

$$CI_{50_{FKi}} = 52,6 \mu\text{g/ml}$$

Tableau 25 : Extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Lafiabougou.

FLf	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	4,89	9,31	34,93	64,02	100
SEM	-	2,72	3,14	3,45	0

$$CI_{50_{FLf}} = 35,8 \mu\text{g/ml}$$

Tableau 26 : Extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Lassa.

FLs	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	4,93	6,09	27,39	57,10	100
SEM	-	3,32	6,71	4,85	0

$$CI_{50_{FLs}} = 42,4 \mu\text{g/ml}$$

Tableau 27 : Extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Koulouba.

FKo	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	1,34	-	61,13	99,17	100
SEM	1,35	-	1,39	0,24	0

$$CI_{50_{FKo}} = 22,0 \mu\text{g/ml}$$

1.3.2. Les extraits d'alcaloïdes totaux issus des écorces de *N. latifolia* Sm.

Pour simplifier les tableaux, nous avons utilisé les abréviations suivantes :

EKa : extrait des écorces de Kanadjiguila

ELf : extrait des écorces de Lafiabougou

ELs : extrait des écorces de Lassa

EKo : extrait des écorces de Koulouba

Tableau 28 : Extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Kanadjiguila.

EKa	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	5,59	57,15	97,34	100	100
SEM	3,72	1,19	0,11	0	0

$$CI_{50_{EKa}} = <12 \text{ µg/ml}$$

Tableau 29 : Extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Lafiabougou.

ELf	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	2,035	52,27	96,47	100	100
SEM	1,51	1,98	0,20	0	0

$$CI_{50_{ELf}} = <12 \text{ µg/ml}$$

Tableau 30 : Extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Lassa.

ELs	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	2,88	-	64,36	99,03	100
SEM	1,56	-	1,32	0,20	0

$$CI_{50_{ELs}} = 21,4 \text{ µg/ml}$$

Tableau 31 : Extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Koulouba.

EKo	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	2,90	-	15,26	69,17	85,31
SEM	2,51	-	2,86	1,50	0,62

$$CI_{50_{EKo}} = 39,0 \text{ µg/ml}$$

1.3.3. Les extraits d'alcaloïdes totaux issus des racines de *N. latifolia* Sm.

Pour simplifier les tableaux, nous avons utilisé les abréviations suivantes :

RKa : extrait des racines de Kanadjiguila

RLf : extrait des racines de Lafiabougou

RLs : extrait des racines de Lassa

RKo : extrait des racines de Koulouba

Tableau 32 : Extrait des alcaloïdes totaux des racines de Kanadjiguila.

RKa	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	3,20	44,78	86,79	99,81	99,56
SEM	2,05	3,23	0,92	0,12	0,43

$$CI\ 50_{RKa} = 13,6\ \mu\text{g/ml}$$

Tableau 33 : Extrait des alcaloïdes totaux des racines de Lafiabougou.

RLf	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	1,53	-	59,57	94,63	100
SEM	1,00	-	1,33	0,69	0

$$CI\ 50_{RLf} = 22,4\ \mu\text{g/ml}$$

Tableau 34 : Extrait des alcaloïdes totaux des racines de Lassa.

RLs	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	1,60	28,93	83,71	99,62	100
SEM	0,85	0,38	0,63	0,31	0

$$CI\ 50_{RLs} = 16,3\ \mu\text{g/ml}$$

Tableau 35 : Extrait des alcaloïdes totaux des racines de Koulouba.

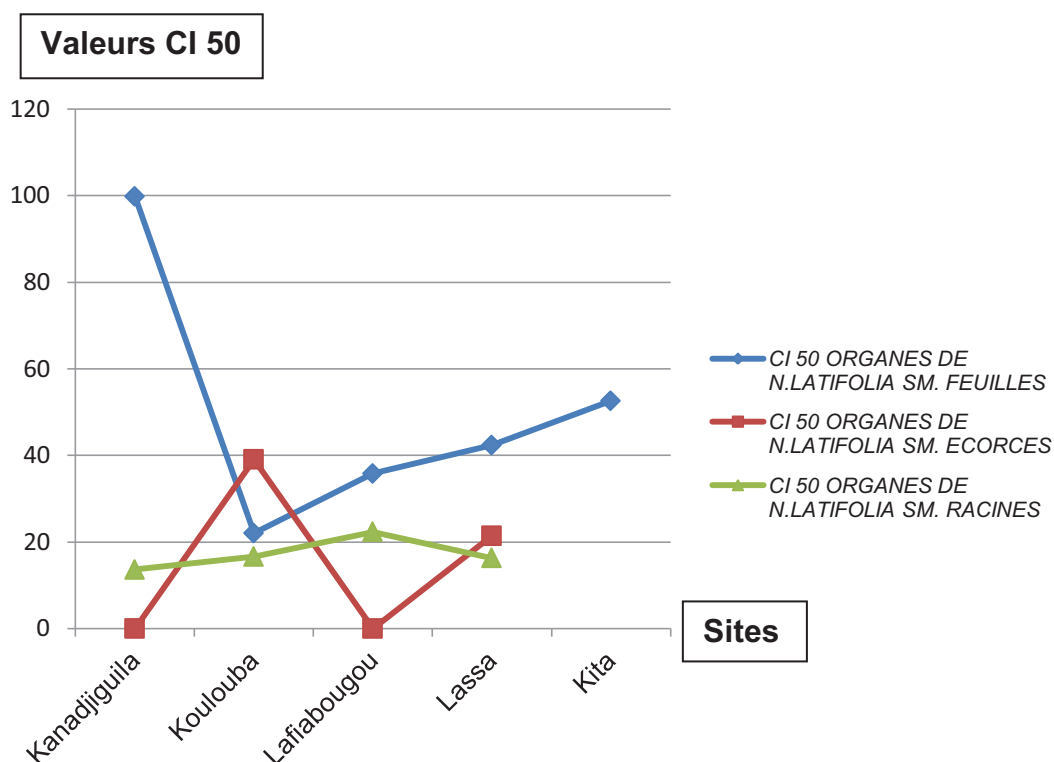
RKo	Pourcentage d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Moyennes	2,42	25,50	84,97	99,75	100
SEM	1,57	2,73	0,99	0,14	0

$$CI\ 50_{RKo} = 16,6\ \mu\text{g/ml}$$

1.4. Analyse et discussions

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il est admis qu'une activité antiproliférative intéressante doit être inférieure à la concentration 30 µg/ml. Plus la valeur de CI 50 est faible, meilleure est l'activité antitumorale.

Le graphique 2 représente la CI 50 obtenue pour chacun des sites en fonction des organes (sauf pour Kita dont nous ne disposons que des feuilles).

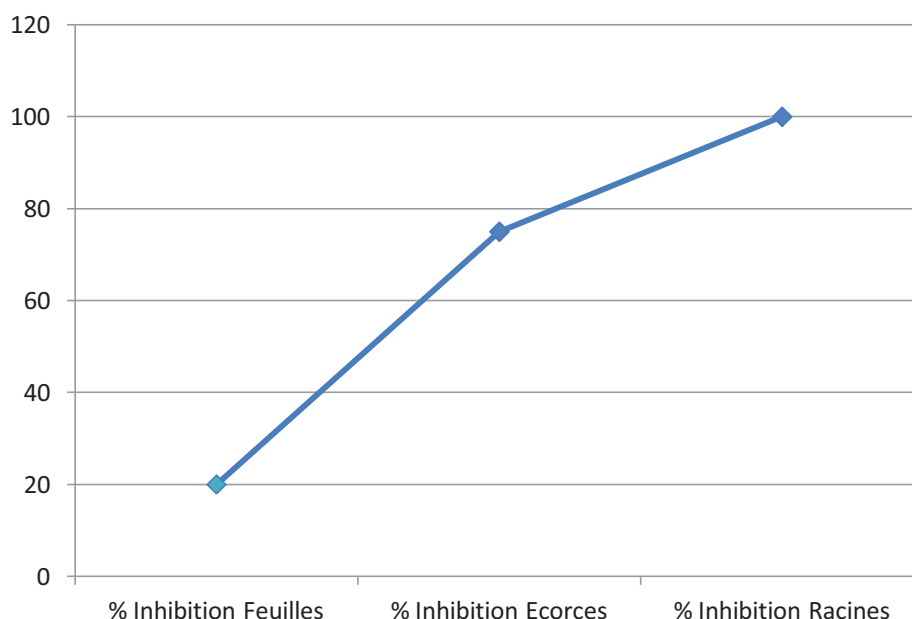


Graphique 2 : Evolution comparative CI 50 des extraits d'alcaloïdes totaux des trois organes de *N. latifolia* Sm.

D'une manière générale, les extraits d'alcaloïdes totaux issus des feuilles ne représentent qu'une très faible activité antitumorale. Seuls les extraits de FK_o avec une CI 50 de 22 µg/ml ont produit un résultat encourageant contrairement à FK_a, FL_f, FL_s et FK_i où les valeurs de CI 50 sont très supérieures à 30 µg/ml.

En revanche, les extraits d'alcaloïdes totaux issus des écorces ont donné de bons résultats. Si l'extrait issu de Lassa (EL_a) présente une CI 50 intéressante (21,4 µg/ml) du même ordre que les feuilles de Koulouba (FK_o), les extraits de Kanadjiguila (EK_a) et de Lafiabougou (EL_f) sont très prometteurs et présentent une activité inférieure à 12 µg/ml. Pour déterminer plus précisément l'efficacité de ces fractions, il convient donc de réaliser des essais avec une gamme de concentration plus faible. Seul l'extrait des écorces de Koulouba (EK_o) donne un résultat médiocre supérieur à 30 µg/ml. Il est intéressant de noter que l'âge de la plante n'a peut-être pas d'influence sur l'activité antiproliférative, le site de Kanadjiguila étant constitué de plantes adultes, tout comme celui de Lassa, et celui de Lafiabougou de plantes adultes comme le site de Koulouba. Cette analyse ne présume cependant pas de la nature des constituants de ces échantillons.

Les extraits de racines présentent aussi de bons résultats, toutefois moins spectaculaires que dans le cas des écorces, avec des CI 50 inférieures à 20 µg/ml, sauf pour Lafiabougou dont la valeur est de 22,4 µg/ml. L'activité des extraits de racines semble plus « linéaire » que pour les autres organes de la plante.



Graphique 3 : Evolution du % d'inhibition en fonction des extraits d'alcaloïdes totaux des différents organes de *N. latifolia* Sm testés sur les cellules MCF-7

Comme l'indique le graphique 3, qui présente une moyenne des pourcentages d'inhibition des cellules MCF-7 obtenus pour chacun des organes de la plante sur les 4 principaux sites de récolte, les écorces et les racines sont les organes présentant le meilleur potentiel.

1.5. Conclusion

Sur les 13 extraits testés, 5 ont montré des CI 50 inférieures à 20 µg/ml. Si les extraits de feuilles donnent globalement des résultats décevants, les extraits de racines et surtout d'écorces présentent des activités intéressantes. Les extraits d'écorces de Kanadjiguila et de Lafiabougou ont des CI 50 inférieures à 12 µg/ml, ce qui nécessitera donc de réaliser d'autres tests avec des gammes de concentration plus faibles. Les extraits des 5 sites les plus intéressants (RLs, RKa, RKo, EKa, ELf) pourraient donc être fractionnés afin d'identifier le ou les molécule(s) d'intérêt(s) générant l'activité observée.

2. ACTIVITE ANTALGIQUE

2.1. Généralités

Le traitement de la douleur est un problème [16] de santé publique majeure avec, pour les seuls cas de la France, 7 millions de personnes souffrant de douleur chronique. La recherche de nouveaux procédés antalgiques dans le domaine de la douleur, et plus particulièrement la douleur chronique, est toujours d'actualité [17]. Si des progrès considérables ont été réalisés au cours des vingt dernières années du fait d'une meilleure connaissance de la neurophysiologie et du mécanisme de la douleur, notamment grâce à la découverte des opioïdes et des cannabinoïdes endogènes et de l'implication de la glie, la recherche de nouveaux antalgiques plus efficaces et induisant moins d'effets secondaires reste un enjeu majeur.

Nous pouvons définir la douleur, comme la sensation ressentie par un organisme dont le système nerveux détecte un stimulus nociceptif [18-22]. La douleur correspond à un signal d'alarme de l'organisme pour traduire une agression extérieure qui met en cause son intégrité physique. Selon les rapports de l'IASP (International Association for the Study of Pain), la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en termes de telles lésions [23].

La composante émotionnelle participe à la genèse de la douleur. La douleur ne se limite donc pas à la perception d'une simple sensation. Ce qui traduit le caractère subjectif de toute perception douloureuse, qui est modulée par le contexte dans lequel elle intervient. La durée d'évolution permet de distinguer deux sortes de douleur, à savoir aiguë « signal d'alarme » et chronique « douleur maladie ».

- La douleur aiguë est un symptôme qui aide au diagnostic et qui généralement décroît et disparaît lorsqu'un traitement est institué. La douleur aiguë doit être traitée dès lors que le signal d'alarme a été perçu.
- La douleur chronique est une douleur qui évolue et dure depuis 3 à 6 mois.

La perception de la douleur peut être augmentée ou diminuée par l'administration de certains médicaments en fonction du type de douleur, l'état psychologique.

De nos jours, la douleur est considérée comme une affection spécifique et parfois même comme une urgence (exemple chez les nourrissons la colique néphrétique).

Pour le traitement de la douleur, l'O.M.S définit trois paliers de douleur auxquels elle associe des principes thérapeutiques :

- ✓ Douleurs faibles : traitement avec les antalgiques non morphiniques (paracétamol, aspirine, kétoprofène).

- ✓ Douleurs modérées : traitement avec les antalgiques dérivés de la morphine (associée à du paracétamol, tramadol, nefopam).
- ✓ Douleurs intenses : traitement avec la morphine et l'oxycodone

Plus de 50% des médicaments utilisés aujourd'hui sont d'origine naturelle. Dans le domaine des antalgiques, nous pouvons notamment citer la Morphine, extraite du pavot, dont le nom a donné naissance à toute une classe d'analgésiques. Il existe un potentiel de plus de 80 000 plantes médicinales parmi plus de 250 000 plantes supérieures [24], constituant une source considérable pour l'identification de nouveaux antalgiques potentiels. Actuellement, seules 10% de ces plantes ont fait l'objet d'investigations scientifiques plus ou moins poussées. Il est fort probable que les 90% restant réservent encore de nombreuses découvertes du plus grand intérêt. A l'image de la morphine, la famille des alcaloïdes semble être une source privilégiée de molécules antalgiques.

La collaboration de nos équipes de recherche au Mali et en France établie depuis de longues années a toujours été centrées sur l'évaluation des activités biologiques (antibactériens, antifongiques, antitussif, anticancéreux...) d'extraits de plantes Africaines. Nous avons constaté d'une part l'activité biologique réelle de certaines plantes et d'autre part les problèmes dramatiques d'accès aux soins d'une partie de la population malienne. La prise en charge de la douleur est notamment un aspect encore peu développé en Afrique.

En 2009, le laboratoire de Chimie des Hétérocycles et des Glucides a participé à la création d'une plateforme multidisciplinaire regroupant des équipes spécialisées dans le domaine de la douleur, allant de la synthèse ou de la découverte de molécules d'application sur l'homme : « **Analgesia Partnership** ».

Comme, nous l'avons vu lors de l'enquête ethnobotanique, *N. latifolia* Sm. est utilisée pour traiter les maux de ventre et pourrait donc être la source de molécules possédant une activité antalgique. C'est pourquoi, nous avons souhaité évaluer l'activité antalgique des alcaloïdes totaux extraits de cette plante.

2.2. Matériel et méthodes

Pour évaluer l'activité analgésique, nous avons utilisé le test dit de « KOSTER » [25-27] qui consiste à déterminer une éventuelle protection vis-à-vis des crampes induites chez les souris après injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 0,6%.

Pour cette étude, l'acide acétique administré chez la souris provoque une douleur aigüe qui se traduit par des contractions ventrales appelées « **crampes** ». La mesure de l'activité antalgique d'un composé consiste à comparer le nombre de crampes d'une population de souris ayant ingéré ce composé en comparaison d'une

population témoin ayant seulement ingéré le « véhicule » (solvant). L'efficacité du test est contrôlée en administrant à un lot de souris au cours de ces mêmes expériences de la morphine selon le même protocole.

2.2.1. Matériel

➤ Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des extraits d'alcaloïdes totaux issus des feuilles, écorces et racines de *N. latifolia* Sm.

➤ Matériel animal

Nous avons travaillé sur des souris adultes mâles blanches de poids moyen ± 30 g provenant de l'animalerie de la Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne de Clermont-Ferrand.

Les souris étaient maintenues dans les mêmes conditions de température (température du laboratoire 25 ± 2 °C) tout en ayant un accès libre à l'eau et à la nourriture [28-29].

Pour le besoin du test, nous avons utilisé des lots de 4 souris, dont la première souris servant de véhicule et les autres des extraits d'alcaloïdes totaux des trois organes de *N. latifolia* Sm.

Nous avons travaillé dans le laboratoire du « Pôle Neurosciences » de la Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne à Clermont-Ferrand.



Image 14 : Disposition d'un lot de quatre souris pour le test de torsion

2.2.2. Méthodes

➤ Préparation des extraits

Nous avons pesé 5 mg pour chaque extrait d'alcaloïdes totaux issus des feuilles, écorces et racines de *N. latifolia* Sm.

Pour les feuilles, nous avons 5 sites (Kanadjiguila, Koulouba, Kita, Lafiabougou et Lassa), 3 sites pour les écorces (Kanadjiguila, Lafiabougou et Lassa) et 3 sites pour les racines (Kanadjiguila, Koulouba et Lafiabougou).

Nous avons préparé en tout, 13 échantillons dont 11 extraits d'alcaloïdes totaux pour le test, 1 témoin (véhicule) et 1 produit référant (la morphine).

➤ Etude de l'activité antalgique

Les souris sont réparties en plusieurs lots de 4 souris chacun :

- Souris 1 : souris témoin recevant le véhicule (solvant de solubilisation des extraits 50% DMSO + 50% Eau distillée) par voie intra-gastrique à la dose de 10 mg/kg. Or, il nous faut pour une dilution de 1ml/mg soit une dose de 100 µl/10 g.
- Souris 2, 3, 4 : souris recevant respectivement par voie intra-gastrique les extraits des feuilles, écorces, racines de la plante et morphine de façon alternée à la dose de 10 mg/kg en raison de 100 µl/10 g de poids corporel.

Un volume de 300 µl d'une solution de composés testés ou de véhicule sont introduits dans la souris par voie orale.

20 minutes après cette ingestion, on injecte par voie intra-péritonéale 300 µl d'acide acétique à 0,6% pour chaque souris. L'injection de l'acide acétique provoque une douleur aiguë chez la souris qui se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et une torsion de la musculature dorso-abdominale.



Image 15 : Image d'une souris qui crampe (mouvement d'étirement).

Les torsions induites (crampes) chez la souris sont comptabilisées par séries de 5 minutes sur une période de 25 minutes.

L'activité antalgique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur ou pourcentage de protection pour chaque lot traité, suivant la formule :

2.3. Résultats

Tableau 36 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 5 sites de feuilles.

Temps	Véhicule	FLf	FKa	FKo	FLs	FKi	Morphine
0'-5'	8,45	4,33	6,14	6,13	3,25	5,88	0,00
5'-10'	14,95	13,00	13,29	9,75	9,50	12,75	0,50
10'-15'	11,55	12,17	10,57	8,50	8,50	10,13	0,63
15'-20'	8,15	8,50	7,71	6,88	7,00	7,25	0,38
20'-25'	6,55	5,83	7,86	5,50	6,75	7,13	0,00

Tableau 37 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 3 sites d'écorces.

Temps	Véhicule	EKa	ELf	ELs	Morphine
0'-5'	8,45	6,43	4,33	7,75	0,00
5'-10'	14,95	11,14	12,67	15,88	0,50
10'-15'	11,55	10,29	11,00	14,63	0,63
15'-20'	8,15	7,57	8,33	9,75	0,38
20'-25'	6,55	5,57	5,50	9,38	0,00

Tableau 38 : Nombre de crampes comptabilisées dans les 3 sites de racines.

Temps	Véhicule	RKo	RLf	RKa	Morphine
0'-5'	8,45	6,29	5,00	6,50	0,00
5'-10'	14,95	13,43	12,29	13,25	0,50
10'-15'	11,55	13,71	8,43	10,63	0,63
15'-20'	8,15	10,57	7,29	9,38	0,38
20'-25'	6,55	8,57	5,00	6,38	0,00

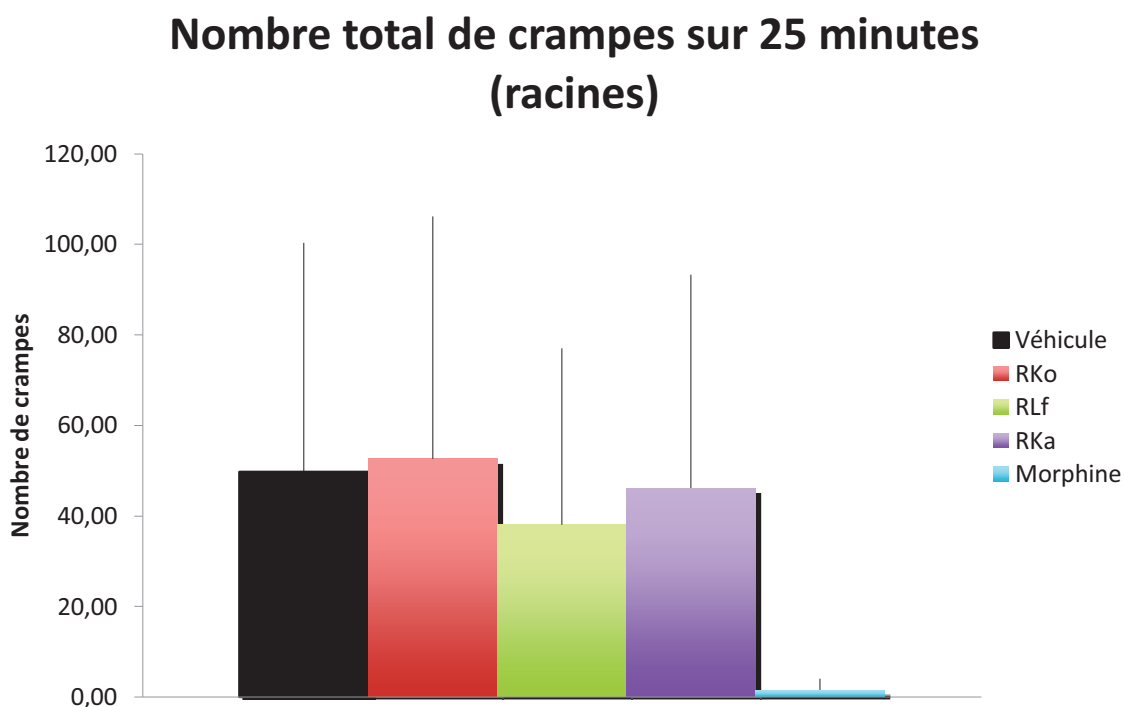
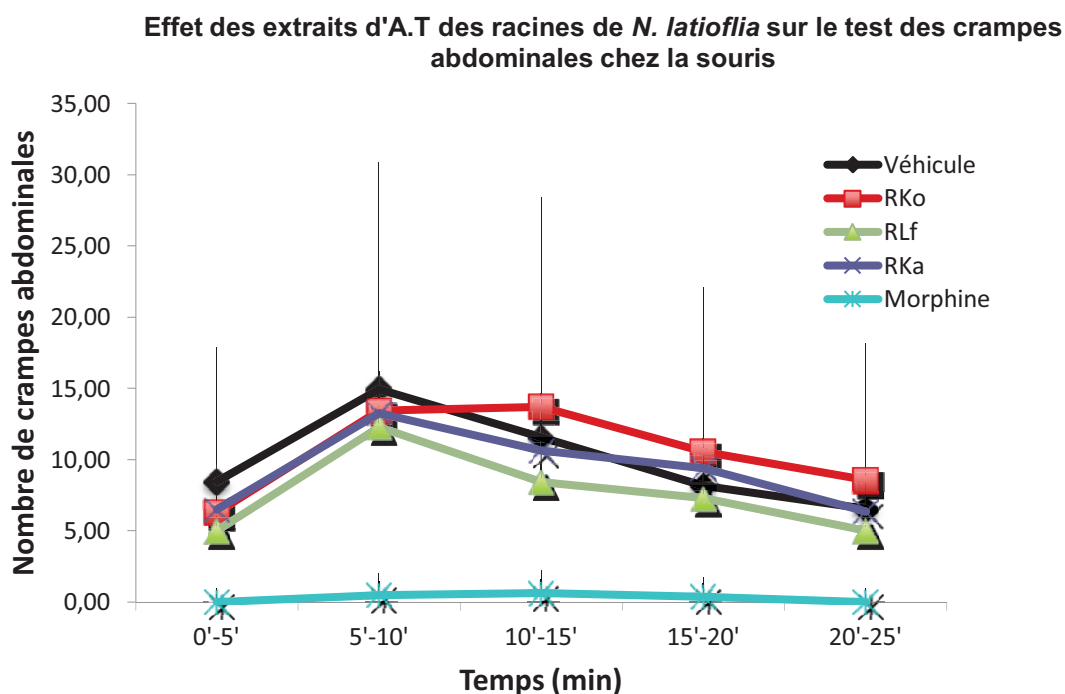
Tableau 39 : Moyenne de crampes en fonction du temps et d'extraits pour chaque lot de souris

Temps	0'-5'	5'-10'	10'-15'	15'-20'	20'-25'	Somme	% inhibition
Véhicule							
Moyennes	8,45	14,95	11,55	8,15	6,55	49,65	
SEM	0,83	0,98	0,94	0,85	0,86	3,65	
Racines Koulouba							
Moyennes	6,29	13,43	13,71	10,57	8,57	52,57	-5,88
SEM	1,51	2,26	1,98	1,76	1,41	7,92	
Racines Lafiabougou							
Moyennes	5,00	12,29	8,43	7,29	5,00	38,00	23,46
SEM	1,38	1,32	1,23	1,06	1,27	4,79	
Racines Kanadjiguila							
Moyennes	6,50	13,25	10,63	9,38	6,38	46,13	7,10
SEM	0,73	1,21	1,44	1,38	1,29	4,71	
Feuilles Lafiabougou							
Moyennes	4,33	13,00	12,17	8,50	5,83	43,83	11,72
SEM	0,95	2,08	1,87	1,26	1,35	6,63	
Feuilles Kanadjiguila							
Moyennes	6,14	13,29	10,57	7,71	7,86	45,57	8,21
SEM	1,28	1,74	1,43	1,67	1,30	6,51	
Feuilles Koulouba							
Moyennes	6,13	9,75	8,50	6,88	5,50	36,75	25,98
SEM	1,43	1,90	1,24	1,43	1,44	6,58	

Feuilles Lassa							
Moyennes	3,25	9,50	8,50	7,00	6,75	35,00	29,51
SEM	2,14	2,18	2,06	1,78	2,14	7,43	
Feuilles Kita							
Moyennes	5,88	12,75	10,13	7,25	7,13	43,13	13,13
SEM	1,57	2,97	2,35	1,36	1,43	8,82	
Ecorces Kanadjiguila							
Moyennes	6,43	11,14	10,29	7,57	5,57	41,00	17,42
SEM	2,01	2,37	2,59	1,69	1,32	9,56	
Ecorces Lafiabougou							
Moyennes	4,33	12,67	11,00	8,33	5,50	41,83	15,74
SEM	1,38	1,98	1,32	0,95	1,31	5,00	
Ecorces Lassa							
Moyennes	7,75	15,88	14,63	9,75	9,38	57,38	-15,56
SEM	1,36	1,51	1,00	1,39	1,60	5,28	
Morphine							
Moyennes	0,00	0,50	0,63	0,38	0,00	1,50	96,98
SEM	0,00	0,38	0,26	0,18	0,00	0,57	

2.4. Analyse et discussions

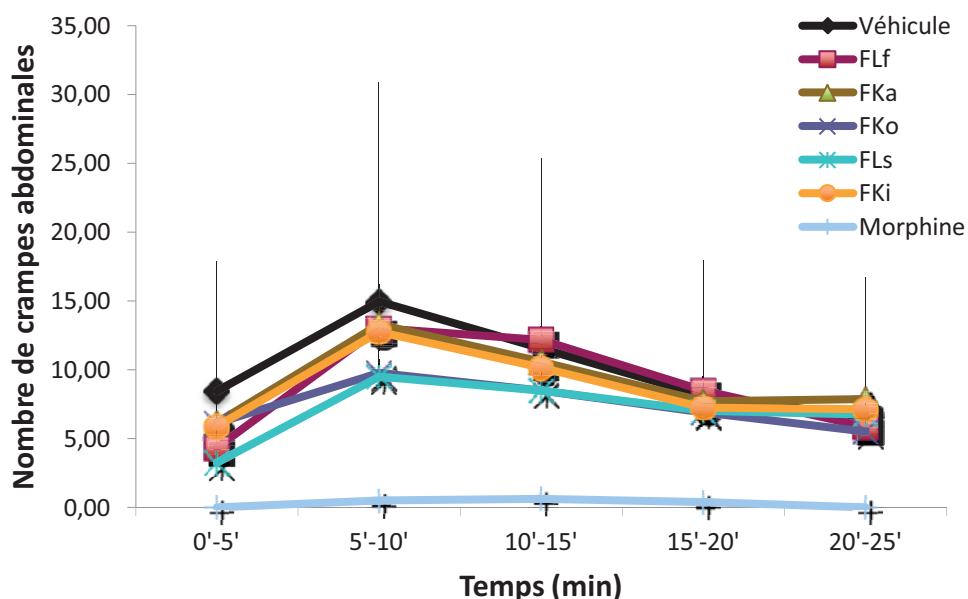
Lors de ces tests, l'activité observée pour la morphine (97% d'inhibition) est cohérente et valide donc ces essais.



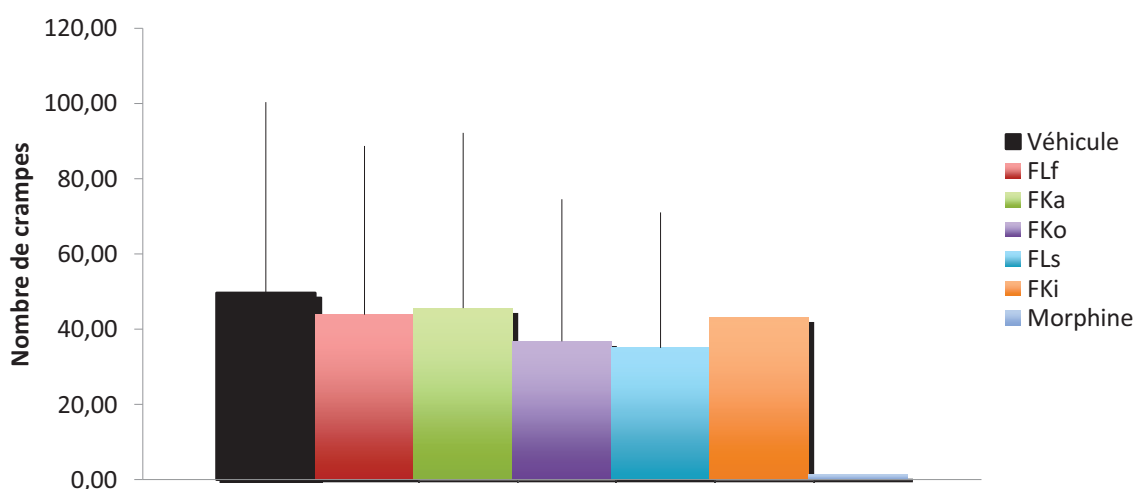
Graphique 4 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'A.T de racines de *N. latifolia* testés.

Les extraits des racines donnent des résultats disparates (graphique 4). Si, pour le site de Lafiabougou on observe une inhibition de presque 25%, les extraits de Kanadjiguila entraînent une réponse modérée et ceux de Koulouba impliquent une augmentation du nombre de crampes. L'activité observée pour les racines de Koulouba pourrait être en accord avec les prescriptions des tradithérapeutes de Bandiagara pour soigner la douleur viscérale.

Effet des extraits d'A.T des feuilles de *N. latifolia* sur le test des crampes abdominales chez la souris



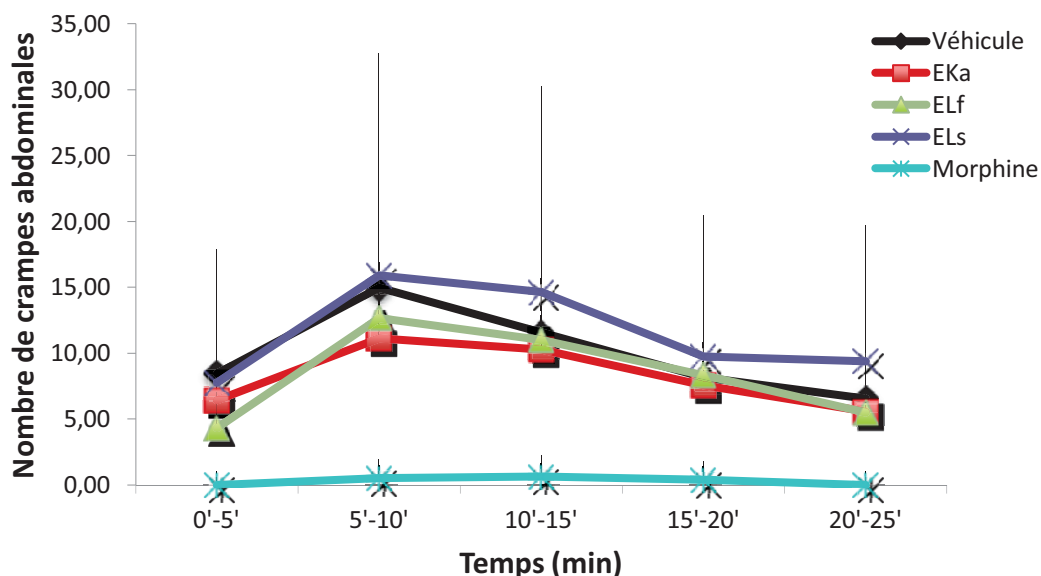
Nombre total de crampes sur 25 minutes (feuilles)



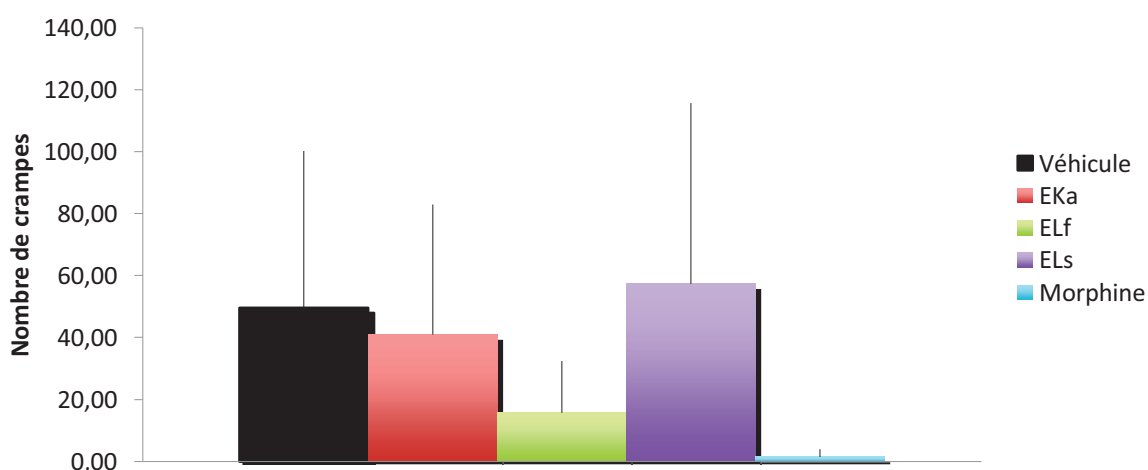
Graphique 5 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'A.T de feuilles de *N. latifolia* testés.

Dans le cas des extraits de feuilles (graphique 5), l'inhibition de la douleur a également été observée pour chaque échantillon mais avec une efficacité inégale (entre 8% et 30% d'inhibition). Deux sites présentent des extraits prometteurs : Lassa (30% d'inhibition) et Koulouba (26% d'inhibition). Dans l'enquête ethnobotanique, nous avons vu que les tradithérapeutes prescrivent principalement des décoctions de feuilles pour traiter les céphalées.

Effet des extraits d'A.T des écorces de *N. latifolia* sur le test des crampes abdominales chez la souris



Nombre total de crampes sur 25 minutes (écorces)



Graphique 6 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits d'A.T d'écorces de *N. latifolia* testés.

En ce qui concerne les extraits d'écorces (graphique 6), les résultats sont contrastés : si une légère inhibition de la douleur d'environ 15% est observée pour deux sites (Lafiabougou et Kanadjiguila), l'extrait de Lassa donne un résultat opposé avec une augmentation apparente de la douleur ressentie par l'animal de l'ordre de 15%. Les écorces sont cependant prescrites pour prendre en charge les douleurs viscérales.

2.5. Conclusion

Si une activité analgésique faible ou modérée a été observée pour la plupart des extraits testés, seuls trois extraits ont présenté une activité très prometteuse : l'extrait des racines de Lafiabougou (24%) et les extraits des feuilles de Koulouba (26%) et Lassa (30%). Il conviendrait donc de réaliser des fractionnements de ces extraits afin d'identifier si possible la ou les molécules responsables de cette activité.

Enfin, si des déductions directes ne peuvent pas être faites entre les prescriptions des tradithérapeutes et les résultats de nos tests en raison de la nature différente des boissons ingérées et de nos extraits, il faut cependant souligner qu'une activité antalgique réelle de ces extraits a bien été observée. Il pourrait être intéressant lors d'études ultérieures de réaliser les décoctés selon le protocole prescrit par les tradithérapeutes et d'engager des tests comparatifs.

REFERENCES

- [1] Lacroix M., "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours : an update", dans *Breast Cancer Research and Treatment*, **2004**, vol. 83, p 249-289.
- [2] Soule H.D., "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma", dans *Journal of the National Cancer Institute*, **1973**, vol. 51, p.1409-1416.
- [3] Levenson A.S., "MCF-7: the first hormone responsive breast cancer cell line", dans *Cancer Research*, **1997**, vol.57, p. 3071-3078.
- [4] SANOGO R., MAIGA A., DIALLO D., "Activités analgésique et anti inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis*, *Stereospermum kunthianum* et *Trichilia emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali". *Pharm. Méd. Trad. Afr.* **2006**, Vol. **XIV** pp. 123-136.
- [5] Enjeux médicaux des cancers. [Archives **2008**] voir site de l'inserm.
- [6] Belot, A. ; Grosclaude, P. ; Bossard, N. ; Jouglu, E.; Benhamou, E. *Revue d'épidémiologie et de santé publique*, **2008**, 56, 159-175.
- [7] Rousselet, M. Thèse de Doctorat n°26, UFR Pharmacie. Université de Tours, **2000**.
- [8] Ligue contre le cancer en France, rapport juin **2010**.
- [9] Institut de Veille Sanitaire, *Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire*, **2007**, 10.
- [10] Source Inserm [Archives], **2008**.
- [11] "Baisse de l'incidence des cancers du sein entre 2005 et 2006 en France : un phénomène paradoxal" [Archives], *Bulletin du cancer*, **2008** ; 95 : 11-5.
- [12] Boyle et Ferley, **2004**.
- [13] Beral, Breast Cancer and hormone-replacement therapy in the million women study, *Lancet*, **2003**; 362: 419-27.
- [14] Organisation Mondiale de la Santé, K.P. Stewart B, editors (ed), world cancer report Lyon, Larc Press, **2003**, pp. 11.
- [15] Gerber B. Breast Cancer Res. Treat. **2003**. PMID: 12825861.
- [16] Harald B., Collett B., Ventafridda V., Cohen R., Gallacher D. "Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment" *European Journal of Pain*, **2006**, 10, 287-333.

- [17] Max M., Stewart W.F. "The molecular epidemiology of pain: a new discipline for drug discovery" *Natural Review Drug Discovery*, **2008**, 7, 647-658.
- [18] Peter J-P, "De la douleur", Ed. Quai Voltaire, Paris, **1993**.
- [19] Le Breton D., "Anthropologie de la douleur", Edit. Métailié, Paris, **1995**, 235 pages.
- [20] Relouzat R. et Thiollot J-P, "Combattre la douleur", Anagramma Ed., **2002**.
- [21] "La prise en charge de la douleur", dans Ann. Pharm. Fr., mars **2000**, Vol. 58, n°2, pp. 75-144.
- [22] Rey R., "Histoire de la douleur", Ed. La Découverte Poche (sciences humaines et sociales), **2000**.
- [23] COLLIN E., Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Janvier **2008**.
- [24] Modzelewska, A.; Sur, S "Sesquiterpenes : natural products that decrease cancer growth." *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2005**, 5, 477-499.
- [25] Diallo, D. "Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada Africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae)". Thèse de Doctorat de Recherche, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne. **2000**. Lausanne Suisse.
- [26] Soro T. Y., Traoré F., Sakande J., "Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae)". *C. R. Biologies* 332 (**2009**) 371-377.
- [27] BenMoussa A., Lamsaouri J., Eljaoudi R., Cherrah Y., Ansar M., Zahidi A., Taoufik J., "Synthèse et évaluation de l'activité analgésique des 5-aryl hydroxyméthyl-6-méthyl-(2H)-4, 5-dihydropyridazine-3-ones". *Biologie & Santé* **2006**, vol. 6, n° 2.
- [28] Laroche M., "Les animaux de laboratoire in l'expertise toxicologique des médicaments". Paris, Masson, **1986**, pp. 39-109.
- [29] Laroche H., Les animaux de laboratoire, Ethique et bonnes pratiques, Ed. Masson (parution 01/03/1990). **1990**. EAN 9782225819506.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Si *N. latifolia* Sm. est une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle, particulièrement au Mali, elle demeure encore relativement peu étudiée et ne connaît pas d'application en médecine conventionnelle.

L'enquête ethnobotanique réalisée auprès des tradithérapeutes maliens, nous a permis de connaître l'usage fréquent de la plante par les populations rurales afin de remédier durablement aux nombreuses maladies et infections auxquelles elles sont exposées. Cette enquête a révélé plusieurs usages non décrits à ce jour dans la littérature comme l'utilisation de décoctés de racine pour lutter contre les infections ou la poudre de fruit pour soigner la toux. D'une façon générale, les racines et les écorces de cette plante sont utilisées pour traiter la douleur viscérale et les feuilles pour lutter contre les céphalées.

Après avoir récolté le matériel végétal (feuilles, écorces et racines) sur quatre sites hétérogènes en terme de nature du sol, de climat ou de maturité de la plante, nous avons effectué un screening phytochimique afin d'identifier la nature des principaux métabolites secondaires présents. Ainsi, nous avons identifié la présence d'alcaloïdes, de composés polyphénoliques (flavonoïdes, tanins), de stérols et triterpènes, de saponosides, d'hétérosides cardiotoniques et de composés réducteurs (oses et holosides, coumarines, mucilages). Ces composés possèdent pour la plupart des activités biologiques intéressantes qui justifieraient l'utilisation abondante et variée de *N. latifolia* Sm. dans la médecine traditionnelle. Il faut noter que l'absence d'hétérosides cyanogénétiques dans les organes étudiés de la plante, diminue les risques liés à sa toxicité.

A l'issue du screening phytochimique, nous avons axé notre étude sur les alcaloïdes en réalisant les extraits d'alcaloïdes totaux issus des feuilles, écorces et racines de la plante.

Nous avons testé l'activité antiproliférative de ces extraits sur des lignées de cellules cancéreuses MCF-7 (cancer du sein). Plusieurs extraits ont montré des activités intéressantes et deux d'entre eux issus des racines donnent une activité antitumorale inférieure à 12 µg/ml qui justifierait des tests plus poussés afin de mieux cerner leur CI50 qui se rapproche de celle de **tamoxifène**, médicament de référence pour traiter ce type de cancer. Une étude approfondie de ces échantillons par fractionnement permettrait une investigation plus poussée pour mettre en évidence les principes actifs.

Nous avons également évalué les activités antalgiques de ces mêmes extraits sur un modèle animal. La quasi-totalité des extraits présente effectivement une activité antalgique réelle et, pour trois d'entre eux, un extrait de feuilles et deux extraits de racines, le pourcentage d'inhibition de la douleur, de 30% environ, est très

prometteur. Ces premiers essais confirment la pertinence de la recherche de métabolites secondaires extraits de *N. latifolia* Sm. possédant une activité antalgique.

En conclusion, *N. latifolia* Sm. est une plante à caractère médicinal qui justifie sa place de choix dans la pharmacopée africaine. Une étude plus approfondie des extraits de cette plante, réalisés selon différents protocoles, permettrait probablement de trouver des molécules d'intérêt aussi bien d'un point de vue antitumoral qu'antalgique.

ANNEXES

ANNEXE 1

RECHERCHES D'ALCALOÏDES DANS LES DIFFERENTS ORGANES DE LA PLANTE (PROTOCOLE DMT)

1. Solution à analyser

Introduire 10 g de matière végétale séchée et grossièrement pulvérisée dans un erlenmeyer de 250 ml. Ajouter une solution de H_2SO_4 diluée au 1/10 avec de l'eau distillée dans le rapport 5 : 1 (volume acide : poids de la plante), c'est-à-dire, 10 g de matière dans 50 cc de H_2SO_4 , puis boucher l'erlenmeyer. Bien agiter et laisser macérer pendant 24 h à la température du laboratoire.

Ensuite, filtrer sur papier et laver à l'eau de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

2. Caractérisations : Réactions de précipitation

Prendre 2 tubes à essais et introduire 1 ml de filtrat dans chacun. Ajouter dans le tube n°1, 5 gouttes de réactif de Mayer (solution aqueuse de mercuri-iodure de potassium). Introduire dans le tube n°2, 5 gouttes de réactif de Dragendorff (solution aqueuse d'iodo-bismuthite de potassium).

Attendre 15 mn, puis classer les résultats, suivant les critères d'observation :

- Précipité abondant : +++
- Précipitation moyenne : ++
- Réaction louche : +
- Test négatif : 0

Un test négatif permet de conclure à l'absence d'alcaloïde sous toute forme (alcaloïdes vrais ou alcaloïdes quaternaires).

Dans le cas d'un test positif, il faut confirmer la présence d'alcaloïdes par une réaction d'extraction :

Introduire 25 ml de filtrat dans une ampoule à décanter, puis l'alcaliniser par une solution de NH_4OH diluée au 1/2 avec de distillée jusqu'à pH=8-9. Ajouter 25 ml de chloroforme au contenu de l'ampoule. Agiter sans former d'émulsion, puis après décantation, soutirer la phase organique. Reprendre cette opération 3 fois au total. Réunir les phases organiques et les sécher par le sulfate de sodium anhydre. Filtrer et partager la phase organique obtenue en parties égales entre 2 capsules. Mettre la phase organique sous évaporation au bain-marie ou à l'étuve jusqu'à sec. Ensuite, reprendre le résidu sec contenu dans la 1^{ère} capsule par 2 ml de solution HCl diluée au 1/10 par l'eau distillée.

Partager cette solution entre 2 tubes à essais et essayer de nouveau les révélateurs généraux des alcaloïdes, puis classer les résultats selon les critères précédents.

ANNEXE 2

FICHE D'EVALUATION D'ENQUÊTE ETHNOBOTANIQUE REALISEE SUR *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH AUPRES DES TRADIPRATICIENS

1. Quel est le nom local de *nauclea latifolia* ?
2. Utiliser-t-on cette plante pour soigner ?
3. Quelles sont les maladies soignées par cette plante ?
4. Quelle partie (feuilles, fruits, gui, écorces de tronc, écorces de racines, racine totale) de cette plante est-elle utilisée dans le traitement des maladies ?
5. Utilise-t-on cette drogue (matière végétale) à l'état frais ou sec ? Si c'est à l'état sec comment procède-t-on au séchage ? Se fait t-il au soleil ou à l'ombre ?
6. Comment prépare-t-on cette drogue ?
7. Quelle quantité de drogue doit-on utiliser ou préparer et dans quelle quantité d'eau, pendant combien de temps. S'agit-il d'une décoction, d'une infusion, d'une macération ou d'une digestion ?
8. Utilise-t-on le *nauclea latifolia* seul pour soigner ? Ou est-il associé avec d'autres plantes ?

ANNEXE 3

LISTE DE PREPARATION DES DIFFERENTS REACTIFS UTILISES AU COURS DE LA PARTIE EXPERIMENTALE

1. Caractérisation des alcaloïdes

Réactif de Dragendorff

- Nitrate de bismuth pulvérisé.....20,8g
- Iode.....38,10g
- Iodure de sodium.....200g
- Eau distillée.....100ml

Réactif de Valser-Mayer

- Iodure de potassium.....25g
- Chlorure mercurique.....6,7g
- Eau distillée.....200ml

2. Caractérisation des polyphénols

Tanins

Réactif de Stiasny

- Formol 30% / HCl concentré.....10 / 5

Flavonoïdes

Réaction à la cyanidine

- Alcool chlorhydrique (eau+HCl+EtOH v/v/v).....5ml
- Alcool isoamylique.....1ml

3. Caractérisation des composés réducteurs (oses et holosides, mucilages)

Réactif (liqueur) de Fehling

Solution A

- CuSO_435g
 - Eau distillée.....500ml
 - H_2SO_45ml
- Laisser refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Solution B

- Tartrate double de sodium (sel de seignette).....150g
 - Eau distillée.....500ml
- Laisser refroidir et ajouter 300ml de lessive non carbonatée puis compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

4. Caractérisation des hétérosides cyanogénétiques

Préparation du papier picrosodé

- Acide picrique.....1g
 - Eau déminéralisée tiède.....100ml
 - $\text{Na}_2\text{CO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$10g
- Chauffer le liquide à 50°C, tremper les bandes de papier filtre puis sécher

5. Caractérisation des hétérosides cardiotoniques

Réactif de Baljet

- Acide picrique.....1g
- Ethanol 50°.....100ml

Réactif de Kedde

- Acide dinitro 3, 5 benzoïque.....1g
- Ethanol 96°.....100ml

Réactif de Raymond Marthoud

- 1, 3 dinitrobenzène.....1g
- Ethanol 96°.....100ml

6. Révélateur des plaques CCM

Révélateur phosphomolybdique

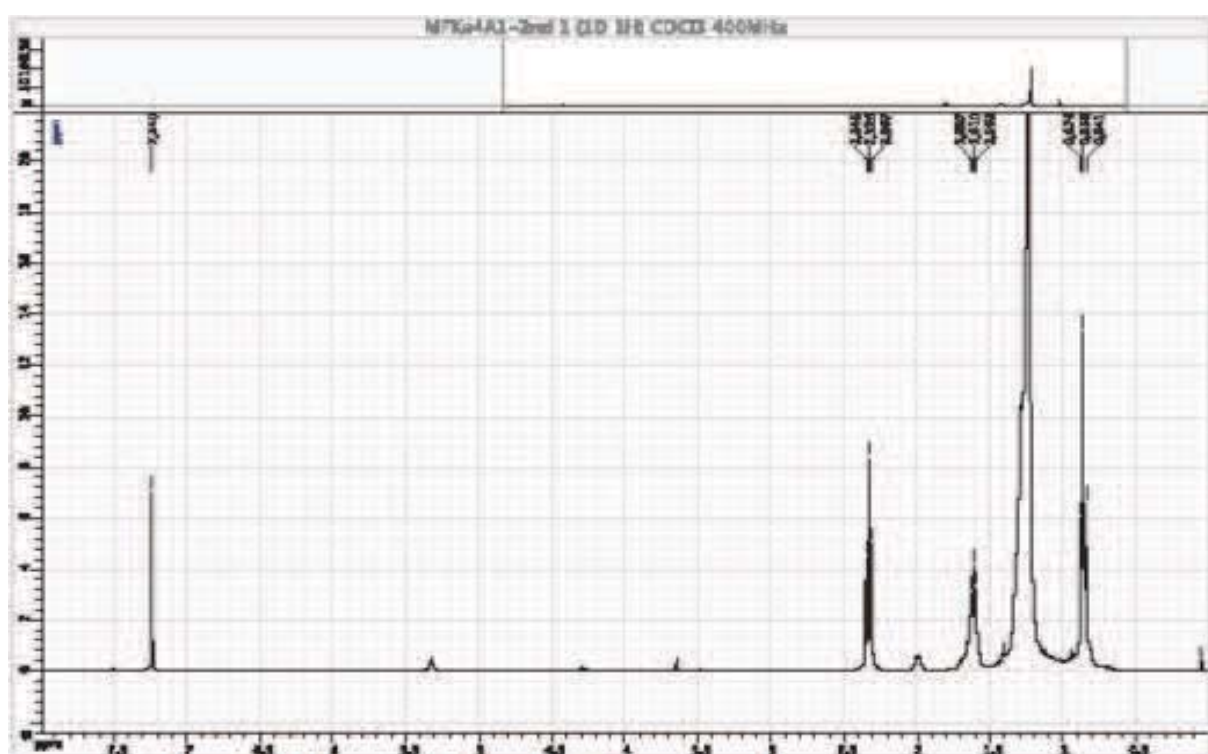
- Acide phosphomolybdique.....5g
- EtOH.....100ml

Révélateur Para anisaldéhyde

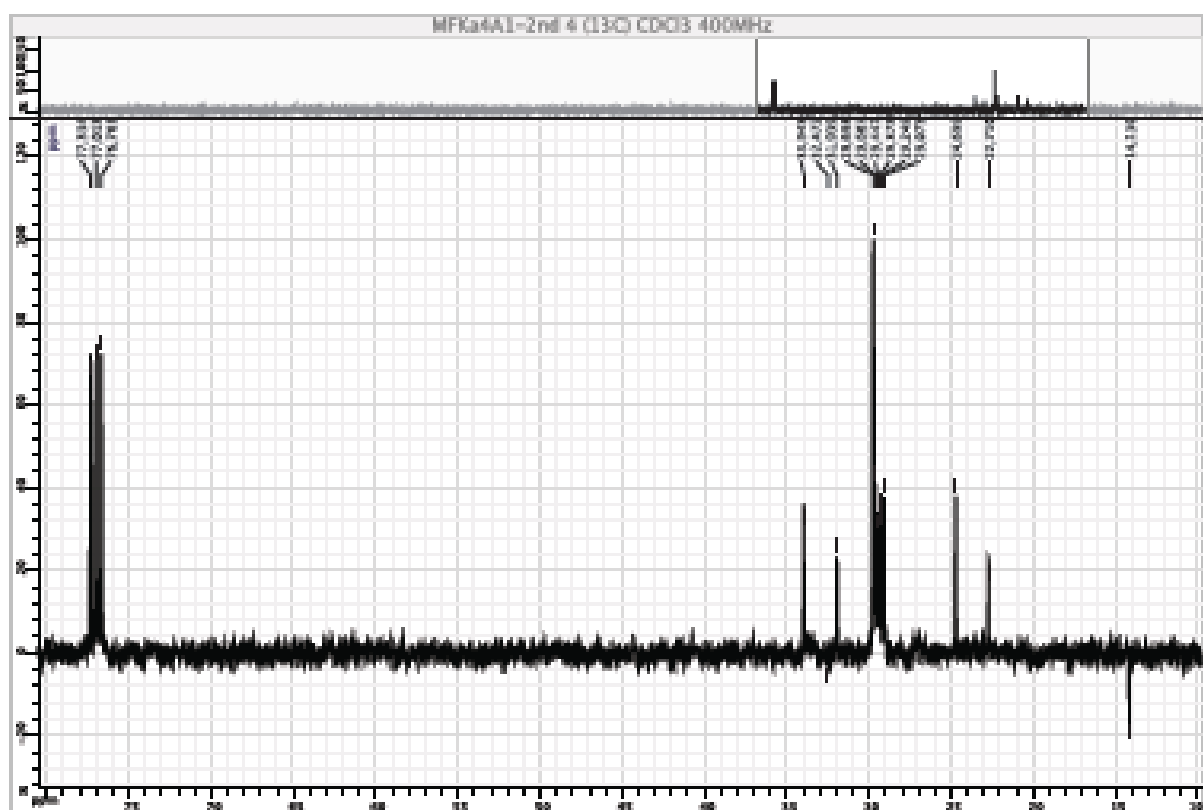
- *P*-anisaldéhyde.....2,6ml

- EtOH.....93ml
- AcOH.....1,1ml
- H₂SO₄.....3,5ml

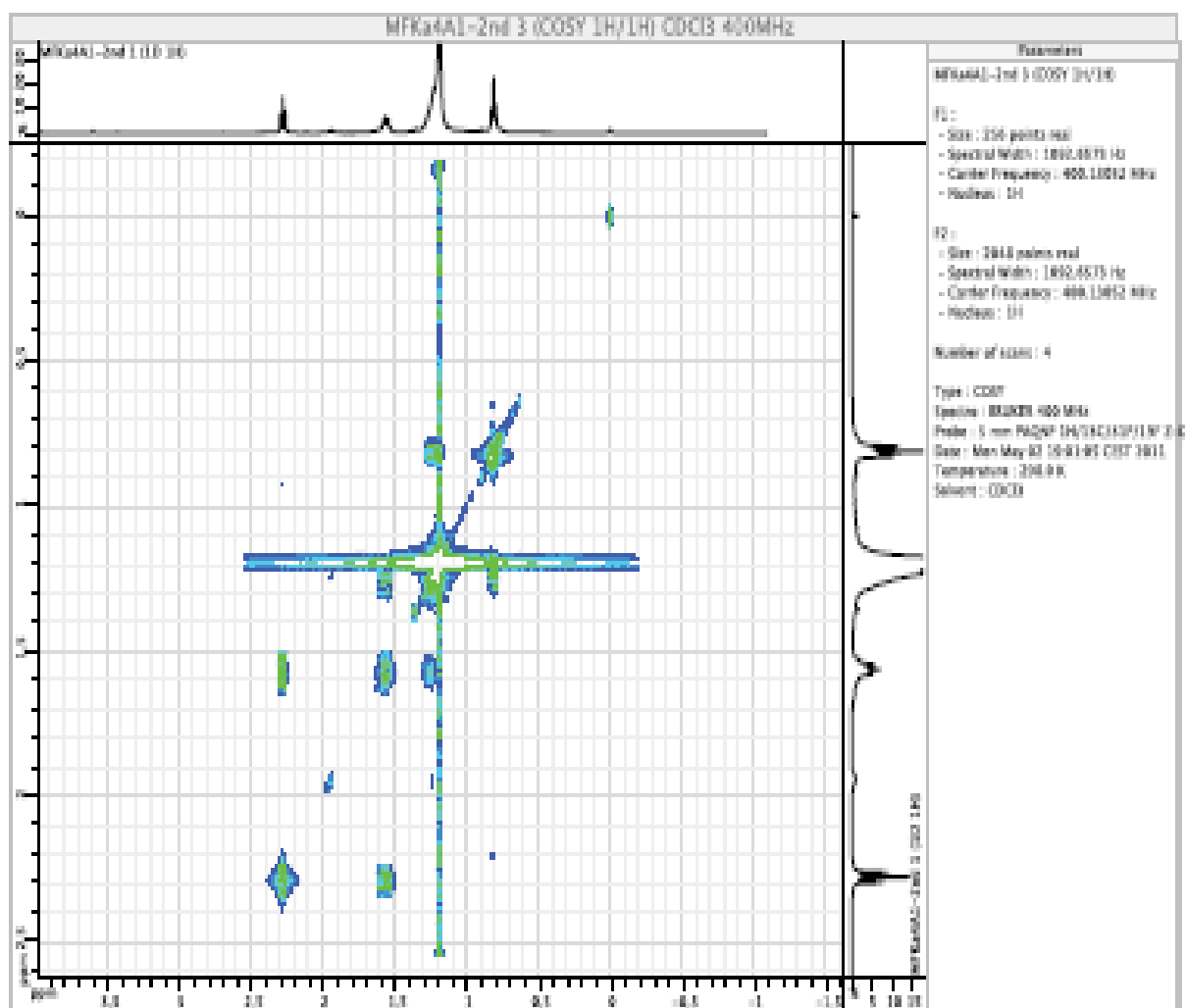
ANNEXE 4



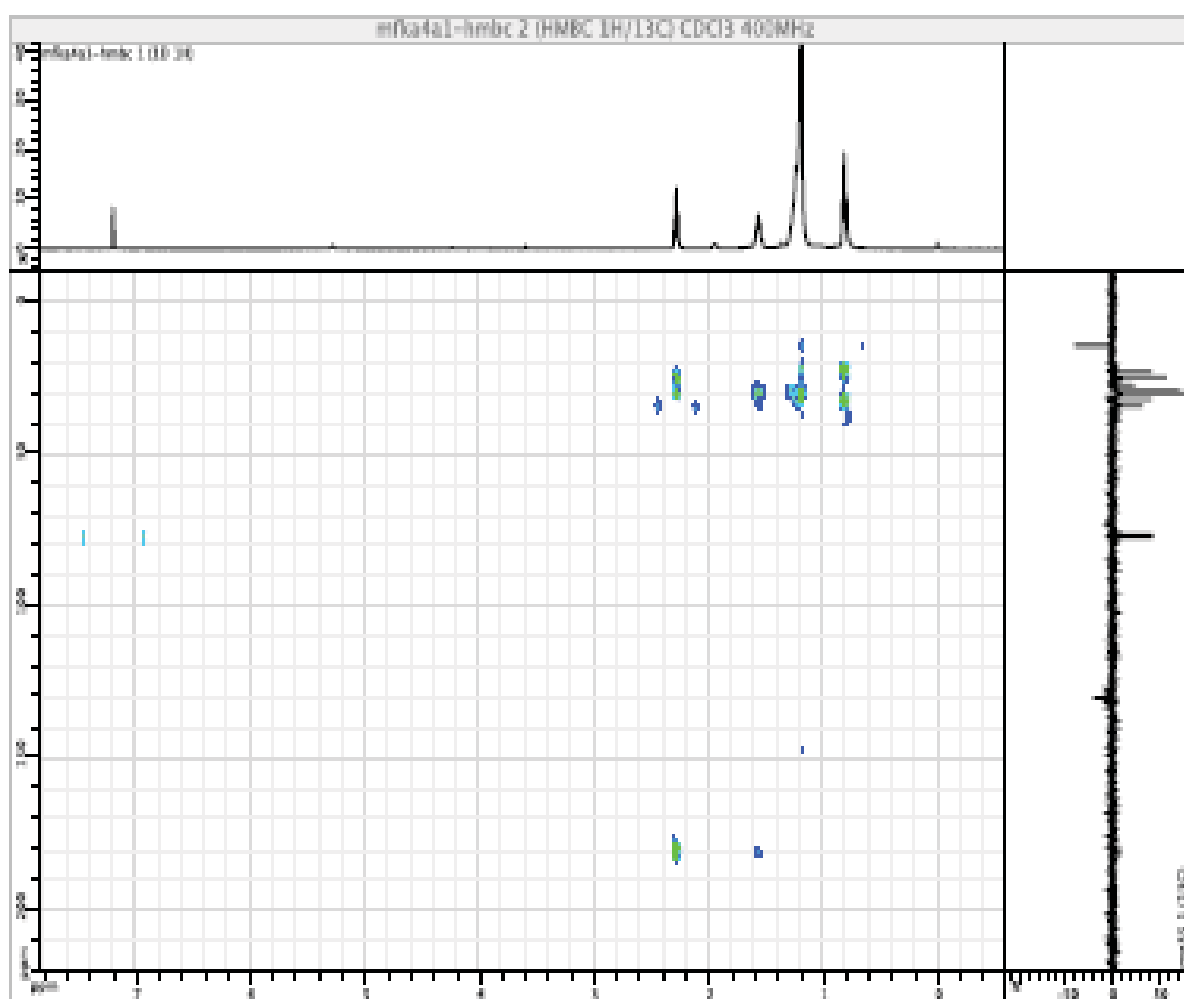
Spectre 3 : RMN ¹H du produit A isolé de la fraction FKa₄



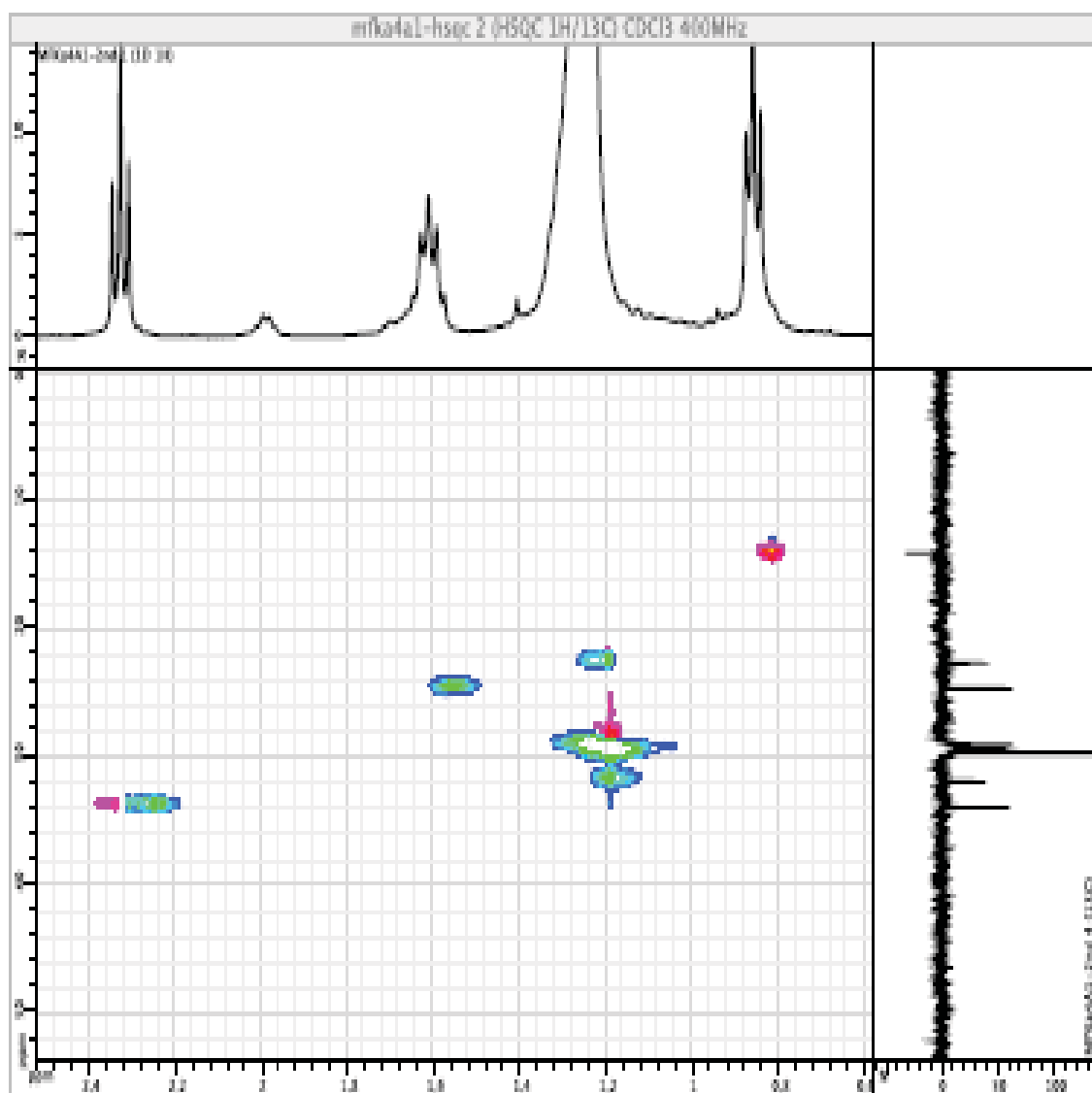
Spectre 4 : RMN ¹³C (J-mode) du produit A isolé de la fraction FKa₄



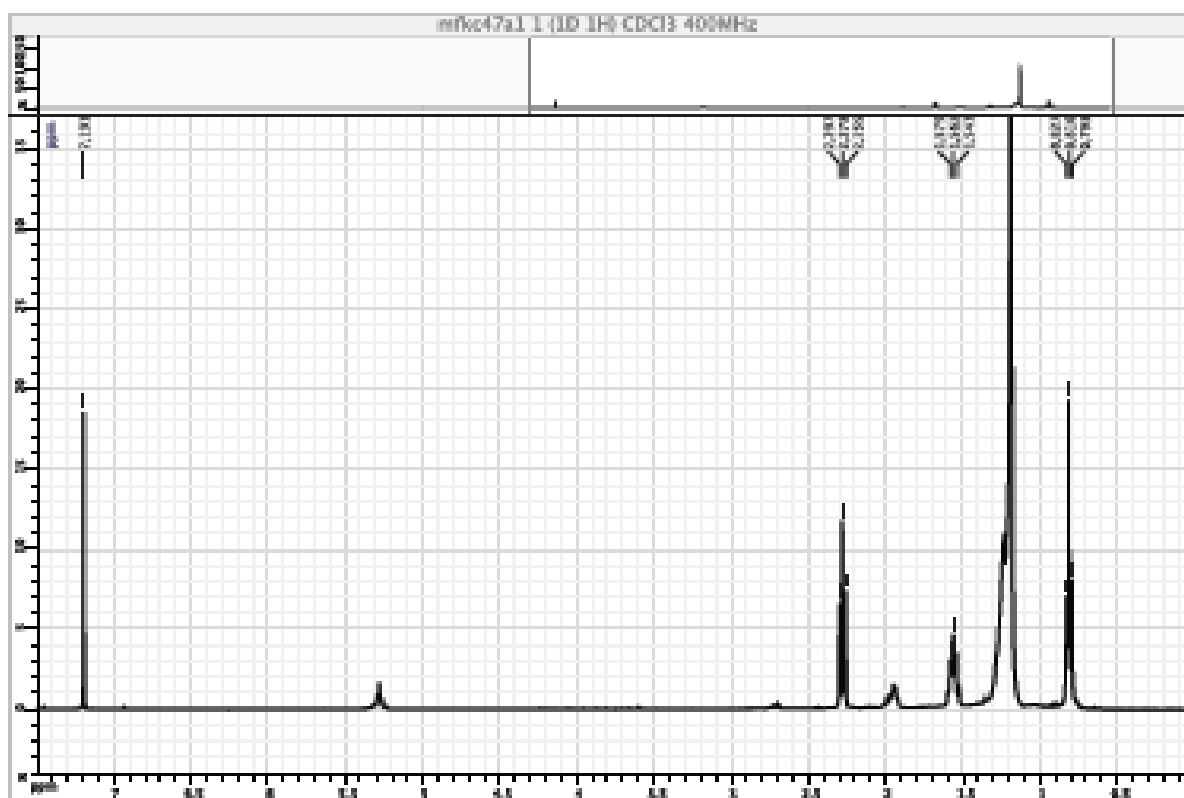
Spectre 5 : RMN en 2D ^1H - ^1H (COSY) du produit A isolé de la fraction FKa4



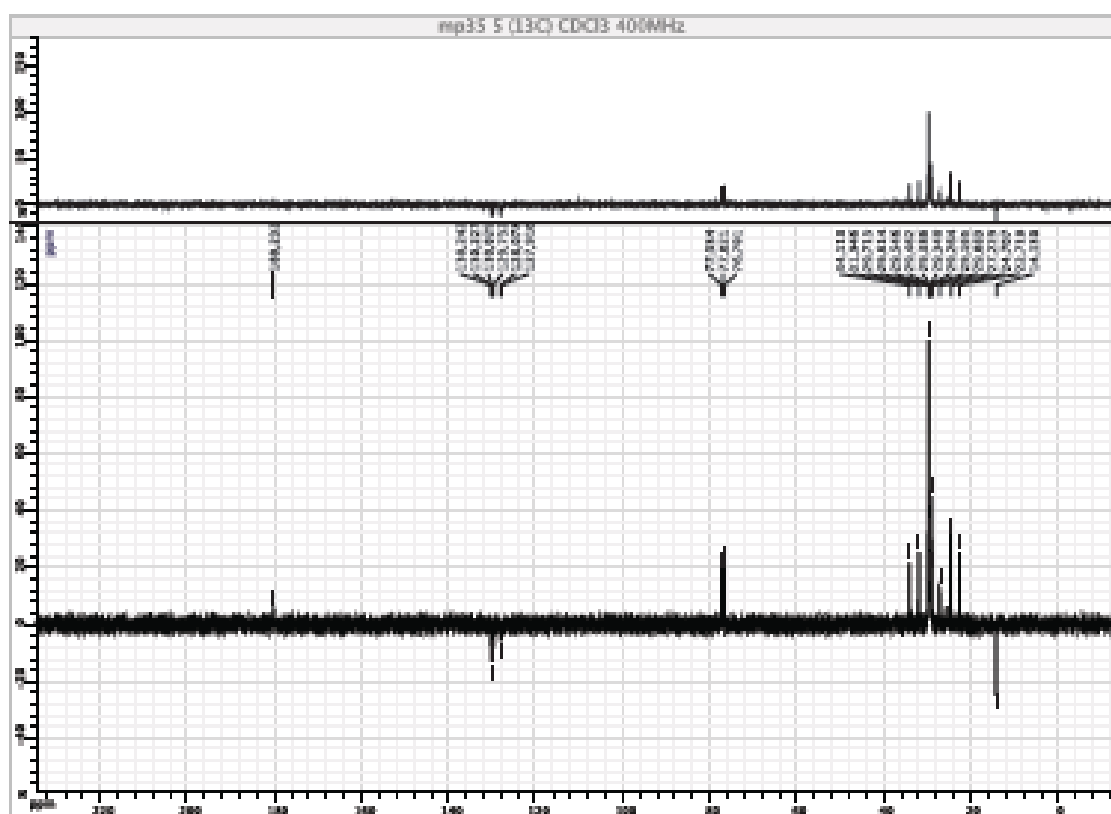
Spectre 6 : RMN ^1H - ^{13}C (HMBC) du produit A isolé de la fraction FK a_4



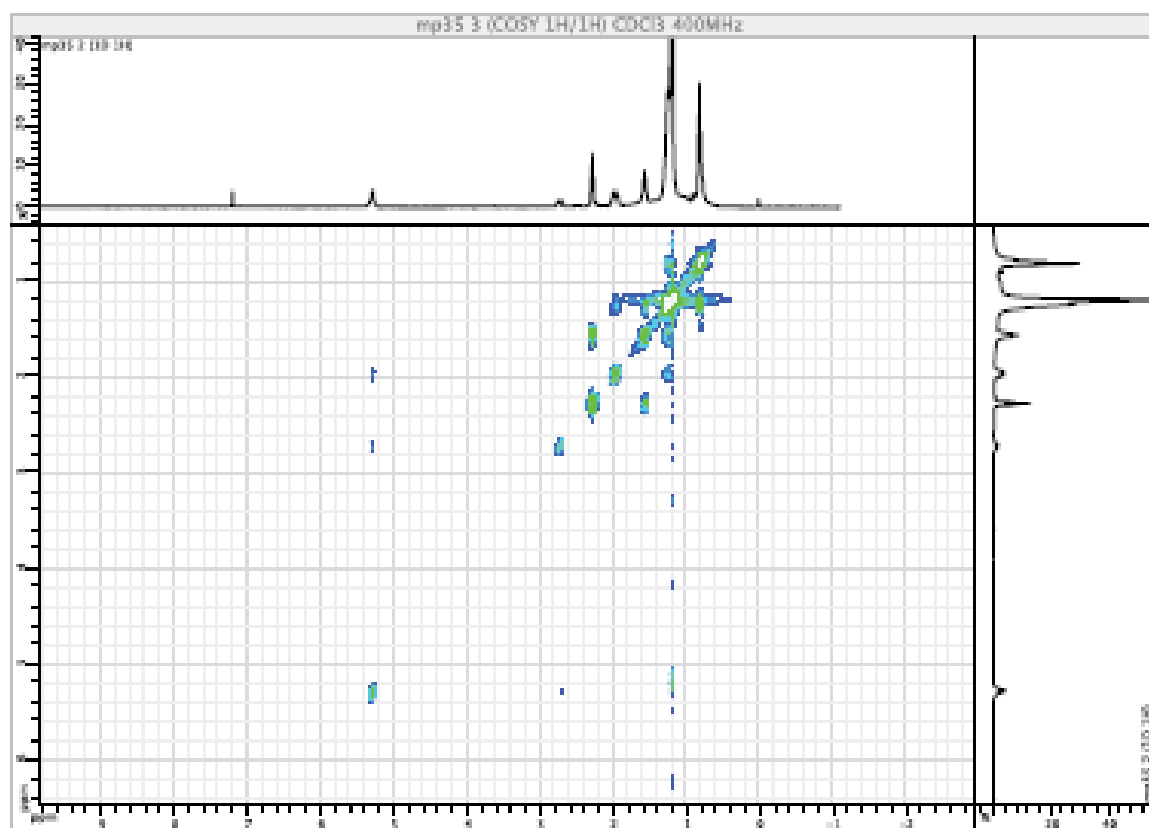
Spectre 7 : RMN ^1H - ^{13}C (HSQC) du produit A isolé de la fraction FKa₄



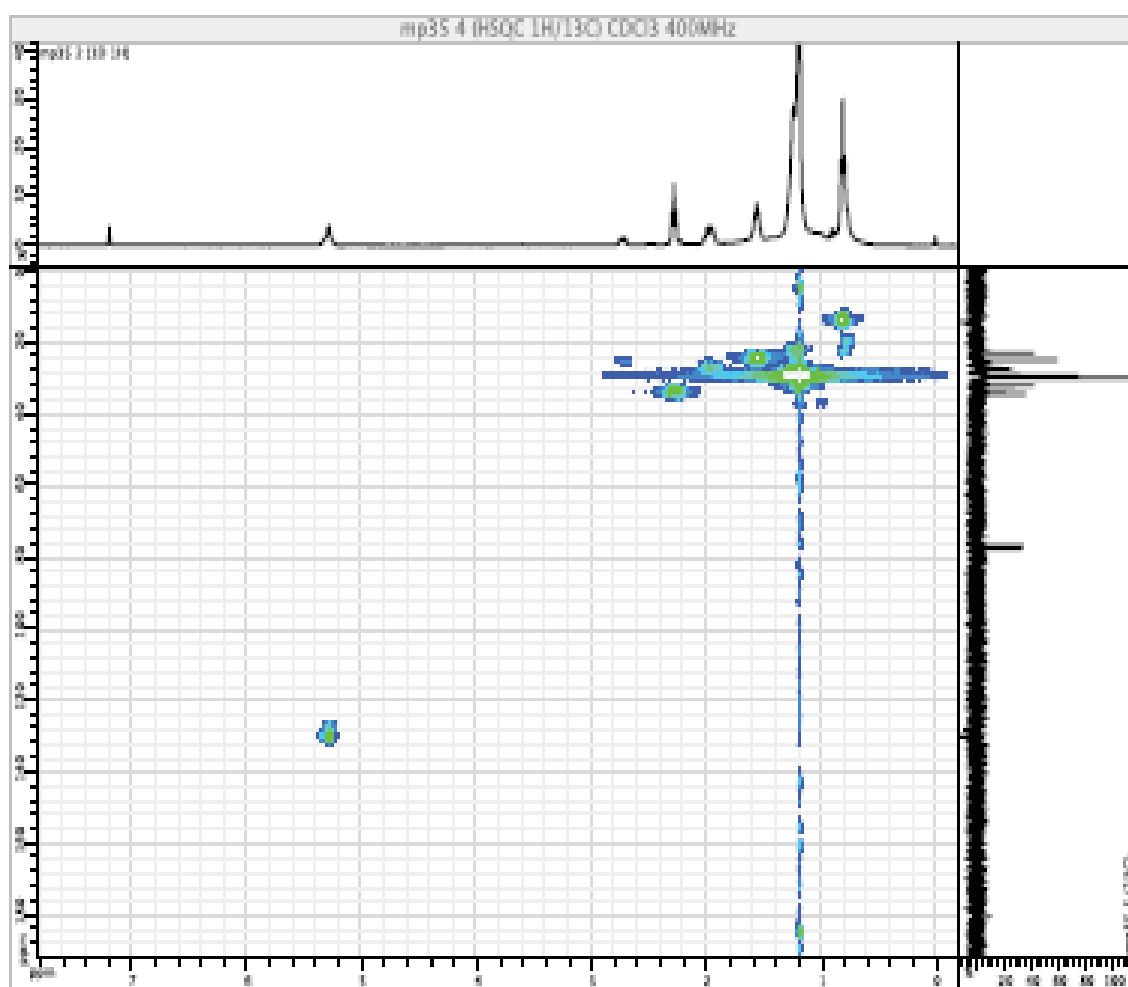
Spectre 8 : RMN ^1H du produit A isolé de la fraction FK_i₄₋₇



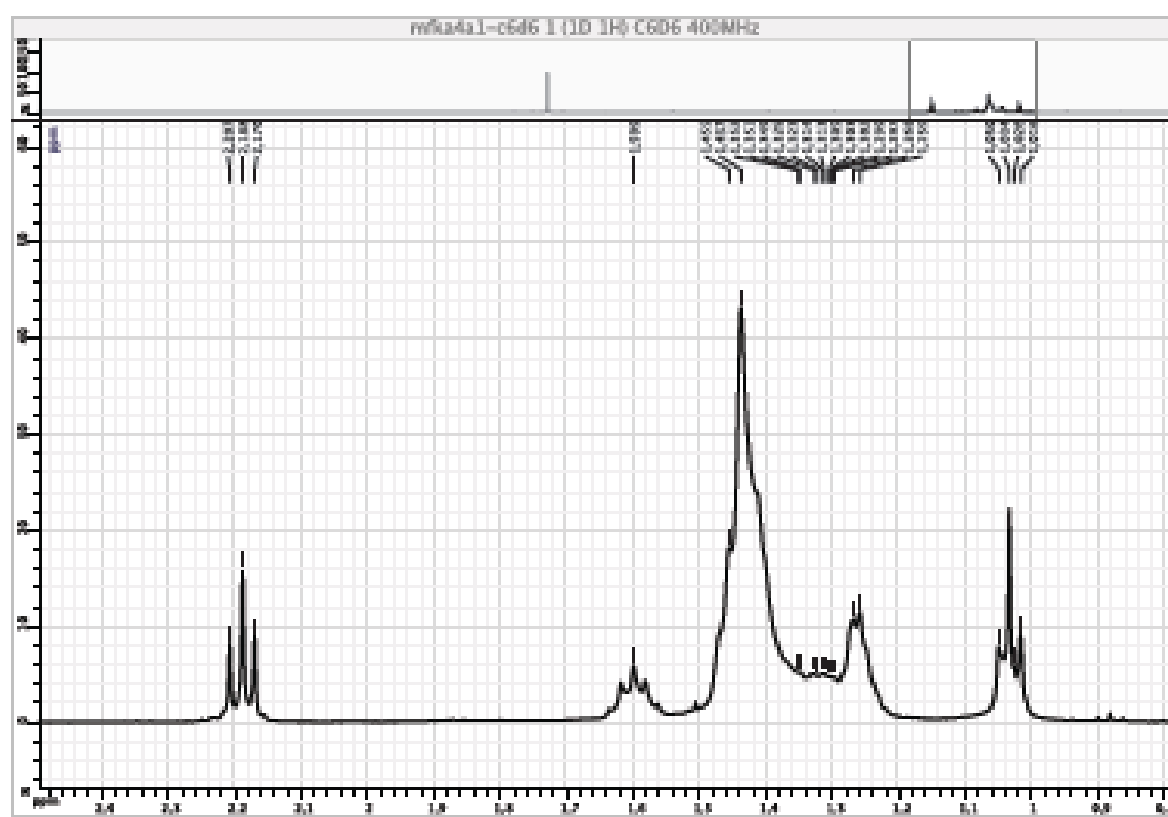
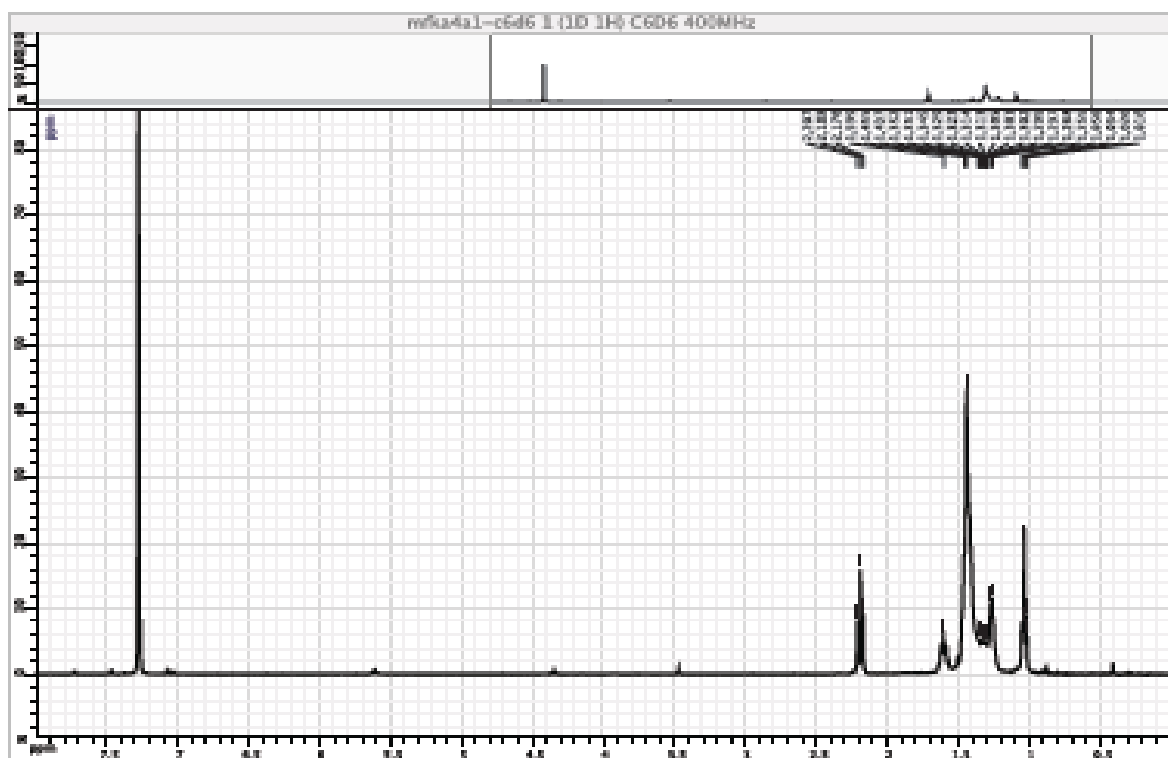
Spectre 9: RMN ^{13}C du produit A isolé de la fraction FK_i₄₋₇



Spectre 10 : RMN en 2D ^1H - ^1H (COSY) du produit A isolé de la fraction Fki₄₋₇



Spectre 11 : RMN ^{13}C - ^1H (HSQC) du produit A isolé de la fraction FK_i₄₋₇



Spectres 12 et 13 : RMN ^1H du produit A isolé de la fraction FKa₄ dans le C₆D₆

ANNEXE 5

ACTIVITE ANTITUMORALE DES EXTRAITS D'ALCALOÏDES TOTAUX DE *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH

PROTOCOLE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES MCF-7

Criblage 1N des cellules MCF-7 + 2 extraits d'alcaloïdes totaux

Partie I : Ensemencement des cellules

1. Préparation du milieu complet

90% RPMI culture + 10% du sérum SVF + 1% Glutamine

Exemple : 20 ml : 18 ml RPMI + 2ml SVF + 200 µl Glutamine

2. Récupération des cellules MCF-7

- Prendre un flasque T25 MCF-7 et observer l'état des cellules au microscope, les cellules vivantes adhèrent au fond et les mortes flottent.
- A l'aide d'une trompe à vide, aspirer les cellules mortes qui flottent dans le milieu en maintenant le sens vertical.
- Rincer les cellules avec 2 ml de PBS (dépôt côté opposé aux cellules pour ne pas les abîmer) et aspirer le PBS avec la trompe à vide.
- Ajouter 1 ml de trypsine 2x pour décoller les cellules et laisser agir 2-3 mn à l'incubateur sous 37°C.
- Bien observer l'état des cellules au microscope, ensuite inhiber la trypsine par l'ajout de 2 ml du milieu complet en balayant dans l'autre sens.
- Aspirer et refouler la suspension pour bien suspendre à nouveau les cellules et transférer le tout dans un falcon de 15 ml.
- Remuer de temps en temps pour que les cellules tombent au fond du tube sinon elles sédimentent.

3. Numération des cellules MCF-7

- Préparer une lame de Malassez surmontée de 2 lamelles pour le dénombrement des cellules.

- Effectuer une dilution des cellules au 1/10 en Bleu du Trypan (BT): 90 µl BT + 10 µl de cellules à mélanger dans un puits et reprendre la même opération dans un second puits.
- Prélever une partie de la dilution de chaque puits pour faire dépôt sur les 2 cotés de la lame contre les lamelles.
- Faire le décompte au microscope : compter 10 carrés x 2 de cellules contenues dans la lame de Malassez soit dans 1 µl.

Le nombre de cellules comptées = à la moyenne des cellules pour les 2 dépôts. On aura donc :

- ✓ Nombre de cellules / µl que l'on multiplie par 10 (dilution au 1 / 10) et par 1000 (volume de la grille en ml)

- ✓ Exemple de numération :

	Numération 1	Numération 2	Moyenne numération	41,5x10x1000= 415000 cell/ml	Nombre Cellules/ml
N1	47	36	41,5		415000

4. Dilution de la suspension cellulaire

- Faire une dilution de la suspension cellulaire à 50000 cellules / ml (exemple 17 ml volume final)
- Appliquer la formule $C_i V_i = C_f V_f$ avec :
 - ✓ C_i = Nombre cellules / ml
 - ✓ C_f = Suspension cellulaire à 50000 cellules / ml
 - ✓ V_f = 17 ml
$$C_i = C_f V_f / V$$

	Nbre cellules / ml	50000x17x415000 =1,683	Volume suspensio n cellulaire à prélever	17- 1,683= 15,317 ml	Volume de milieu à rajouter pour $V_f = 17$ ml
N1	415000		1,683 ml		15,317

5. Ensemencement des cellules dans les puits (96 puits par plaque soit 10000 cellules par puits)

Plaque N1

- Répartir 200 µl de dilution de la suspension cellulaire par puits selon le plan de la plaque (partie verte). Soient 10 puits par colonne x 6 lignes.
- Distribuer 200 µl par puits d'eau stérile aux alentours (partie rouge).
- Incuber 24 h à 37°C.

- Ré

Plaque N1

A
B
C
D
E
F
G
H

114

Plaque T0 :

A 10x10 grid with a 3x5 orange rectangle and a 5x3 blue rectangle.

Partie II : Mise en solution des extraits d'alcaloïdes totaux

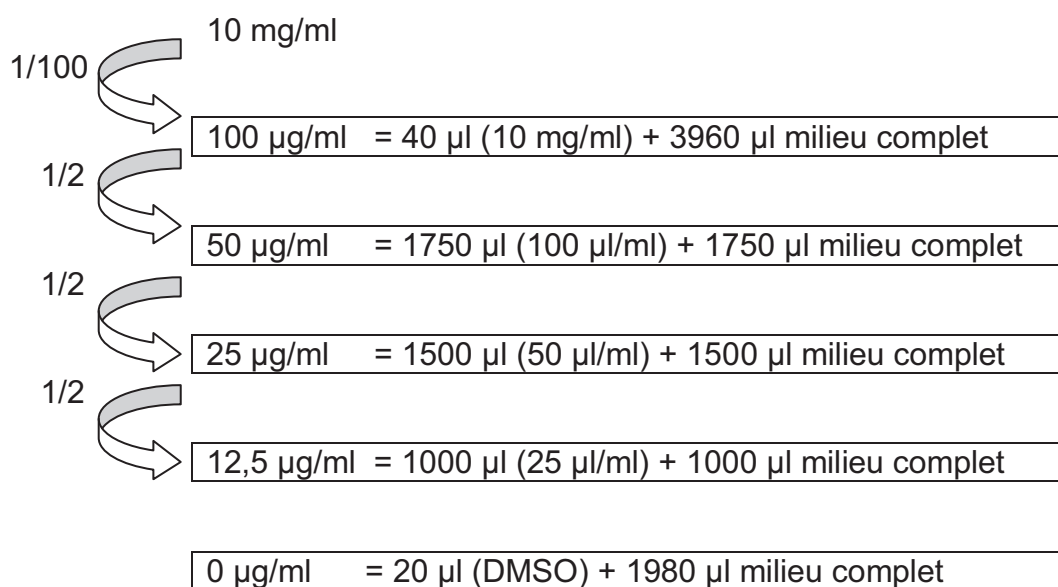
6. Préparation du milieu complet

Préparer 25 ml du milieu complet : 22,5 ml RPMI culture + 2,5 ml SVF + 250 μ l Glutamine.

7. Préparation des extraits d'alcaloïdes totaux

- Peser de 5 à 10 mg d'extrait d'alcaloïdes totaux pour la solution mère
- Diluer dans le DMSO pour concentration = 10mg / ml
 - ✓ Exemple : 11,3 mg d'extrait de FKo à dissoudre dans 1130 μ l de DMSO et 10,3 mg d'extrait de EKa dans 1030 μ l de DMSO.
- Réaliser la gamme d'extrait (pour 1 extrait et 1 seule gamme)
Schéma de la gamme d'extrait

Facteur de dilution Concentration



- Après 24 h sous incubation, prendre la plaque N1.
- Vider le milieu contenu dans la plaque N1 dans un saut.
- Distribuer 200 μ l par puits d'une gamme d'extrait en raison d'une colonne par concentration (voir le plan de la plaque).
- Incuber la plaque N1 à l'étuve sous 37°C pendant 72 h.

	µg/ml	0	12,5	25	50	100	0	12,5	25	50	100	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

FKo
EKa

8. Lecture de la plaque T0

- Préparer une solution de résazurine diluée au 1/50.
200 µl/puits x 3 colonnes x 6 lignes = 3600 µl (volume total à préparer 5 ml)
5000 µl / 50 = 100 µl de résazurine
- Préparer 4,9 ml de milieu + 100 µl de résazurine.
- Prendre la plaque T0 et vider son contenu
- Mettre 200 µl de solution (milieu + résazurine) par puits selon le plan de la plaque T0. 2 colonnes pour cellules + résazurine et 1 colonne pour résazurine seule.
- Incuber durant 2 h et faire la lecture au fluoreskan.

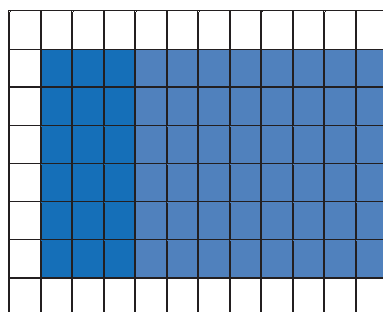
A									
B	■	■	■						
C	■	■	■						
D	■	■	■						
E									
F									
G									
H									

- La lecture de la plaque T0 permet de mesurer la prolifération des cellules après 24 h.

Partie III : Mesure de la prolifération cellulaire de la plaque N1

9. Préparation de la résazurine pour la plaque N1

- Préparer 14 ml de solution diluée de résazurine au 1/50
200 µl/puits x 11 colonnes x 6 lignes (volume total à préparer ≈14 ml)
 $14000 \text{ µl} / 50 = 280 \text{ µl}$ de résazurine
13720 µl de milieu RPMI + 280 µl de résazurine.
- Vider le contenu de la plaque N1.
- Distribuer 200 µl/puits de solution milieu + résazurine (10 colonne pour cellules + résazurine et 1 colonne pour résazurine seule).
- Laisser incubé 2 heures puis lecture au fluoroskan.



Tableaux complets de l'activité antiproliférative des extraits alcaloïdiques sur les cellules MCF-7

Tableau 23 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Kanadjiguila.

FKa	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	0	2,9336267	34,2989855
	0	0	0	0	33,9200587
	30,46082386	20,8287495	19,3863831	60,1515707	82,019313
Moyennes	10,15360795	6,94291651	6,46212769	21,0283991	50,0794524
SEM	10,15360795	6,94291651	6,46212769	19,5799086	15,9703049

Tableau 24 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Kita.

FKi	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	0	31,6335012	89,2338532
	2,884662397	0	0	42,590329	91,3900161
	18,87253704	24,4462915	0	66,2641177	90,5099496
Moyennes	7,252399811	8,14876383	0	46,829316	90,3779397
SEM	5,869440948	8,14876383	0	10,2192084	0,62592055

Tableau 25 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Lafiabougou.

FLf	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	2,72484119	26,1952524	55,8843196	100
	0	0	31,0598462	61,2504179	100
	28,85322635	15,3627549	27,7499164	77,4490137	100
	0,468070879	9,74590438	40,0869274	70,9796055	100
	0	11,701772	45,4028753	57,0879305	100
	0	16,3156135	39,0839184	61,4510197	100
Moyennes	4,886882871	9,308481	34,9297894	64,0170512	100
SEM	4,793878095	2,71824362	3,1430217	3,45102587	0

Tableau 26 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Lassa.

FLs	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	0	49,2570415	100
	0	6,34286982	23,2424041	46,5956975	100
	0	20,9802617	48,5917055	43,6682191	100
	20,11532491	8,5384786	22,7101353	65,8239077	100
	6,342869816	0	35,3515192	71,1465957	100
	3,149257041	0,68751386	34,4200488	66,0900421	100
Moyennes	4,934575294	6,09152066	27,3859688	57,0969173	100
SEM	3,207677839	3,32235823	6,71226583	4,8528319	0

Tableau 27 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des feuilles de Koulouba.

FKo	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	59,0865821	98,1329237	100
	0	0	62,4745792	99,4050452	100
	8,071913807	0	61,410151	99,0805244	100
	0	0	65,1616114	99,0156203	100
	0	0	63,1885249	99,8983168	100
	0	0	55,5038726	99,5348535	100
Moyennes	1,345318968	0	61,1375535	99,1778807	100
SEM	1,345318968	0	1,39291441	0,24669842	0

Tableau 28 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Kanadjiguila.

EKa	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	58,5291488	97,3293532	100	100
	7,114807484	61,2684375	97,8274057	100	100
	0	58,4908371	97,1856842	100	100
	3,092075857	56,9104783	97,492178	100	100
	23,33024711	53,5869357	97,1186387	100	100
	0	54,1232999	97,070749	100	100
Moyennes	5,589521742	57,1515229	97,3373348	100	100
SEM	3,728383604	1,19128951	0,11634768	0	0

Tableau 29 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Lafiabougou.

ELf	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	50,5847677	96,7464621	100	100
	0	56,7630888	97,018535	100	100
	9,21835736	59,2230808	96,3043437	100	100
	2,994690801	45,9595292	96,5537438	100	100
	0	51,1515861	96,5537438	100	100
	0	49,9272583	95,6128252	100	100
Moyennes	2,035508027	52,2682185	96,4649423	100	100
SEM	1,517525704	1,98271278	0,19607695	0	0

Tableau 30 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Lassa.

ELs	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	1,828788945	0	66,3494559	98,7339153	100
	7,886135132	0	68,1120444	99,6152096	100
	0	0	60,0066201	99,1062932	100
	0	0	63,8421118	99,4041955	100
	0	0	66,6721834	99,143531	100
	7,550995076	0	61,1734039	98,2001738	100
Moyennes	2,877653192	0	64,3593032	99,0338864	100
SEM	1,55850137	0	1,32610307	0,20634837	0

Tableau 31 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des écorces de Koulouba.

EKo	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	19,6989559	68,7883328	82,3493609
	15,34481951	0	16,8898357	72,4401891	85,9099209
	0	0	20,26078	70,8179222	86,1065593
	2,071726204	0	21,7355681	72,6368276	86,5981553
	0	0	7,61973875	67,3837726	85,7554193
	0	0	5,37244253	62,9453626	85,1514584
Moyennes	2,90275762	0	15,2628868	69,1687345	85,3118124
SEM	2,511304605	0	2,86029609	1,50012285	0,62296746

Tableau 32 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des racines de Kanadjiguila.

RKa	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	36,8323731	84,7960634	99,6041995	97,4127787
	8,252212051	58,9758088	88,2619925	99,274111	100
	10,9662729	44,9745557	86,8132708	100	100
	0	40,9768174	89,5089934	100	100
	0	39,5372649	87,8310436	100	100
	0	47,4135428	83,5215551	100	100
Moyennes	3,203080826	44,7850604	86,7888198	99,8130517	99,5687965
SEM	2,055884112	3,23321035	0,91837732	0,12568148	0,43120355

Tableau 33 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des racines de Lafiabougou.

RLf	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	0	56,4928683	91,4101304	100
	5,591117958	0	57,3136073	94,6612128	100
	0	0	61,2419985	95,3544583	100
	3,599033175	0	64,7161943	96,0795771	100
	0	0	60,8993599	95,6891285	100
	0	0	56,7478552	94,6373078	100
Moyennes	1,531691855	0	59,5686472	94,6386358	100
SEM	1,002283396	0	1,33629625	0,6859545	0

Tableau 34 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des racines de Lassa.

RLs	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	28,2915167	81,3020418	98,0708456	100
	0	27,4670917	84,3689027	100	100
	1,827475336	30,0310533	85,1191294	100	100
	1,662590343	29,3880019	85,4076781	100	100
	0,590837891	28,8438814	83,189975	100	100
	5,537387672	29,5611311	82,926159	99,6537415	100
Moyennes	1,60304854	28,930446	83,718981	99,6207645	100
SEM	0,850431982	0,38190695	0,63204749	0,31509863	0

Tableau 35 détaillé de l'extrait des alcaloïdes totaux des racines de Koulouba.

RKo	% d'inhibition				
Concentrations	0 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Valeurs	0	29,5865575	82,1249124	99,5422761	100
	8,573004726	28,5130682	88,6731971	99,8374856	100
	0	33,8984062	85,2022484	100	100
	0	18,6816955	86,508327	100	100
	5,978738948	25,8830195	84,656558	99,998509	100
	0	16,4452595	82,6437656	99,1576091	100
Moyennes	2,425290612	25,5013344	84,9681681	99,75598	100
SEM	1,570026774	2,73822359	0,99562666	0,14003239	0

ANNEXE 6

ACTIVITE ANTALGIQUE DES EXTRAITS D'ALCALOÏDES TOTAUX DE *NAUCLEA LATIFOLIA* SMITH

Tableau 40 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles, écorces et racines du site de Kanadjiguila.

Temps	Véhicule	RKa	FKa	EKa	Morphine
0'-5'	8,45	6,50	6,14	6,43	0,00
5'-10'	14,95	13,25	13,29	11,14	0,50
10'-15'	11,55	10,63	10,57	10,29	0,63
15'-20'	8,15	9,38	7,71	7,57	0,38
20'-25'	6,55	6,38	7,86	5,57	0,00

Tableau 41 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles, écorces et racines du site de Lafiabougou.

Temps	Véhicule	RLf	FLf	ELf	Morphine
0'-5'	8,45	5,00	4,33	4,33	0,00
5'-10'	14,95	12,29	13,00	12,67	0,50
10'-15'	11,55	8,43	12,17	11,00	0,63
15'-20'	8,15	7,29	8,50	8,33	0,38
20'-25'	6,55	5,00	5,83	5,50	0,00

Tableau 42 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles et racines du site de Koulouba.

Temps	Véhicule	RKo	FKo	Morphine
0'-5'	8,45	6,29	6,13	0,00
5'-10'	14,95	13,43	9,75	0,50
10'-15'	11,55	13,71	8,50	0,63
15'-20'	8,15	10,57	6,88	0,38
20'-25'	6,55	8,57	5,50	0,00

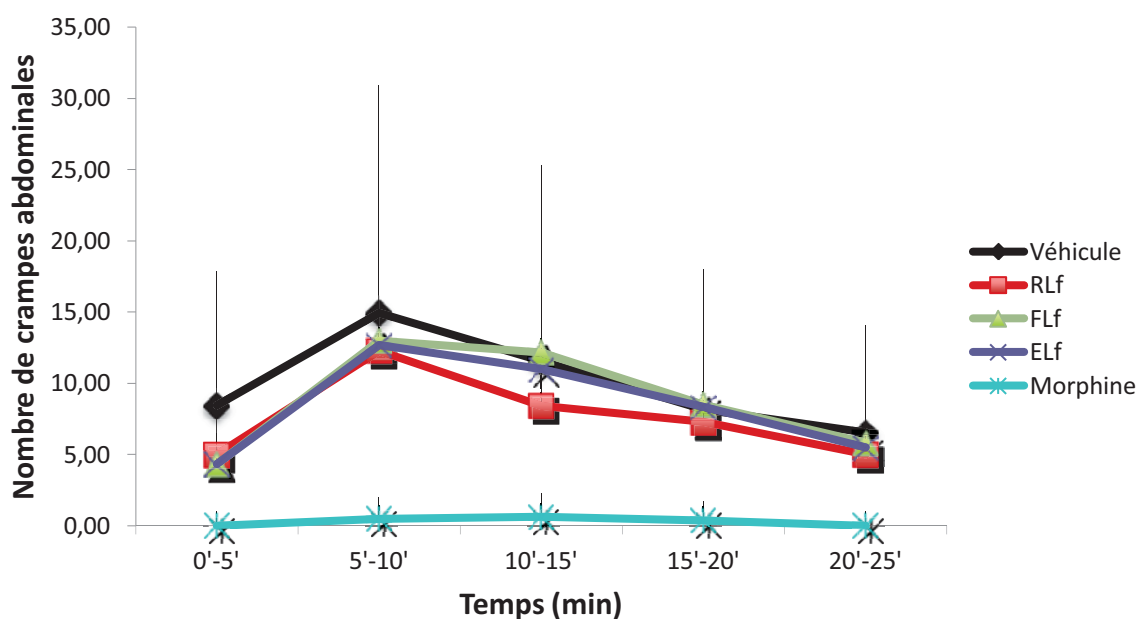
Tableau 43 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles et écorces du site de Lassa.

Temps	Véhicule	FLs	ELs	Morphine
0'-5'	8,45	3,25	7,75	0,00
5'-10'	14,95	9,50	15,88	0,50
10'-15'	11,55	8,50	14,63	0,63
15'-20'	8,15	7,00	9,75	0,38
20'-25'	6,55	6,75	9,38	0,00

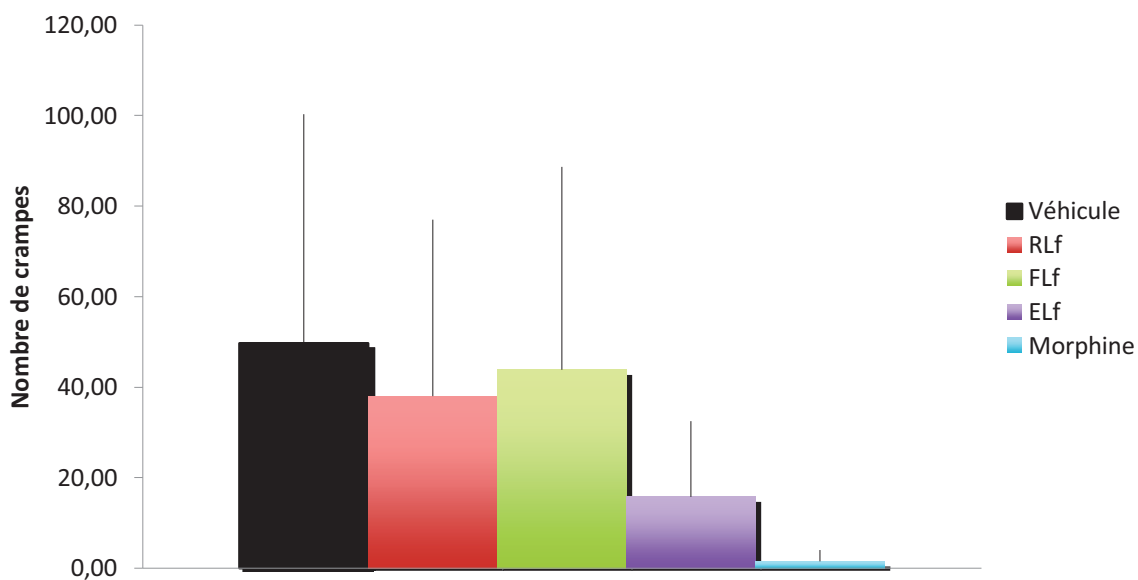
Tableau 44 : Nombre de crampes comptabilisées sur 25 mn au niveau des feuilles du site de Kita.

Temps	Véhicule	FKi	Morphine
0'-5'	8,45	5,88	0,00
5'-10'	14,95	12,75	0,50
10'-15'	11,55	10,13	0,63
15'-20'	8,15	7,25	0,38
20'-25'	6,55	7,13	0,00

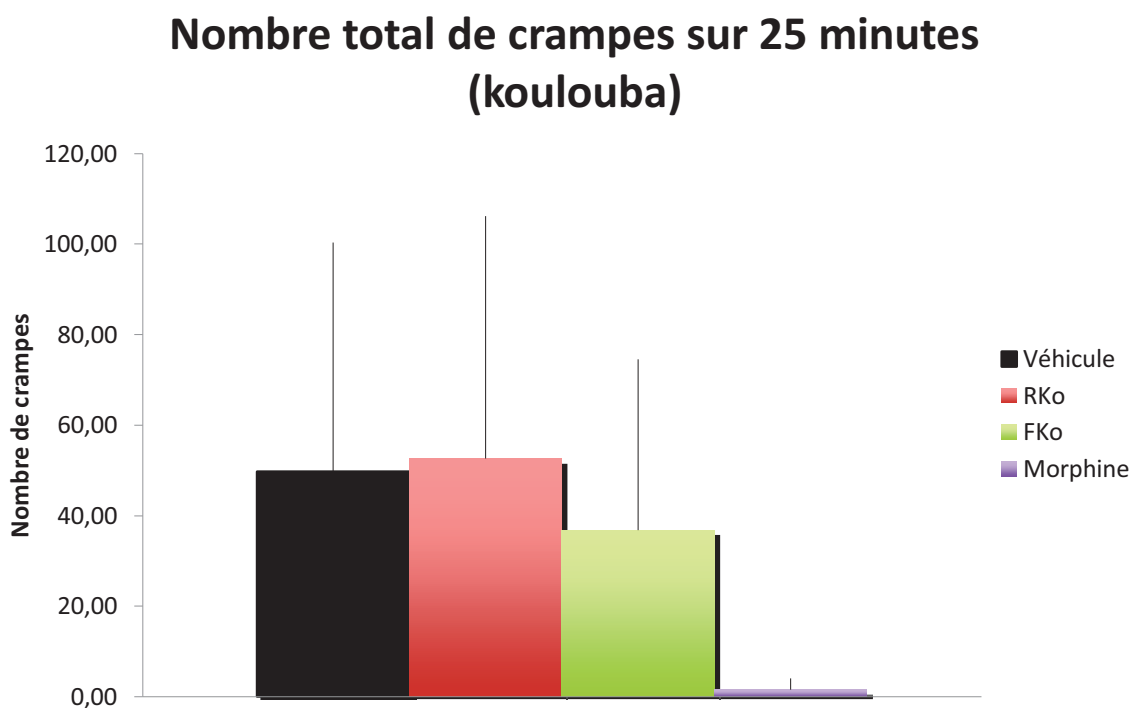
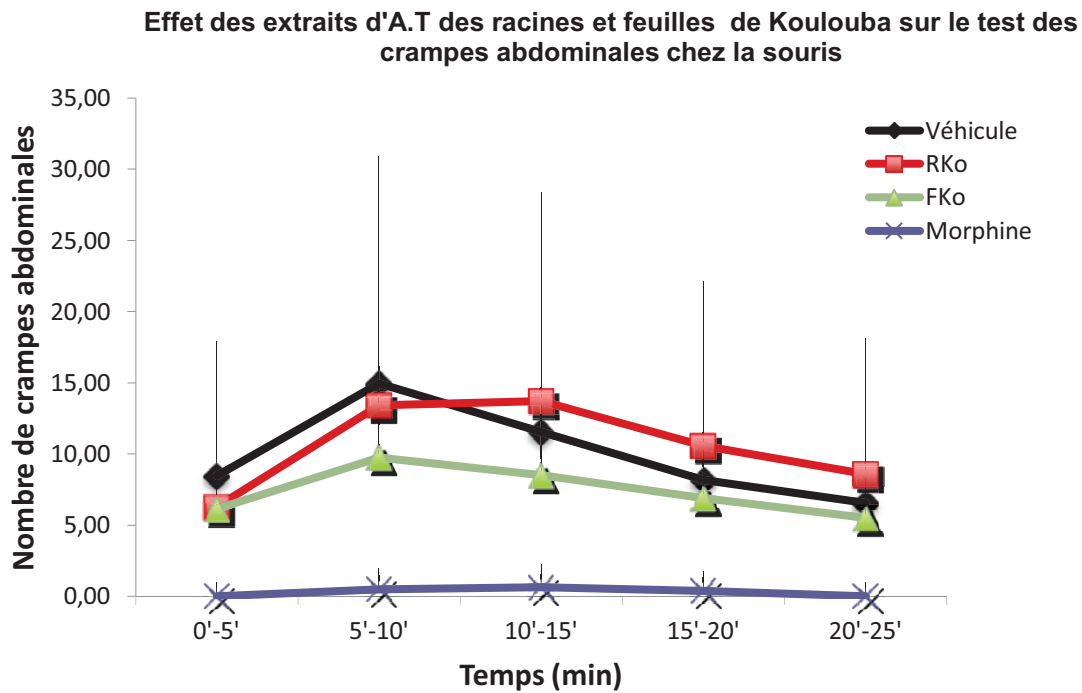
Effet des extraits de racines, feuilles et écorces de Lafiabougou sur le test des crampes abdominales chez la souris



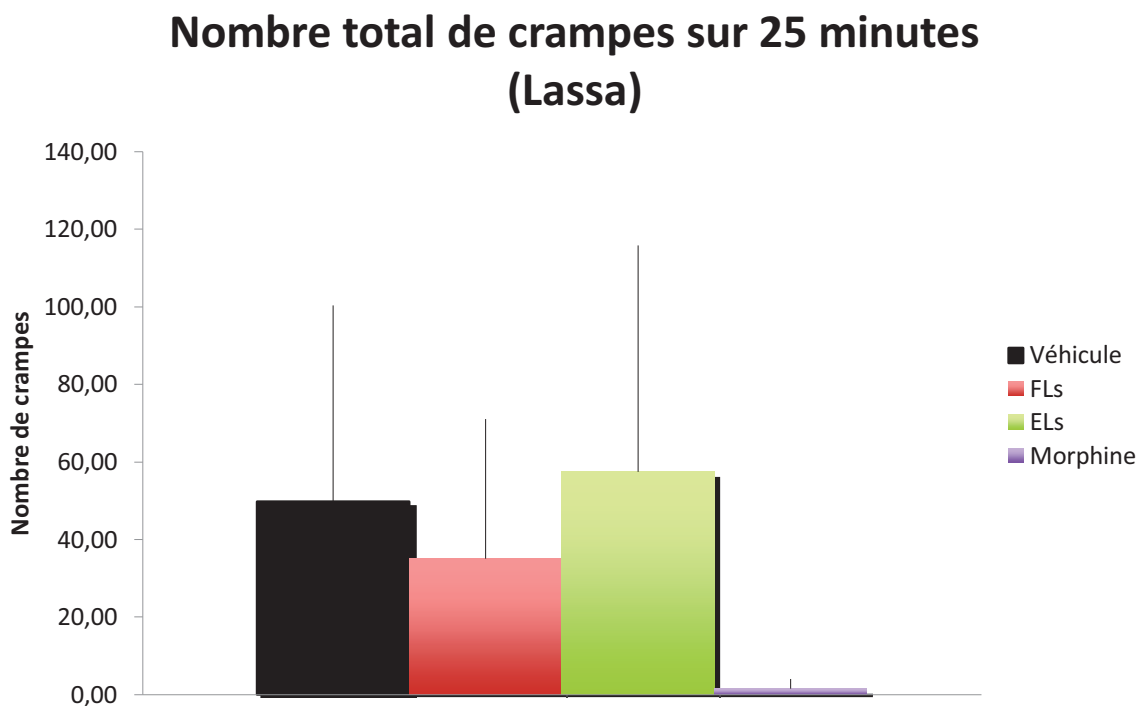
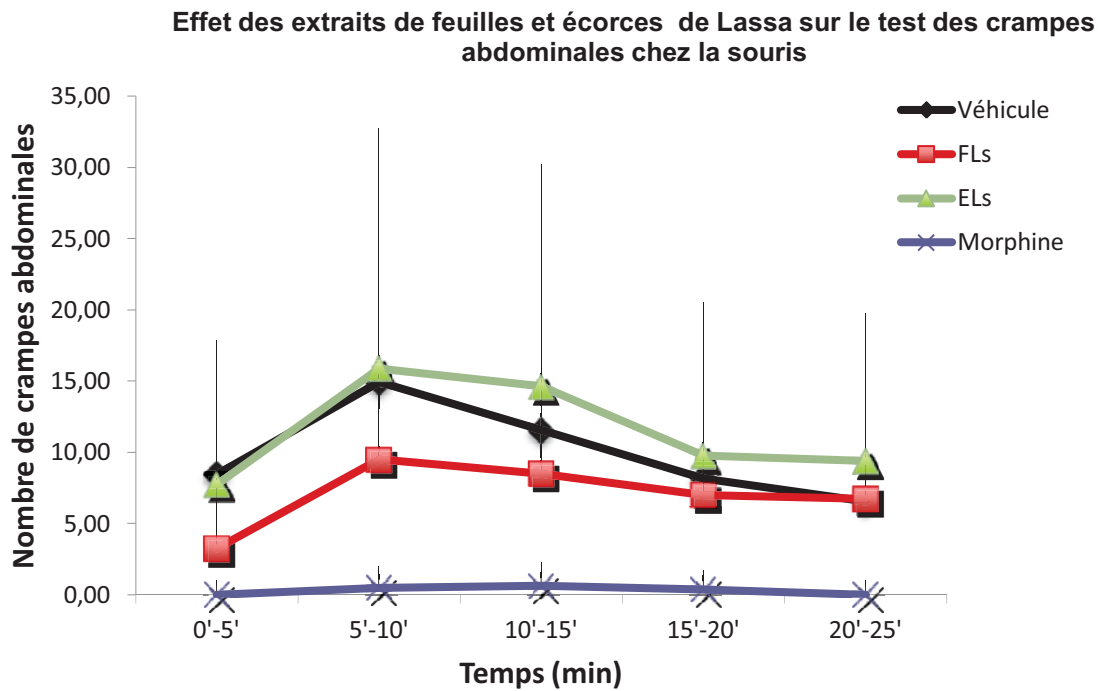
Nombre total de crampes sur 25 minutes (Lafiabougou)



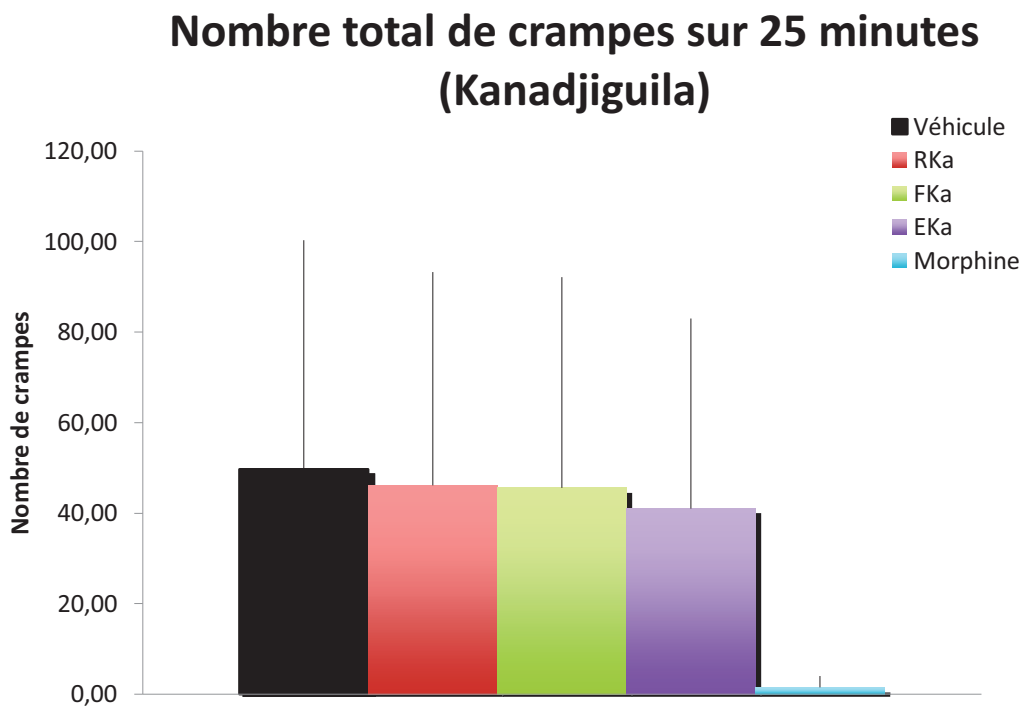
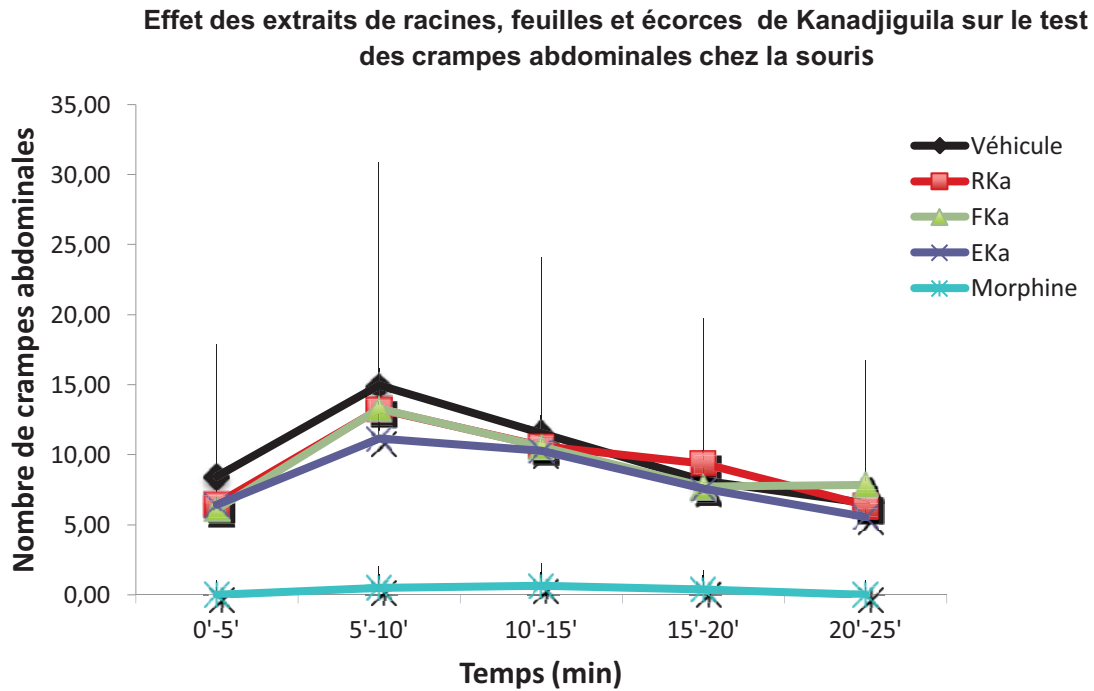
Graphique 7 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits de feuilles, écorces et racines du site de Lafiabougou.



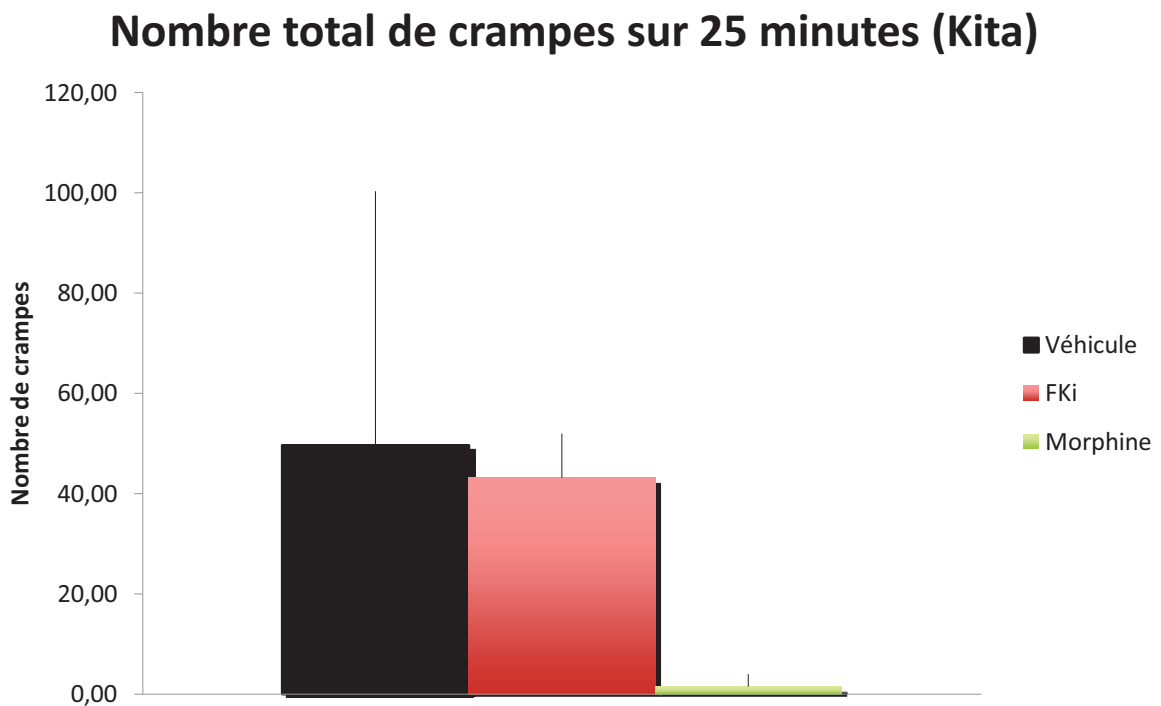
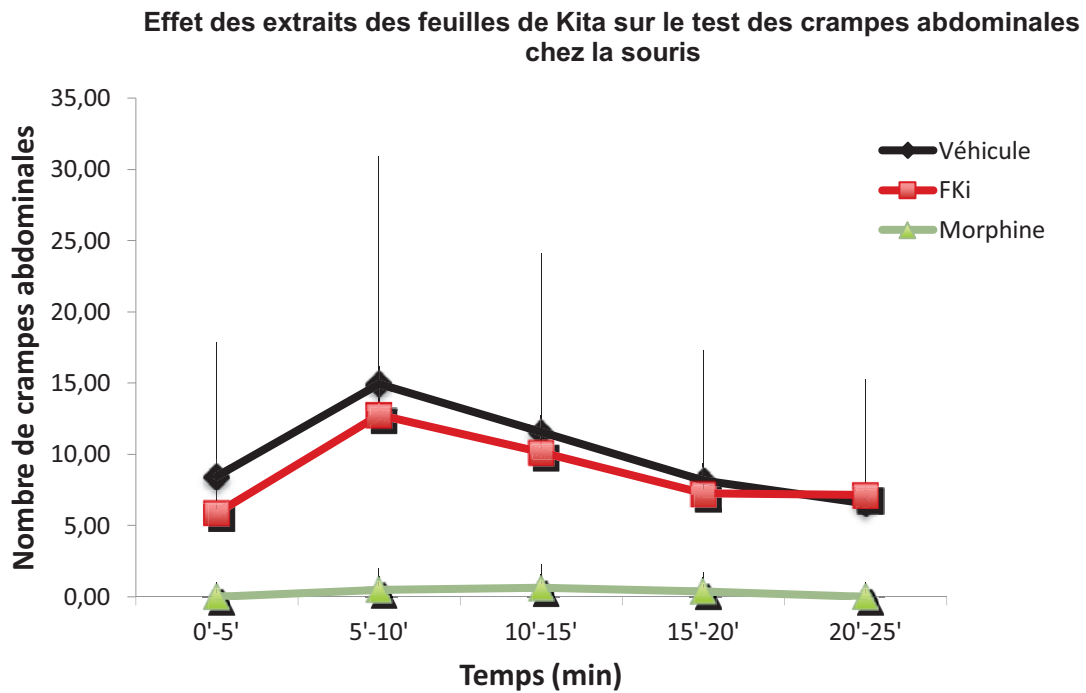
Graphique 8 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits de feuilles et racines du site de Koulouba.



Graphique 9 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits de feuilles et écorces du site de Lassa.



Graphique 10 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits de feuilles, écorces et racines du site de Kanadjiguila.



Graphique 11 : Nombre de crampes sur 25 mn pour les extraits de feuilles du site de Kita.