



THESE

présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : Sciences Biologiques Appliquées
Option : Biochimie - Microbiologie

par
MILLOGO née KONE Hassanata

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE *HOLARRHENA FLORIBUNDA* (G. Don) Dur. et Schinz (APOCYNACEES) :

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ALCALOIDES ET LEUR EVALUATION TOXICOPHARMACOLOGIQUE

Soutenue le 16 avril 1992
devant la commission d'examen :

Président: **M. SOUDRE B. Robert** *Maitre de Conférences Agrégé - Université de Ouagadougou*
Examineurs: **MM. KABORE Z. Issiaka** *Maitre de Recherches CNRST de Ouagadougou*
DE SOUZA Comlan *Maitre de Conférences - Université du Bénin*
GUINKO Sita *Maitre de Conférences - Université de Ouagadougou*
GUISSOU I. Pierre *Maitre de Conférences Agrégé - Université de Ouagadougou*

DEDICACE

Je dédie cette thèse.....

- à la mémoire de mon Père, décédé depuis ma tendre enfance ;
- à ma Mère à qui je dois tout ;
 - à mon Mari qui m'a beaucoup encouragée et soutenue pendant ce travail ;
- à mes deux enfants Fatoumata Ethel et Hassan Joseph ;
 - à KONATE Kéné Dougou et à sa femme KONATE Rokia qui m'ont soutenue pendant mes études ;
- à tous mes parents et amis...
 - à la Soeur Marie Pierre BONARD, ancienne directrice du Collège Sainte Thérèse de Banfora, qui fut et restera une mère pour moi ;
- au Père Bernard FAGNON qui a toujours été un soutien inestimable pour la promotion du guidisme burkinabè ;
 - à l'Association Nationale des Guides du Burkina Faso qui gardera toujours sa place dans mon coeur.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Recherches sur les Substances Naturelles (I.R.S.N.), sous la direction scientifique de Monsieur KABORE Zindibala Issiaka, Maître de Recherche, que nous remercions pour nous avoir guidée et soutenue tout le long de notre formation.

Nous remercions Monsieur SEDOGO P. Michel, Directeur Général du Centre National de la Recherche Scientifique et Tehnologique (CNRST) et Monsieur GUISSOU Pierre Innocent pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Nos remerciements vont également à tout le personnel : chercheurs, techniciens, administratifs de l'I.R.S.N. pour la très grande disponibilité et l'esprit de fraternité qui a prévalu durant tout ce travail.

Que Monsieur HANOCQ Michel, Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles (U.L.B.) et ses plus proches collaborateurs, notamment Madame DONY, Monsieur DEVLEESHOUWER et Madame Paul BOUSSARD, soient remerciés pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Nous ne saurons oublier :

- Monsieur SOUDRE B. Robert et son personnel du Laboratoire de Parasitologie et de Bactériologie du Centre Hospitalier National - Yalgado OUEDRAOGO,
- Monsieur TRAORE S. Alfred, Responsable du Département de Biochimie et de Biotechnologie;
- Monsieur SANKARA Philippe, Responsable du Laboratoire de Phytopathologie à l'Institut du Développement Rural.
- Monsieur DABIRE, Responsable du Laboratoire de Bactériologie du Dispensaire Saint Camille.
- et tous ceux qui, à des titres divers, ont apporté leur aide et conseils.

J'exprime ma reconnaissance à Messieurs les membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail.

S O M M A I R E

- AVANT-PROPOS	3
- INTRODUCTION.....	4
<u>1 ère PARTIE - GENERALITES</u> (Travaux antérieure)	7
A - Etudes botaniques.....	8
B - Etudes chimiques.....	11
C - Etudes pharmacologiques.....	15
<u>2 ème PARTIE - MATERIEL ET METHODES</u> (travaux personnels)...	18
A - <u>CHIMIE</u>	19
1 - Extraction des principes chimiques (actifs) des écorces de tiges et des feuilles par décoction - lyophilisation.....	19
2 - Screening chimique.....	21
3 - Extraction des alcaloïdes totaux des écorces de tiges à partir d'échantillons des stations de Gampèla, Farako-Bâ ,CNRST et des feuilles - préparation des chlorhydrates.....	22
4 - Enrichissement du totum alcaloïdique en conessine par méthylation des bases brutes....	25
5 - Purification des alcaloïdes totaux par le biais des oxalates.....	26
6 - Dosage des alcaloïdes en chromatographie sur couche mince par spectrophotodensito- métrie.....	27
7 - Extraction et dosage des dérivés polyphéno- liques d'écorces de tiges.....	30
- dosage complexiométrique.....	31
- dosage par oxydation :	
. au réactif de Folin-Denis.....	32
. au permanganate de potassium.....	34

B - <u>MICROBIOLOGIE</u>	35
1 - Tests de cytotoxicité sur amibe pathogène <i>Entamoeba histolytica</i>	35
2 - Tests de cytotoxicité sur amibe non pathogène, <i>Amoeba proteus</i>	37
3 - Criblage microbiologique sur bactéries à Gram+ et bactéries à Gram- et détermination de CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB(concentration minimale bactéricide) ..	40
4 - Etudes cinétiques d'inhibition de croissance de différents extraits sur une souche bactérienne : <i>Escherichia coli</i> O ₁₁₉ B ₁₄	45
5 - Activité inhibitrice comparée des extraits alcaloïdiques des trois stations expérimentales sur <i>E. coli</i> O ₁₂₇ B ₈	50
C - <u>ETUDE TOXICOPHARMACOLOGIQUE</u>	51
1 - Détermination de la DL50	51
2 - Tests sur intestin isolé de rat.....	52
<u>3 ème PARTIE - RESULTATS</u>	55
A - <u>CHIMIE</u>	56
B - <u>MICROBIOLOGIE</u>	73
C - <u>TOXICO-PHARMACOLOGIE</u>	92
<u>4 ème PARTIE - DISCUSSIONS</u>	101
<u>5 ème PARTIE _ CONCLUSION _ PERSPECTIVES</u>	111
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	113

AVANT-PROPOS

Au Burkina Faso, les médicaments disponibles dans les structures de distribution sont tous importés, rendant leurs prix de vente aux consommateurs très élevés. Dans ces conditions, l'exploitation rationnelle des données de la Pharmacopée Traditionnelle est incontournable et ce, d'autant que le Burkina Faso connaît d'énormes problèmes de santé. Les maladies y sévissent de manière endémo-épidémique, frappant dans la majorité des cas, les populations infantiles dont le taux de mortalité est de 133 % (UNICEF, 1992).

Parmi les pathologies incriminées, il y a lieu de citer en tête de liste, les maladies infectieuses, les parasitoses.

Les cas de diarrhée-vomissements observés ces dernières années au niveau des Services Pédiatriques du Burkina Faso sont très préoccupants. Parmi les germes pathogènes responsables de ces gastro-entérites, *Escherichia coli* vient pratiquement en tête de liste. Sur dix enfants hospitalisés au Centre hospitalier National Yalgado O. de Ouagadougou, au moins six souffrent de diarrhée-vomissements.

Les antibiotiques les plus couramment prescrits dans ces affections sont la Colimycine, le Bactrim, le Totapen, la Gentalline. Ces médicaments demeurent dans la plupart des cas inaccessibles à l'immense majorité des populations, en raison de leurs coûts élevés.

Fort heureusement, la Tradithérapeutique traite souvent avec succès ces gastro-entérites et c'est dans ce cadre (de valorisation de la Pharmacopée Traditionnelle) que nous avons choisi l'étude physico-chimique et pharmacologique de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz.

INTRODUCTION

En Médecine Traditionnelle de l'Afrique de l'Ouest, les écorces de racines de *H. floribunda* sont préconisées dans le traitement des maladies dysentériques, parasitaires (KERHARO, 1973).

Les études chimiques antérieures effectuées sur *Holarrhena floribunda* par de nombreuses équipes de recherche, notamment par R. GOUTAREL et Coll. (1964), ont montré la richesse des écorces de tiges et de racines en principes alcaloïdiques de la série du Conène-5 à laquelle appartient la conessine, alcaloïde majeur des écorces de racines. Les mêmes auteurs ont mis en évidence dans les feuilles de cette espèce, des alcaloïdes stéroïdiques de la série du Pregnène-5 à laquelle appartient l'Holaphyllamine.

Parmi ces alcaloïdes, la conessine a été utilisée avec succès, en tant qu'amoebicide intestinal et tissulaire ; plus actif que l'émétine (KERHARO, 1973), cet antimicrobien a cependant été abandonné en raison d'effets secondaires indésirables : vertiges, insomnies, tremblements, troubles neurologiques. Ces effets observés pourraient être attribués au surdosage lors des prescriptions ; on peut observer en effet qu'à l'époque, la pharmacocinétique du médicament n'avait pas fait l'objet d'étude.

Ce travail présente un schéma de production d'extraits de plante, adaptable à l'échelle semi-industrielle; *Holarrhena floribunda* étant recommandé dans la tradithérapeutique des diarrhées dysentériques au sens général du terme. L'activité antibactérienne des extraits alcaloïdiques, quasi-négligée jusqu'ici, est évaluée vis à vis de microorganismes incriminés dans les gastroentérites .

L'évaluation de l'activité antidiarrhéique symptomatique des extraits aqueux (feuilles et écorces de tiges) a été effectuée par la mise en évidence d'interactions des principes chimiques avec l'acétylcholine, neuromédiateur qui augmente le tonus et le péristaltisme du tractus gastro-intestinal.

Les études toxico-pharmacologiques ont été entreprises à partir de différents extraits de la plante, dans le but de :

- a) tracer le profil pharmacologique des extraits : effets qualitatifs et quantitatifs - types d'effets - organes cibles - doses efficaces ;
- b) décrire les conditions de sécurité d'emploi de la plante : effets toxiques, doses toxiques, marge d'utilisation chez l'animal
- c) contrôler la matière première (produit de plante) utilisée.

Ces études réalisées en laboratoire (in vivo sur animal entier ou in vitro sur organe isolé ou microorganisme) ont été entreprises dans le but de fournir d'importantes informations, dans le cadre de la sécurité d'emploi avant la première administration de la formulation à l'homme.

Un essai comparatif d'efficacité a été réalisé entre les écorces de tiges de différentes stations expérimentales et les feuilles, en vue d'une orientation de choix de la partie de la plante qui serait efficace et moins toxique aux doses d'utilisation thérapeutique.

Le contrôle chimique (standardisation chimique) constitue un puissant moyen d'investigation moderne qui permet de proposer aux consommateurs des produits technologiquement fiables. A cet effet, il a été entrepris dans le cadre de notre étude, l'évaluation de la teneur des principaux constituants chimiques (potentiellement actifs) d'extraits de la plante. La spectrophotodensitométrie et la spectrophotocomplexiométrie ont été mises à profit pour doser alcaloïdes et dérivés polyphénoliques présents, identifiés par des réactifs caractéristiques.

En vue d'une exploitation rationnelle des sites où sont cultivées nos plantes médicinales, ces études ont porté sur des échantillons de *H. floribunda* de trois localités différentes ; le degré d'accumulation des principes actifs étant en étroite corrélation avec les facteurs climatiques et édaphiques du milieu où se développe la plante et avec l'agrotechnique utilisée.

1ère PARTIE : GENERALITES
(Travaux antérieurs)

A - ETUDES BOTANIQUES

Le genre *Holarrhena* appartient à la tribu des Alstoniées et à la sous tribu des Holarrheninées, à la famille des Apocynacées (BROWN, 1809).

La famille des Apocynacées est subdivisée en trois sous familles : la sous famille des Cerberoidées, celle des Echitoïdées et celle des Plumérioidées (PICHON, 1948 ; BISSET, 1958).

Le genre *Holarrhena* appartient à la sous famille des Plumérioidées qui est celle des plantes riches en alcaloïdes indoliques . Cette sous famille est caractérisée par des anthères libres et non appendiculés, des carpelles distincts et une graine nue. Le fruit est une baie ou une drupe. *Holarrhena floribunda* fait exception car plutôt riche en alcaloïdes stéroïdiques et possédant des graines enfermées dans des follicules.

Le genre *Holarrhena* comporte plusieurs espèces originaires d'Afrique Tropicale ou d'Asie. Il est subdivisé en deux sections (CHEVALIER, 1938 ; PICHON, 1948 ; BISSET, 1958):

- La section Euholarrhena A.D.C caractérisée par un calice aux lobes glanduleux comportant plusieurs espèces dont deux sont africaines : *H. febrifuga* Kl. et *H. congolensis* Staff. Les autres sont asiatiques : *H. antidysenterica* (Roxb) Wall., *H. mitis* R.Br., *H. angustata* Pierre, *H. curtisii* King et Gamble, *H. crassifolia* Pierre.

- La section Alepis A.D.C est caractérisée par des lobes du calice non glanduleux. Elle n'est représentée que par une seule espèce d'Afrique Tropicale : *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz. (incl. *H. Wulfsbergii* ; *H. africana*).

Pour CHEVALIER, le genre *Holarrhena* ne regroupe qu'une seule espèce : *Holarrhena floribunda* Dur. et Schinz. Cette espèce subirait des variations morphologiques considérables selon les microclimats.

SCHMIT (1950) subdivisait ce genre en quatre espèces : *Holarrhena congolensis* Stapf, *H. wulfsbergii* Stapf, *H. ovata* A.D.C et *Holarrhena floribunda* (G.Don) Dur. et Schinz.

Pour Pichon, *H. wulfsbergii*, *H. floribunda* et *H. africana* A.D.C sont les mêmes.

Holarrhena floribunda (G.Don) Dur. et Schinz., espèce ouest africaine, est rencontrée du Sénégal au Zaïre (LEPESME, 1948 ; CHEVALIER, 1948 ; DE KRUIF, 1981) en passant par le Burkina Faso. C'est une espèce assez polymorphe. Elle se présente comme un arbuste pouvant atteindre 6 m de haut dans les galeries forestières sur les sols hydromorphes limono-sableux et comme un arbrisseau de 1 à 2 m de haut dans les savanes sur les sols ferrugineux, limono-sableux (GUINKO, 1984).

En dépit des polymorphismes présentés en fonction des microclimats, l'espèce *Holarrhena floribunda* est une plante qui produit un latex blanc et porte des feuilles opposées. Le limbe est ovale elliptique, long de 10 à 15 cm, large de 4 à 6 cm, plus large en général dans le tiers inférieur, base en coin court, souvent disymétrique, sommet en pointe acuminée. Il porte 8 à 10 nervures latérales. Le limbe est inséré sur le rameau par un pétiole court de 3 à 4 mm. Les fleurs blanches et parfumées se présentent en corymbe axillaire. Les fruits sont composés de deux follicules linéaires jumelés, longs de 30 à 40 cm et larges de 7 mm (BEHRAUT, 1971).



Holarrhena floribunda (G. Don)

Dur. et schinz.

B - ETUDES CHIMIQUES

Le genre *Holarrhena* est connu depuis l'antiquité dans l'Est asiatique, notamment en Inde où l'espèce *Holarrhena antidysentérica* est exploitée pour ses propriétés antidysentériques.

HAINES (1865), isola des écorces de racine de cette plante un alcaloïde impur, non cristallisable, résineux et très amer auquel il donna le nom de conessine. Dès lors, cette plante présentait un regain d'intérêt. Ses écorces et graines furent l'objet de nombreuses études chimiques. Parmi les travaux les plus fournis on peut citer ceux de BERTHO (1944), et de GOUTAREL (1964).

Plus tard, JANOT, GOUTAREL et Coll (1970) ont isolé des feuilles de nouveaux produits, les aminoglycostéroïdes : holantosines, holarosines.

Les autres espèces asiatiques (*H. mitis*, *H. crassifolia*) ont également fait l'objet d'études chimiques approfondies dans lesquelles se sont illustrés GOUTAREL et son équipe.

Les premiers travaux sur *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz. ont été entrepris par FAUST et HABICH (1878) qui retirèrent des écorces de tronc un alcaloïde dont l'étude physiologique fut confiée à KEIDEL et la purification réalisée par POLSTORFF et SCHIRMER (1886) qui l'identifièrent à la conessine. La présence de conessine fut confirmée par plusieurs chercheurs dont ULRICI (1918), GIENSA et HALBERKAN (1918), BROWN (1922).

PARIS (1938) étudie les écorces du Séoulou (*Holarrhena floribunda*) en provenance du Sénégal. Il obtient des teneurs en alcaloïdes totaux plus élevées dans les écorces de racines (environ 2 %) que dans les écorces de tiges (0,8 à 1,5 %).

SCHMIT (1950) reprit les travaux de PARIS et confirma les résultats de celui-ci. Elle démontra la présence d'autres alcaloïdes dans les écorces de *Holarrhena floribunda* : isoconessimine, conessimine, conkurchine, holarrhénine, holarrhimine. A la fin de ses travaux, elle conclut que la teneur en conessine dans les écorces de *H. floribunda* est de l'ordre de 50 % des alcaloïdes totaux tandis que dans *H. antidysenterica* cette proportion n'est que de 20 à 30 % .

Des extractions d'alcaloïdes totaux ont été faites à partir des feuilles de *H. floribunda* (PARIS, 1942 ; SCHMIT, 1950). Les teneurs obtenues varient de 0,06 à 0,35 % avec des traces de conessine. Dans les graines, ils ont trouvé 0,25 à 0,45 % d'alcaloïdes totaux. L'étude des feuilles a été approfondie par JANOT, CAVE et GOUTAREL (1959). Elle a conduit à l'isolement et à la détermination de cinq nouveaux alcaloïdes : holamine, holaphyllamine, holaphylline et, en collaboration avec LEBOEUF (1969), holaphyllamidine et holaphyllidine.

LEBOEUF (1969) a mis en évidence dans les feuilles de *H. floribunda* la présence de progestérone. Par la suite, BENNET. et coll. (1966) ont mis en évidence la filiation biogénétique de cette hormone à partir des stéroïdes aminés tels que l'holaphyllamine, par l'intermédiaire de la prégnénolone et qu'il existe un système enzymatique permettant la désamination de l'amine stéroïdique en l'alcool correspondant et inversement.

Deux alcaloïdes oxygénés : l'holafrine et l'holarrhétine furent isolés des écorces de *H. Floribunda* (ROSTOCK et SEEBECK, 1958). Puis un examen systématique des alcaloïdes des écorces fut entrepris (JANOT et coll, 1967), examen qui a permis d'isoler à l'état pur onze alcaloïdes stéroïdiques. Les écorces de *H. floribunda* constituent actuellement la principale matière première pour l'extraction, non seulement de la conessine mais aussi de l'holarrhénine, stéroïde particulièrement intéressant par sa fonction alcool 12 β .

- Bases stéroïdiques dérivées du conane (rencontrées dans les écorces de tiges et/ou de racines)

1. Conessine : diéthylamino - 3 β Δ^5
2. Isoconessine : méthylamino - 3 β Δ^5
3. Conamine : amino - 3 β Δ^5
4. Conessimine : diméthylamino - 3 β Δ^5 N-déméthyle
5. Conimine : méthylamino - 3 β Δ^5 N-déméthyle
6. Conkurchine : amino 3 β N-déméthyl diène 5,18 (N)
7. Holarrhénine : diméthylamino - 3 β , hydroxy- 12 β Δ^5
8. Holarrhéline : méthylamino -3 β , hydroxy - 1 β Δ^5
9. Holafrine : diméthylamino -3 β , pyrotéréboxy - 12 β Δ^5 déméthyle
10. Holarrhétine : diméthylamino - β pyrotéréboxy - 12 β Δ^5
11. Holadiénine : diène 1,4 one 3
12. Holaromine : méthylnorconatriène
13. Holaline : diméthylamino - 3 β hydroxy 5 α
- (14. Conarrhimine : amino - 3 β Δ^5 N- déméthyle) dans les graines.

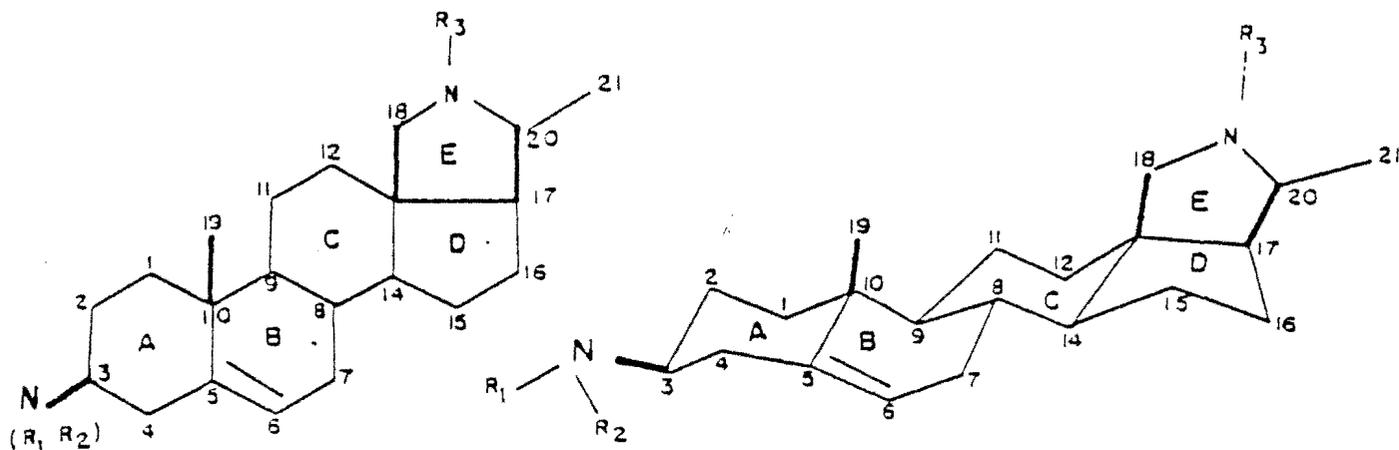
- Bases stéroïdes dérivées du pregrane (rencontrées dans les feuilles)

1. Funtumine : 3 α amino 5 α pregnane 20 one
2. Irediamine A : diamino - 3 β , 20 α Δ^5
3. Holarrhimine : diamino - 3 β , 20 α Δ^5 ol-18
4. Holaphylline : méthylamino - 3 β one 20 Δ^5
5. Holaphyllamine : amino - 3 β one 20 Δ^5
6. Holamine : amino - 3 α one 20 Δ^5
7. Méthylholaphylline: diméthylamino - 3 β one 20 Δ^5
8. Holaphyllinol : méthylamino - 3 β hydroxy - 20 β Δ^5
9. Holaphyllidine : éthylamino - 3 β hydroxy - 20 β Δ^5
10. Dihydroholaphylline: amino - 3 β one - 20 Δ^5

- Base non stéroïdique dérivée de l'adénine

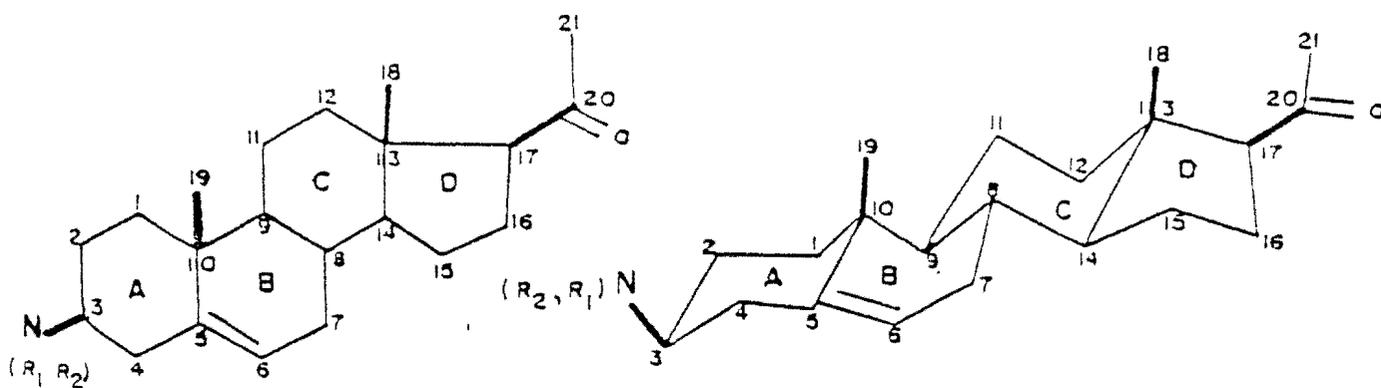
Triacanthine : diméthylallyl - 3 adénine.

CONFIGURATIONS STEREOCHIMIQUES DES PRINCIPAUX ALCALOÏDES DE HOLARRHENA FLORIBUNDA



SÉRIE CONANÈNE-5
DES
ECORCES

- | | |
|---|--|
| 1 | $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$ ----- Conessine |
| 2 | $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$; $R_3 = \text{H}$ ---- Conessimine |
| 3 | $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$ ---- Isoconessimine |
| 4 | $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_3$ ---- Canamine |
| 5 | $R_1 = R_3 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$ ---- Conimine |



SÉRIE PRÉGNÈNE-5
DES
FEUILLES

- | | |
|---|---|
| 6 | $R_1 = R_2 = \text{H}$ ----- Holaphyllamine |
| 7 | $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$ ----- Holaphylline |
| 8 | $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ ----- Méthyl Holaphylline |
| 9 | $R_1 = R_2 = \text{H}$ ----- Holamine (3- α -N Δ 5) |

C - ETUDES PHARMACOLOGIQUES

Holarrhena floribunda (G. Don) Dur. et Schinz est prescrite en médecine traditionnelle comme antidysentérique, fébrifuge et diurétique. Le macéré des écorces de racines est indiqué dans le traitement des entéralgies (KERHARO, 1973) tandis que le décocté est indiqué per os contre les parasitoses intestinales, la blennorragie, l'ascite, la stérilité. Le décocté en boissons et en bains est également conseillé durant toute la gestation chez les femmes sujettes aux avortements. L'écorce est fébrifuge et serait un succédané de la quinine. Le jus des feuilles serait hémostatique dans les coupures graves.

La teinture de racines s'est révélée peu toxique pour le cobaye, par voie sous-cutanée tandis que la drogue totale permet d'observer un effet fébrifuge (hypothermisant) et hypotenseur (PARIS, 1950).

SCHMIT (1950), travaillant parallèlement sur les écorces d'échantillons du Sénégal, de Guinée et du Togo a montré la toxicité de la drogue totale sur les paramécies, les daphnies à de très faibles concentrations. Chez les poissons rouges, elle a observé une perte d'équilibre. Sur les souris blanches, elle a démontré que les écorces de tiges sont moins toxiques que les écorces de racines et les graines, moins toxiques que les écorces de tiges.

Les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux présentent une forte toxicité pour les protozaires (PARIS, 1938 ; 1942) ; à la dilution de 1p.100 000 on observe la mort des paramécies en 15 mn et à la dilution de 1 p.20 000, en 5 mn.

Par contre ils sont peu toxiques pour le cobaye par voie sous cutanée, mais par voie intraveineuse et à forte dose (0,02 g à 0,03 g/kg) on observe des signes d'intoxication cardiaque (arythmie, dissociation auriculo-ventriculaire).

Traitant des amibiens avec des pilules d'extraits totaux à 0,05 g d'alcaloïdes totaux, CROSNIER et coll (1948), après échelonnement du traitement sur trois semaines (une semaine 8 pilules par jour, une semaine de repos médicamenteux et une semaine de reprise de traitement), constatent pour 13 malades atteints de dysentérie aiguë la disparition des amibes dans 9 cas ; pour 6 malades atteints de coliques avec présence de kystes, la disparition totale des kystes.

Les alcaloïdes isolés à l'état pur à partir de différentes espèces de *Holarrhena* ont été étudiés pharmacologiquement par de nombreux chercheurs.

En thérapeutique humaine, la conessine peut être administrée par voie buccale en cachets ou comprimés sous forme de chlorhydrate ou de bromhydrate officinal, ce dernier sel étant mieux toléré. Le traitement pour l'adulte consiste à prescrire 0,50 g par jour pendant 4-5 jours puis à diminuer progressivement les doses en échelonnant la cure sur 15-20 jours, la dose totale étant de l'ordre de 5 g (TANGUY, ROBIN et RAOUL, 1948). Ces chercheurs ont obtenu des succès dans le traitement des amibes et de leurs kystes. Les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux de l'émétine et du stovarsol.

Des résultats satisfaisants avec la conessine furent également obtenus par PIETTE (1948) à l'Hôpital de la Pitié à Paris, par CROSNIER et coll.(1948) à l'Hôpital militaire du Val-de-Grâce à Paris, par LAVIER et coll.(1948).

Dans le traitement d'amibiases hépatiques, SOULAGE et PORTE (1950), de même que CROSNIER et coll. ont également obtenu des résultats satisfaisants.

En 1949, Médecine Tropicale, Revue du corps de santé colonial français consacrait un numéro spécial au traitement de l'amibiase par la conessine. SIGUIER et coll. (1949) donnent dans

la même revue une étude expérimentale comparative de la conessine et de l'émétine.

Mais tous les cliniciens ayant pratiqué la conessinothérapie s'accordent pour reconnaître que malgré sa toxicité relativement faible, elle peut provoquer des incidents neuro-végétatifs sensoriels ou neurologiques (vertiges, insomnies, agitations, angoisses, délires). Mais ces incidents sont rares et surviennent plutôt chez les sujets prédisposés (TANGUY, 1948 ; CROSNIER, 1948 ; PIETTE, 1948) ; ce qui se produit aussi avec d'autres médications. Ces incidents peuvent du reste être prévenus par l'administration concomitante de gluconate de sodium, d'antihistaminiques et au besoin de barbituriques. Néanmoins, indique Lavier, la conessinothérapie nécessite une surveillance médicale attentive. Elle a finalement été abandonnée au profit de l'émétine qui conservait la faveur des médecins traitants.

Cependant, le bromhydrate d'amino-oxyconessine proposé en 1952 par Crosnier, aussi actif et mieux toléré que la conessine, pourrait permettre d'envisager d'étendre les indications de cette dernière et d'envisager un traitement ambulatoire, également possible d'ailleurs avec les extraits totaux d'*H. floribunda* (CROSNIER, 1952 ; CAVIER, 1959).

Ces travaux précités n'ont pas été poursuivis et l'utilisation thérapeutique actuelle de la conessine se retrouve surtout par voie externe dans les vaginites et urétrites à *Trichomonas* ainsi que dans les leucorrhées (GODET, 1950).

D'autres principes actifs ont été isolés : Conkurchine, Holarrhénine, Holarrhimine, Holaphylline, Holaphyllamine et Holamine (GOUTAREL, 1964). Ces alcaloïdes sont pour la plupart des hypotenseurs, des dépresseurs du système respiratoire. Ils ont un effet spasmolytique. Les DL 50 obtenus avec les alcaloïdes du type conane sont compris entre 28 et 30 mg/kg p.c. (KERHARO, 1973).

2è PARTIE : MATERIEL ET METHODES
(Travaux personnels)

A - CHIMIE

Parmi les substances naturelles qu'une plante élabore, toutes n'intéressent pas au même degré le pharmacodynamiste. Dans le cadre de ce chapitre (étude chimique), nous nous intéresserons surtout aux principes chimiques actifs sur le plan pharmacologique et, par conséquent responsables de l'activité en thérapeutique. Ces substances naturelles renferment des groupes chimiques très divers (alcaloïdes, flavonoïdes, saponosides, stérols...).

L'étude des groupes les plus actifs du point de vue physiologique, comme les alcaloïdes, saponosides, tanins, etc..., sera développée, notamment en ce qui concerne l'extraction, la caractérisation et le dosage. Différentes méthodes de dosage chimiques sont mises à profit dans le cadre de la standardisation chimique de produits à base de plantes.

La chimie a également été mise à profit pour l'évaluation de la teneur en un des constituants majeurs de la plante étudiée. Cette étude a porté sur des échantillons de sites différents (stations expérimentales de culture) du point de vue des conditions climatiques, édaphiques.

1. Extraction des principes chimiques des écorces de tiges et des feuilles par décoction -lyophilisation

a)- Matériel et réactifs

- matériel végétal :

. feuilles

. écorces de tiges : provenant des pieds obtenus à partir de plantules prélevées sur site naturel en juin 1983 des galeries forestières du Houet (Dindéresso au Nord de Bobo-Dioulasso). Ces plantules ont été mises en culture sur trois sites distincts du point de vue de la nature du sol et du microclimat environnemental.

Il s'agit des stations expérimentales de culture de l'IRSN à Farako-Bâ (15 km à l'Ouest de Bobo-Dioulasso), à Gampèla (15 km à l'Est de Ouagadougou) et au CNRST (forêt classée en plein centre de Ouagadougou).

- Eau distillée
- Entonnoir
- Coton et papier filtre
- Centrifugeuse
- Lyophilisateur

b)- Méthodes

50 g d'écorces de tiges (Station Farako-Bâ) finement pulvérisées ont été mises dans 250 ml d'eau distillée puis portées à ébullition pendant 10 minutes. Le décocté obtenu a été filtré sur coton puis centrifugé avant d'être passé sur papier filtre. Cette opération a été reprise deux autres fois de suite avec le marc.

Les filtrats réunis ont été lyophilisés pour une plus longue conservation.

D'autres extractions ont été effectuées avec 150 g et 65 g des deux autres stations (voir tableau des résultats 1 p.56).

Avec les feuilles, l'extraction des principes chimiques par décoction a été effectuée avec des échantillons de Farako-Bâ. Les filtrats obtenus dans les mêmes conditions que précédemment ont été lyophilisés (voir tableau 2 p.56).

La teneur en lyophilisat dans les différents cas a été déterminée.

2. Screening chimique

- Screening chimique du décocté d'écorces de tiges

Ce screening a été effectué dans le souci de vérifier la présence après décoction de certaines molécules susceptibles d'être à l'origine de l'activité antimicrobienne ou de jouer un rôle dans la conservation d'une formulation galénique. A cet effet, il a été mis en évidence la présence de groupes de principes chimiques qui sont : tanins, sucres réducteurs, saponosides, alcaloïdes.

a)- Matériel et réactifs

- tubes à essai
- matières premières (lyophilisats de décoctés)
- liqueur de Fehling (solutions A et B)
- Fe Cl₃
- acide acétique 5 %
- réactifs de Dragendorff et de Mayer.

b)- Méthodes

- Sucres réducteurs : 1ml de décocté a été dilué dans 2 ml d'eau et porté à ébullition en présence de 1 ml de liqueur de Fehling. La présence de sucres réducteurs est matérialisée par la formation d'un précipité rouge brique.

- Tanins : 1 ml de décocté est dilué dans 2 ml d'eau et additionné de 3 gouttes d'une solution diluée de Fe Cl₃. La présence de tanins galliques est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue et celle de tanins catéchiques par la coloration noir-verdâtre.

- Saponosides (hétérosides stéroliques) :

2 ml de décocté dilué avec de l'eau distillée (1:1) sont agités dans un tube à essai pendant 15 minutes. L'apparition d'une colonne de mousse d'au moins 1 cm de haut persistant pendant 15 minutes indique la présence de saponosides. Cette réaction est confirmée par celle de Lieberman-Büchard.

- Alcaloïdes sels : 1 ml de décocté a été acidifié avec 0,5 ml d'une solution d'acide acétique 5 % . La présence d'alcaloïdes sels est révélée par l'apparition d'un précipité jaune orangé avec le réactif de Dragendorff et d'un précipité blanc cailloté avec le réactif de Mayer.

(Voir résultats p.57)

- Screening chimique complet des écorces de tiges

L'extraction et l'identification des groupes de principes chimiques ont été effectués avec des solvants de polarité croissante (chloroforme, éthanol, eau). Les résultats sont consignés dans le tableau 3 p.58 .

3. Extraction des alcaloïdes totaux des écorces de tiges à partir d'échantillons des stations de Gampéla, Farako-Bâ, CNRST et des feuilles
Préparation de chlorhydrates

a)- Matériel et réactifs

- matière première : échantillon de Farako Bâ, de Gampéla et du CNRST
- soxhlet - cartouche - coton
- papier filtre (Whatman n°1)
- entonnoir
- évaporateur rotatif
- acide sulfurique 5 % - acide acétique 5 %
- chloroforme

- chlorure de méthylène
- ammoniacque 25 %
- acétone - acide chlorhydrique 37 %, éthanol
- chlorure de sodium.

b)- Méthodes

b1. Extraction des alcaloïdes totaux à partir des écorces de tiges - Préparation de chlorhydrates

- Extraction

100 g de poudre fine d'écorces de tiges de *Holarrhena floribunda* (Station Farako-Bâ) ont été alcalinisés avec 100 ml d'ammoniacque 12,5 % et laissés sous agitation magnétique dans 1 l de chloroforme pendant 15 H de temps. Après filtration sur coton, le marc est repris avec 500 ml de chloroforme et laissé sous agitation pendant 30 minutes. Cette dernière opération est répétée jusqu'à Mayer négatif. Les filtrats obtenus ont été réunis et concentrés dans un évaporateur rotatif. Les alcaloïdes sont ensuite extraits sous forme de sels par de l'acide sulfurique 5 % jusqu'à Mayer négatif puis sous forme de bases par du chlorure de méthylène en milieu fortement alcalinisé par de l'ammoniacque 25 % . L'extrait chlorométhylénique a ensuite été lavé abondamment à l'eau, jusqu'à neutralité, séché sur du sulfate de sodium anhydre et filtré sur du papier Whatman n°1 (séparateur de phases). Tiré à sec, le filtrat laisse un résidu constituant le totum alcaloïdique.

Les extractions des alcaloïdes totaux ont été effectuées à partir des écorces de tiges prélevées sur toutes les trois (3) stations expérimentales (voir tableau 4 p.59).

Chaque extraction a été répétée au moins 3 fois.

- Préparation de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux

600 mg de totum alcaloïque ont été dissous dans une quantité suffisante d'acétone. Par barbotage de vapeurs d'acide chlorhydrique ($\text{Na Cl} + \text{H}_2\text{SO}_4$ provoque la formation de vapeurs de HCl) dans la solution acétonique, des chlorhydrates d'alcaloïdes, de couleur blanc-laiteux se forment et précipitent. L'opération est arrêtée après l'obtention d'un pH franchement acide.

Le précipité est filtré sur papier Whatman n°1 et rincé à l'acétone jusqu'à pH neutre du filtrat. Du fait de leur hygroscopie, les chlorhydrates obtenus ont été séchés à l'étuve (enceinte close) à 50°C . Cette opération a été reprise avec différentes quantités de totum alcaloïdique.

b2. Extraction des alcaloïdes totaux des feuilles de *Holarrhena floribunda* - Préparation de chlorhydrates

- Extraction

Deux techniques ont été adoptées. La première est celle classique effectuée à partir de 520 g de poudre. Le protocole est le même qu'avec les écorces de tiges. La deuxième technique adoptée est la suivante :

100 g de poudre de feuilles (Station Farako Bâ) ont été alcalinisés par 100 ml d'ammoniaque 12,5 % puis additionnés de 700 ml de dichlorométhane et placés sous agitation pendant 15 heures. Après filtration sur coton, l'extraction a été poursuivie avec plusieurs fractions de dichlorométhane jusqu'à Mayer négatif. Les phases organiques réunies ont été concentrées à environ 100 ml et additionnées de 200 ml de méthanol-acide acétique (180:20). Cette phase, après concentration, a été diluée par 500 ml d'eau. On laisse décanter pendant 15 heures avant de procéder à la filtration

sur papier filtre Whatman n°1 et au séchage en enceinte close à 50°C (voir tableau 5 p.60).

- Préparation de chlorhydrates

Les acétates d'alcaloïdes totaux obtenus ont été décomposés dans du dichlorométhane en présence d'ammoniaque. La phase chlorométhylénique, tirée à sec, a donné un résidu constitué d'alcaloïdes bases. Ce résidu a été dissous dans un peu d'éthanol. L'addition de chloroforme puis d'éther a permis la cristallisation par barbotage de vapeurs d'acide chlorhydrique.

4. Enrichissement du totum alcaloïdique en conessine par méthylation des bases brutes

a)- Matériel et réactifs

- matière première = totum alcaloïdique
- réfrigérant à reflux - évaporateur rotatif
- ballon de 250 ml à fond rond et col rodé
- acide formique
- formaldéhyde 40 %
- eau distillée
- soude en pastilles
- éther de pétrole
- réactif de Mayer ou de Dragendorff
- acétone

b)- Méthodes

1,5 g de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux ont été mis en chauffage à reflux pendant 4 heures dans 33,5 ml d'acide formique et 33,5 ml de formaldéhyde à 40 % . Après refroidissement, l'extrait a été dilué avec 50 ml d'eau puis alcalinisé avec 10 g de soude dissous dans 5 ml d'eau.

L'extraction des bases a été faite à l'éther de pétrole jusqu'à Mayer négatif, suivi d'un tirage à sec à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu a été dissous et cristallisé dans l'acétone par un barbotage de vapeurs d'acide chlorhydrique. Le précipité obtenu a été filtré et séché, la teneur moyenne en conessine déterminée. (Voir résultats p.60).

5. Purification des alcaloïdes totaux par le biais des oxalates

a)- Matériel et réactifs

- totum alcaloïdique
- acétone
- acide oxalique
- chlorure de méthylène
- ammoniacque 25 %
- eau distillée
- sulfate de sodium anhydre
- papier filtre.

b)- Méthodes

30 mg de totum alcaloïdique ont été dissous dans de l'acétone et transformés en oxalates par addition goutte à goutte d'acide oxalique. Le précipité obtenu est décomposé dans du chlorure de méthylène en présence d'ammoniacque 25 % . L'oxalate ammonique précipite. La phase chlorométhylénique renfermant les alcaloïdes bases est récupérée et lavée abondamment à l'eau (l'acide oxalique étant très toxique) puis séchée sur du sulfate de sodium anhydre, filtrée et tirée à sec. Les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux purifiés sont alors soumis à une chromatographie sur couche mince. (voir p.61).

6. Dosage des alcaloïdes en chromatographie sur couche mince par spectrophotodensitométrie

a)- Matériel et réactifs

- matières premières

. tota alcaloïdiques obtenus à partir de 3 échantillons provenant de chacune des stations expérimentales (Farako-Bâ, Gampèla, CNRST).

. échantillons de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux méthylés (Station Farako-Bâ).

. échantillons de lyophilisat de décocté (Station de Gampèla).

. échantillons de poudre d'écorces de tiges (Station de Farako-Bâ).

- dihydroxyde de calcium
- eau distillée
- méthanol
- conessine base de référence
- solvant de migration : acétate d'éthyle - hexane - diéthylamine dans les proportions 74 - 24 - 6
- acide acétique
- réactif de Dragendorff pour immersion :
 - . bismuth sous nitrate : 30 mg
 - . iodure de potassium : 700 mg
 - . acide acétique glacial : 7 ml
 - . eau distillée : 3 ml
 - . acétate d'éthyle : 90 ml

- spectrophotodensitomètre Shimadzu CS 930 high speed TLC Scanner
- plaque silica gel 60 F 254 TLC
- micropipette de 1 mcg
- centrifugeuse
- évaporateur rotatif
- cuve à chromatographie
- étuve
- cuve à immersion
- spectrophotomètre U.V.

b)- Méthodes

La teneur des différents échantillons en alcaloïdes dont notamment la conessine est déterminée à l'aide d'une courbe étalon obtenue avec différentes concentrations de conessine base de référence.

Cb = solution mère = 0,5 mg de conessine base/ml de méthanol

T4 = 4 ml de solution mère + 6 ml de méthanol

T6 = 6 ml de solution mère + 4 ml de méthanol

T8 = 8 ml de solution mère + 2 ml de méthanol

(voir tableau 6 p.61).

Les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux et les lyophilisats de décocté sont dissous dans de l'eau et leur teneur en conessine déterminée (tableaux 7, 8, et 9 p.62 et 63).

Avec la poudre d'écorces de tiges, le procédé adopté est différent. Dans un tube à centrifuger, on introduit respectivement:

- + 100 mg de l'échantillon
- + 10 mg de Ca (OH)₂
- + 0,2 ml d'eau distillée
- + 5 ml de méthanol.

Le tube est bouché, agité pendant 5 minutes et soumis à une centrifugation. Le surnageant est récupéré dans un ballon. Cette opération est reprise trois fois de suite avec 5 ml de méthanol. Le surnageant, tiré à sec, laisse un résidu qui est dissous dans de quantités variables de méthanol .

Sur la plaque Silica gel 60 F 254 TLC (20x10 cm) chaque témoin est déposé 2 fois et chaque extrait 3 fois. Le volume déposé à chaque fois est de 1 mcl, avec une micropipette. La plaque est ensuite plongée dans la cuve à chromatographie où on laisse le solvant de migration migrer jusqu'à une hauteur de 8,5 cm. Elle est alors retirée et séchée à l'étuve pendant 2 heures à 105°C.

Après refroidissement, la plaque est plongée dans une cuve à immersion renfermant du Dragendorff (pour immersion) pour une durée de 40 secondes environ. Séchée à la température ambiante du laboratoire (environ 25° C) elle laisse apparaître des spots de couleur orangée (fig. 1 p.64).

La mesure des densités des spots est faite au spectrophotodensitomètre Shimadzu CS 930 high speed TLC Scanner.

La plaque est recouverte avec du verre transparent pendant les mesures en vue de stabiliser le fond de la plaque.

Un tracé spectral permet de retenir la longueur d'onde maximale pour le dosage. Pour cela, un spectre d'absorption est tracé à partir du fond de la plaque avec des longueurs d'onde X allant de 370 à 700 nm. La différence est lue par rapport à un spot de référence aux mêmes longueurs d'onde. Ce spectre de différence permet de déterminer la longueur d'onde à laquelle l'absorption du faisceau lumineux est maximale. C'est à cette longueur d'onde que se font tous les dosages spectrophotodensitométriques (fig. 2 p.66).

Afin de s'assurer que dans les différents extraits, les spots de même Rf (facteur de rétention) que la conessine base de référence correspondent effectivement à ceux de la conessine et afin d'en évaluer le degré de pureté, nous avons déterminé des spectres d'absorption à partir de ces différents spots (fig. 2 p66)

La spectrophotométrie a également été mise à profit pour identifier la conessine. Les spectres d'absorption dans l'U.V. visible ont été tracés avec la conessine base de référence, le totum alcaloïdique et le mélange totum + alcaloïde base de référence (voir fig.3 p.67).

Un balayage vertical de la plaque a été effectué avec le totum alcaloïdique des écorces de tiges prélevées dans chacune des stations expérimentales (voir fig. 4 , 5 et 6 p.68) afin de déterminer les proportions relatives de ces différents alcaloïdes dans le totum.

7. Extraction et dosages des composés polyphénoliques d'écorces de tiges selon la méthode de RIBEREAU et GAYON (1968), BAILLEUL(1980)

- Extraction

a)- Matériel et réactifs

- matière première : poudre d'écorces de tiges
- alcool à 80°
- ballon à fond rond et col rodé
- réfrigérant à reflux
- papier filtre
- évaporateur rotatif
- fiole jaugée.

b)- Méthodes

5 g d'écorces de tiges finement pulvérisées ont été mis dans 100 ml d'alcool à 80° et portées à ébullition pendant 45 minutes sous réfrigérant à reflux. Après filtration sur papier filtre, le marc est à nouveau épuisé dans les mêmes conditions. L'épuisement est arrêté quand le test de caractérisation est négatif.

Les solutions alcooliques sont réunies et évaporées sous pression réduite jusqu'à siccité. Le résidu est repris avec 80 ml d'alcool à 60°. La solution est filtrée puis ajustée à 100 ml dans une fiole jaugée.

- Dosage complexiométrique

Principe : La teneur en flavonoïdes totaux de la drogue est estimée globalement par formation d'un complexe flavonoïde-zirconium selon Hansel. La coloration jaune obtenue, stable en milieu tamponné, permet d'évaluer par spectrophotométrie U.V. la teneur en flavonoïdes de l'échantillon par rapport à une solution témoin de rutósíde.

a)- Matériel et réactifs

- solution flavonique
- oxychlorure de zirconium
- rutósíde
- solution tampon: (acétate de sodium : 27 g
(acide acétique glacial : 24 ml
(eau distillée qsp : 200 ml
- alcool à 50°
- spectrophotomètre
- tubes à essai

b)- Méthodes

A 0,1 ml de la solution flavonique, sont ajoutés 5 ml de solution tampon et 1 ml de solution aqueuse d'oxychlorure de zirconium à 3 % (P/V). Après 15 minutes, la densité optique (D.O) est mesurée à 400 nm par rapport à une solution témoin dans laquelle l'oxychlorure de zirconium a été remplacée par l'eau.

La teneur en polyphénols est obtenue par référence à une courbe d'étalonnage établie pour des concentrations de rutoside allant de 0 à 50 mcg/ml. Les résultats sont exprimés en grammes de rutoside pour 100 g de matière sèche (voir tableau 10 p.71).

- Dosage par oxydation**+ par le réactif de Folin-Denis**

Principe : Le réactif de Folin-Denis est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_6O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) ; la coloration produite (absorption maximale comprise entre 725 et 750 nm) est proportionnelle aux taux de composés phénoliques. Cette réaction sert de dosage des composés phénoliques totaux .

a)- Matériel et réactifs

- extrait à doser
- acide tanique
- tubes à essai
- spectrophotomètre.

b)- Méthodes

Le réactif de Folin - Denis est préparé en mélangeant 750 cm³ d'eau, 100g de Na₂WO₄ · 2H₂O, 20g d'acide de phosphomolybdique et 50 cm³ d'acide phosphorique. On chauffe sous reflux pendant 2h et, après refroidissement on complète à 1000 cm³.

On utilise également une solution de carbonate de sodium préparée en dissolvant à 70 ou 80°C, 35 g de Na₂CO₃ anhydre dans 100 ml d'eau ; après refroidissement pendant 10h, on provoque la cristallisation dans la solution sursaturée en ajoutant un cristal de Na₂CO₃, 10h20. Après cristallisation, on filtre sur laine de verre.

Pour effectuer le dosage, on part d'une prise d'essai de 1,5 ml contenant approximativement 0,1 à 1 mg de composés phénoliques que l'on place dans une fiole jaugée de 50 ml, contenant environ 37,5 cm³ d'eau. On rajoute 2,5 cm³ de réactif de Folin - Denis et 5 cm³ de la solution de Na₂CO₃. On dilue ensuite avec de l'eau jusqu'à 50 cm³. Après agitation, on détermine la densité optique à 730-760 nm sous 1 cm d'épaisseur. On peut exprimer le résultat en milligrammes par litre d'acide tanique, en comparant avec une courbe étalon préparée à partir d'une solution de référence, obtenue en dissolvant 100 mg d'acide tanique dans 1 l d'éthanol 60 % .

Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir de concentrations différentes d'acide tanique dont la densité optique (D.O.) est lue au spectrophotomètre.

Solution mère : 11 mg d'acide tanique complété
à 100 ml avec de l'éthanol à 60°
soit une concentration
C = 0,11 mg/ml.

Le dosage en composés polyphénoliques de l'extrait est effectué à partir d'une prise d'essai de 1,5 ml que l'on place dans une fiole jaugée de 50 ml, contenant environ 37,5 cm³ d'eau. On rajoute 2,5 cm³ de réactif de Folin Denis et 5 cm³ de la solution de Na₂CO₃. On dilue ensuite avec de l'eau jusqu'à 50 cm³ . Après

agitation on détermine la D.O. à 730 - 760 nm sous 1 cm d'épaisseur.

La détermination de la concentration en flavonoïdes de l'extrait est faite à partir de la courbe d'étalonnage (voir tableau 11 p.72).

+ Par le permanganate de potassium (KMnO_4)

Principe : Le KMnO_4 , en solution diluée (N/100) et à froid, oxyde les composés phénoliques en milieu acide. Cette réaction sert de base à une méthode volumétrique classique de dosage des composés phénoliques totaux. Mais tous les composés phénoliques présents, à concentration égale, ne réduisent pas la même quantité de KMnO_4 . Le résultat représente donc une détermination globale qui fournit un indice, l'indice de KMnO_4 .

a)- Matériel et réactifs

- extrait à doser
- solution de KMnO_4 0,01 N
- eau distillée
- indicateur coloré : Carmin indigo
- burette graduée.

b)- Méthodes

On utilise une solution de KMnO_4 N/100 fraîchement préparée à partir d'une solution N/10 de KMnO_4 de titre exact. On prépare d'autre part à partir d'une solution de carmin d'indigo à 3g/ml filtré, la liqueur suivante: 50cm³ de la solution précédente, 50 cm³ de H_2SO_4 au 1/3 et 100cm³ d'eau.

Le dosage se fait par différence entre un témoin (ne renfermant pas d'extrait à doser) et un essai (constitué par l'extrait à une concentration donnée).

La solution de KMnO_4 est renfermée dans la burette est versée goutte à goutte jusqu'au virage de l'indicateur coloré. La différence entre les deux volumes de KMnO_4 versés pour l'essai et pour le témoin permet de déterminer l'indice de KMnO_4 (voir p.71).

B - MICROBIOLOGIE

L'essai physiologique d'une drogue comprend essentiellement deux volets : l'un ayant trait à l'évaluation de la toxicité et l'autre à la détermination de l'activité spécifique soit sur microorganisme, soit sur animal entier ou sur organe isolé maintenu en survie.

L'activité physiologique n'est pas toujours exprimable en valeur absolue, mais seulement comparativement à celle d'une substance type, choisie comme étalon de comparaison.

Dans le cadre de ce chapitre, nous avons choisi des microorganismes souvent incriminés dans les pathologies qui nous intéressent (gastroentérites). L'étude expérimentale est conduite de façon à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB). Des études cinétiques sont mises à profit pour mieux comprendre le comportement des microorganismes vis-à-vis des extraits alcaloïdiques au cours du temps.

1. Test de cytotoxicité sur amibe pathogène :

Entamoeba histolytica

a)- Matériel et réactifs

- extrait : lyophilisat de décocté d'écorces de tiges
- oeuf frais de poule (de 24 h au plus)
- poudre de riz stérile

- solution de Locke : (NaCl = 8 g
- ((CaCl₂. 2H₂O) = 0,2 g
- (KCl = 0,2 g
- (MgCl₂.6H₂O = 0,01 g
- (Na₂ HPO₄ = 2 g
- (NaH CO₃ = 0,4 g
- (KH₂ PO₄ = 0,3 g
- (Eau distillée = 1000 ml

- billes de verre
- étuve.
- autoclave
- gaz
- tubes à essai.

b)- Méthodes

Ces tests ont été effectués sur de jeunes cultures d'amibes (formes végétatives) isolées de selles dysentériques. Le milieu de culture est un milieu biphasique ou milieu de Broeck. Il est constitué d'une phase liquide ou solution de Locke et d'une phase solide constituée d'oeuf frais cassé et homogénéisé avec des billes de verre. Après homogénéisation, l'oeuf est réparti dans des tubes à essai (5 ml), solidifié et stérilisé à l'autoclave en formant un plan incliné. Additionné de solution de Locke et de 2 à 3 mg de poudre de riz stérile, l'oeuf solidifié est stérilisé à 121° C pendant 15 minutes à l'autoclave et placé à l'étuve à 37° C pour vérifier la stérilité.

Les tests de cytotoxicité ont été effectués avec différentes concentrations de lyophilisat de décocté et de produits de référence : flagyl, 2-Déhydroémétine. Ces solutions de concentrations différentes ont été préparées avec de la solution de Locke.

Au bout de 24 H de temps à l'étuve à 37° C, des prélèvements sont effectués et la lecture faite entre lame et lamelle au microscope optique.

2. Tests de cytotoxicité sur amibe non pathogène Amoeba proteus

Amoeba proteus est un protozoaire largement étudié pour les informations fondamentales qu'il donne sur le cytoplasme, les fonctions des organites et du noyau. Il est indiqué comme organisme dans les tests de cytotoxicité. Ce microorganisme non pathogène est une cellule eucaryote parfaite. La culture est facile Elle exige la présence dans le milieu d'autres protozoaires comme le *Tétrahymena pyriformis* qu'elle phagocyte (DUEZ et coll., 1991). Le médicament administré per os, par voie intrapéritonéale ou par intraveineuse est nécessairement en contact direct avec les cellules humaines différentes de son site d'action. Le comportement des extraits vis-à-vis des amibes non pathogènes donne une idée de l'effet de ces extraits sur les cellules normales.

Un essai comparatif d'efficacité a été réalisé entre les écorces de tiges et les feuilles en vue d'une orientation de choix entre extraits alcaloïdiques plus ou moins enrichis en conessine et la partie de la plante (feuilles ou écorces de tiges) qui serait efficace et atoxique aux doses d'utilisation thérapeutique après les études pharmacocinétiques et les essais cliniques (tableaux 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 , p.74 à 77).

Il a été effectué parallèlement, une étude comparative de cytotoxicité avec l'Emétine, un anti-amibien de la thérapeutique qui fut récemment abandonné en faveur de la 2-Déhydroémétine (voir tableau 12 p.74).

a)- Matériel et réactifs

- Amibes non pathogènes (*Amoeba proteus*)
- Protozoaires : *Tétrahymena pyriformis*

- Centrifugeuse
- Tubes à essai et à centrifuger stériles
- Bols rincés à l'eau bidistillée et stérilisés
- Microscope binoculaire
- Bleu trypan
- Tryptose ou proteose peptone - Agar
- Extrait de levure
- Mg SO₄ . 7H₂O
- Ca HPO₄ . 2H₂O
- KCl
- H₂O bidistillée
- Cannes en verre
- Ouate
- Erlen - Entonnoirs - Plaque chauffante -

b)- Méthode

Avant de procéder aux tests proprement dits, les amibes et le *Tétrahymena* sont cultivés sur milieux spécifiques.

b1. Milieu de culture des amibes

Mg SO ₄	:	8,2 g
Ca H PO ₄ . 2H ₂ O	:	10,2 mg
KCl	:	12 mg
H ₂ O bidistillée	:	2 l

Le mélange est agité et chauffé légèrement sur plaque chauffante (40°C) jusqu'à dissolution complète.

b2. Milieu de culture pour *Tétrahymena*

Tryptose	:	18 g
Extrait de levure	:	2 g
H ₂ O bidistillée	:	1 l

Le mélange est chauffé à ébullition jusqu'à dissolution et réparti dans des tubes préalablement stérilisés. Ces tubes sont alors bouchés avec de l'ouate et stérilisés à l'autoclave à 120° C pendant 20 mn.

Le Tetrahymena est lavé avec une solution d'agar (30 mg/100 ml de milieu de culture des amibes). Pour ce lavage, on procède à une centrifugation, au prélèvement du surnageant. Le culot est constitué de Tetrahymena. Cette opération est répétée 3 fois.

Les bols d'amibes sont rincés avant la mise en contact avec le Tetrahymena. Pour cela, le surnageant (milieu de culture pour amibes) est soigneusement prélevé et remplacé par du milieu de culture neuf. L'opération est répétée 3 fois.

b3. Tests

- Répartition des amibes : environ 50 par cupule
- Aspiration au maximum du milieu de culture de chaque cupule
- Volume d'extrait introduit dans chaque cupule : 2 ml
- Temps de contact : 2 H
- Aspiration de l'extrait et rinçage deux fois de suite avec du milieu de culture
- 2 gouttes de bleu trypan (2 % dans le milieu de culture) sont ajoutés dans chaque cupule ; temps de contact : 30 secondes

- Addition de 2 ml de milieu de culture dans chaque cupule - Rinçage et aspiration deux fois de suite
 - Comptage des amibes vivantes : ces amibes restent incolores ; celles mortes se colorent en bleu.
- Chaque expérience a été reprise 3 fois.

3. Criblage microbiologique sur bactéries à Gram (+) et à Gram (-) par la détermination de CMI (Concentration minimale inhibitrice) et CMB (Concentration minimale bactéricide) -

a)- Matériel et réactifs

- Souches bactériennes :

- . *Streptococcus faecalis* CNCM 5855
- . *Escherichia coli* ATCC 11 229,
Escherichia coli O 119 B14 et
Escherichia coli O127 B8
- . *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* et
Proteus vulgaris NCTC 4635
- . *Providencia alcalifaciens*
- . *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 et
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- . *Salmonella typhimurium*
- . *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et
Staphylococcus aureus ATCC 13150
- . *Yersinia enterocolitica*

- Milieux de culture :

- . Gélose trypticase soya (TSA)
- . Bouillon trypticase soya (TSB)

tube	T1	:	5	mg/ml
	T2	:	2,5	mg/ml
	T3	:	1,25	mg/ml
	T4	:	0,625	mg/ml
	T5	:	0,312	mg/ml
	T6	:	0,156	mg/ml
	T7	:	0,078	mg/ml
	T8	:	0,039	mg/ml
	T9	:	0,020	mg/ml
	T10	:	0,010	mg/ml
	T11	:	0,005	mg/ml
	T12	:	0,0025	mg/ml
	T13	:	0,0013	mg/ml
	T14	:	0,0007	mg/ml
	T15	:	0	mg/ml
	T16	:	0	mg/ml.

Un inoculum de 50 mcl d'une suspension bactérienne de 18 à 24 h est ajouté dans tous les tubes. Ces derniers sont placés à l'étuve pendant 24 h à 37° C. La lecture des tubes se fait à l'oeil nu au bout des 24 h (voir schéma 1 p.44).

En milieu liquide, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) se fait à l'oeil nu. La CM se définit comme la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'interrompre dans un milieu et à des concentrations parfaitement définies toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée.

c)- Dénombrement

La détermination de la densité de la suspension bactérienne inoculée se fait par des dilutions au dixième et l'ensemencement en gélose profonde. Les boîtes de pétri sont

placées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

Le dénombrement des colonies formées se fait au bout des 24 h.
(Voir résultats : tableau 19 p.83)

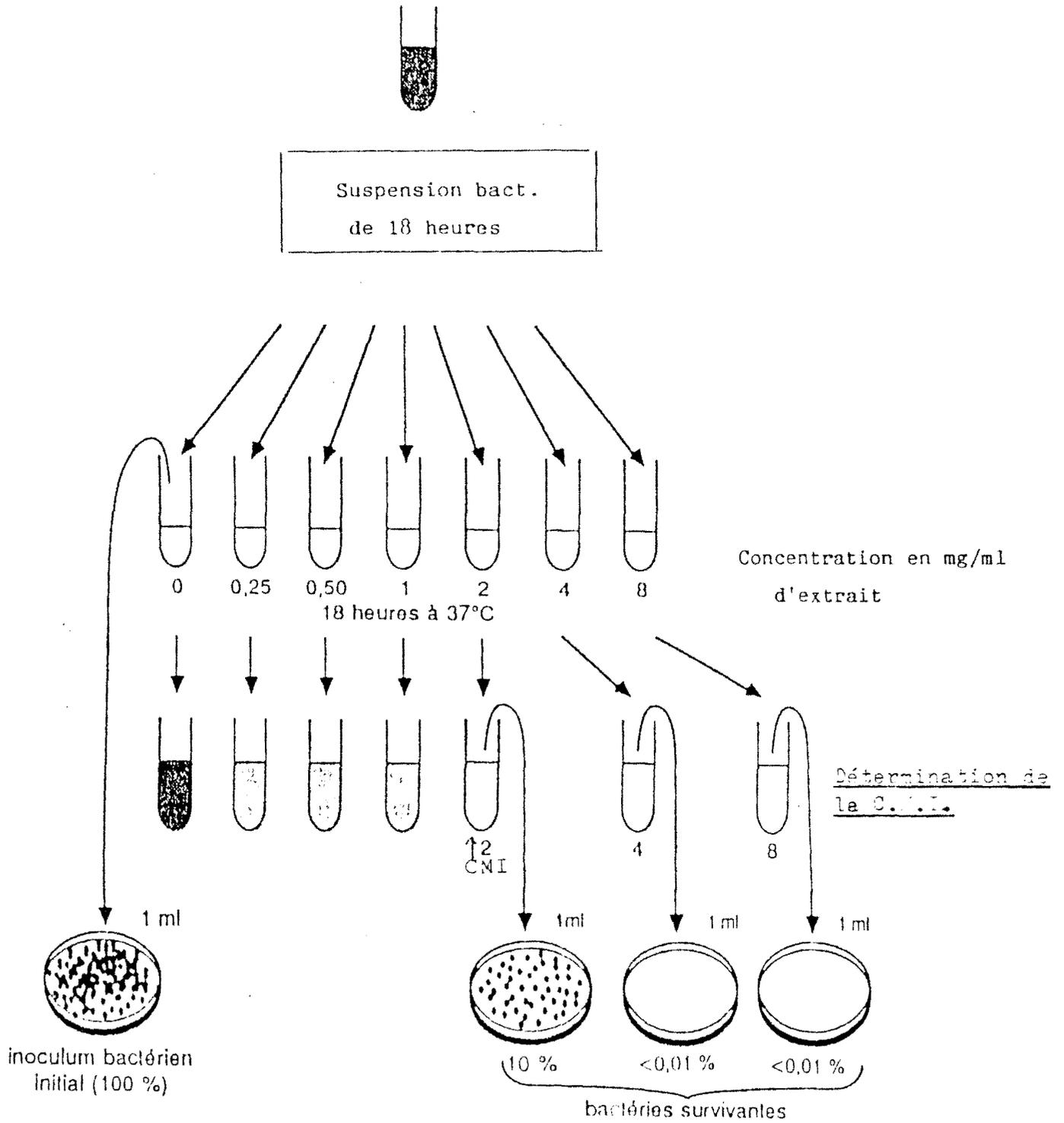
d) Détermination de la CMB (Concentration
Minimale Bactéricide)

La CMB est déterminée à partir de la CMI. Les tubes ne présentant pas de pousse visible sont ensemencés dans 14 ml de gélose fondue et refroidie à 50° C, dans des boîtes de pétri qui sont ensuite placées à l'étuve à 37° C pour 18 à 24 h.

La concentration minimale bactéricide (CMB) est déterminée par la plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister qu'un nombre de survivants inférieur ou égal à 10^{-4} bactéries de l'inoculum (soit un survivant sur 10.000) après 18 h d'incubation à 37°C. Autrement dit, c'est la concentration minimale d'extrait qui tue au moins 99,99 % d'une population microbienne donnée (voir schéma n°1 p.44).

La CMI et la CMB ont été déterminées avec des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux et des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux méthylés des écorces de tiges, des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de feuilles (Voir tableau 19 p. 83).

La CMI a été également déterminée avec les lyophilisats de décocté d'écorces de tiges et de feuilles.



Détermination de la Concentration
Minimale Bactéricide (C.M.B.)

4. Etudes cinétiques d'inhibition de croissance de différents extraits sur une souche bactérienne : Escherichia coli O119 B14

a)- Matériel et réactifs

- Extraits :
 - . Chlorures d'alcaloïdes totaux de la station de Farako-Bâ, de teneurs différentes en conessine
- Protamine
 - Milieux de culture :
 - . Bouillon Mueller Hinton
 - . Trypticase soya agar (TSA) : culots de 14 ml
 - Solution inactivante : + letheen broth : 25,7 g
 - : + lécithine : 2,3 g
 - : + tween 80 : 25 g
 - : + L. Histidine : 1 g
 - : + Thiosulfate de Na : 5 g
 - : + Eau distillée : 1 l
 - Solution tamponnée de chlorure de sodium avec peptone (FIP)
 - Eau distillée stérile
 - tubes à essai stérils
 - Pipettes :
 - . pipettes de 5 cc
 - . pipettes de 10 cc
 - . pipettes de 1 cc
 - Agitateur vortex
 - Etuve

b)- Méthodes

b.1 - Détermination de la CMI et de la CMB des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux A1 et A2 vis à vis de Escherichia coli 0119B14

- . Teneur en conessine de A1 : 23,70 %
- . Teneur en conessine de A2 : 20,65 %.

La méthode adoptée est celle de Chabbert pour la détermination de la CMI en phase liquide. A partir d'une solution mère de 10 mg d'extrait par ml de bouillon (M.H) stérile, on effectue des dilutions au demie dans du bouillon Mueller Hinton stéril préalablement réparti en volume de 5 ml dans des tubes à essai et incubé à 37° C pendant 18 à 24 h pour en vérifier la stérilité.

La lecture se fait au bout de 24 heures, à l'oeil nu pour la CMI. La CMB est déterminée à partir de la CMI comme précédemment.

Ces valeurs obtenues permettent le choix des concentrations d'extraits pour les études cinétiques.

b.2 - Cinétique de l'activité antibactérienne de l'extrait A1 avec E. coli 0119 B14

Nous avons adopté la même méthode que P. BOUSSARD (1991). Avant d'entamer les tests, la souche est repiquée trois jours de suite sur du TSA. Le 4^e jour elle est cultivée dans du bouillon TSB pour 18 à 24 h. Le 5^e jour, elle est prête pour l'étude (voir schéma n°2 p.49).

Les études cinétiques ont été effectuées avec les alcaloïdes totaux A1 de teneur en conessine : 23,70 % .
En vue d'augmenter la perméabilité membranaire pour une plus grande efficacité de l'extrait alcaloïdique, nous avons associé la protamine sulfate à une concentration choisie arbitrairement.

Deux séries d'études ont été effectuées avec A1.

1ère série

- Solutions mères :

Alcaloïdes totaux A1 : 5 mg/ml
Protamine sulfate : 2 mg/ml

Témoin : (- Alcaloïdes totaux A1 : 2 ml

T (- Volume d'eau distillée stérile : 8 ml
(Volume final : 10 ml
((A1) = 1 mg/ml

Essai 1 (- Alcaloïdes totaux A1 = 2 ml

(- Protamine sulfate : 0,5 ml
E1 (- Eau distillée stérile : 7,5 ml
(Volume final = 10 ml
((A1) = 1 mg/ml
((Protamine) : 100 mcg/ml

Essai 2 (- Protamine sulfate : 0,5 ml

(- Eau distillée stérile : 9,5 ml
(Volume final : 10 ml
((Protamine) : 100 mcg/ml

Volume de suspension bactérienne inoculée dans les chacun des tubes : 50 mcl.

Les prises ont été effectuées au bout de : 30 mn, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h puis 24 h.

(Voir résultats : tableaux 20 et 21 p. 85 et 86).

Pour chaque prise, 1 ml est prélevé du tube réactionnel puis ajouté à 9 ml de solution inactivante. Des dilutions au dixième sont effectuées. De ces dilutions on prélève 1 ml qu'on ensemence dans de la gélose TSA (14 cc) fondue et refroidie 50° C. Les boîtes de pétri sont incubées à 37° C pendant 18 à 24 h au bout desquelles se feront les dénombrements.

2^e série

Souche : E. coli 0119 B14

Extraits : - Alcaloïdes totaux A1
- Protamine sulfate

- Détermination de la CMI avec la protamine sulfate et avec les alcaloïdes totaux A1: le protocole est le même que précédemment et les études cinétiques se font en fonction de ces résultats.

Solutions mères :

- . Alcaloïdes totaux : 10 mg/ml
- . Protamine sulfate : 0,2 mg/ml

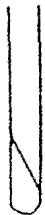
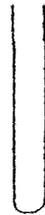
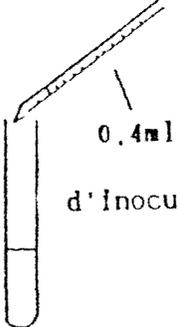
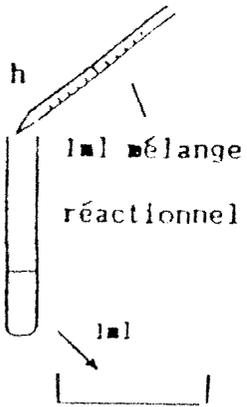
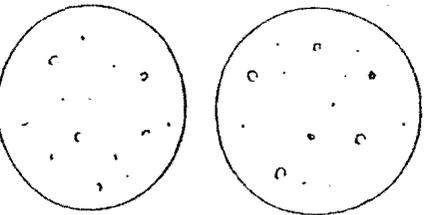
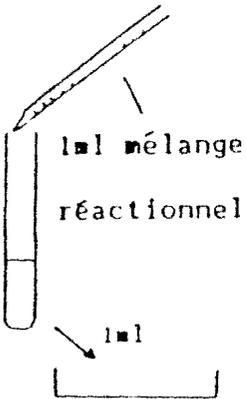
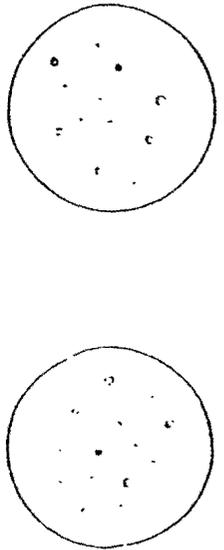
Témoin (- Alcaloïdes totaux A1 : 4 ml
(- Eau distillée stérile : 6 ml
(Volume final : 10 ml
concentration en A1 = 4 mg/ml

Essai (- Alcaloïdes totaux A1 : 4 ml
(- Protamine sulfate : 0,8 ml
(Eau distillée stérile : 5,2 ml
(Volume final = 10 ml
concentration en A1 = 4 mg/ml
concentration en Protamine = 16 mcg/ml

Les prises ont été effectuées à 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h et 24 h.

(Voir résultats tableaux 22 et 23 p. 88 et 89).

Evaluation de l'efficacité in vitro des extraits contenant de la conessine, au cours du temps de 30 à 24 heures, en présence et en absence de protamine.

1-2-3 ^{ème} JOUR	4 ^{ème} JOUR	5 ^{ème} JOUR	6 ^{ème} JOUR	7 ^{ème} JOUR
<p><u>Culture</u> sur gélose TSA</p> 	<p><u>Culture</u> en bouillon TSB</p> 	<p><u>0 minute</u></p> <p>10 ml de solution d'extraits</p>  <p>0.4 ml d'inoculum</p> <p><u>Prises:</u> 2, 4, 6 et 8 h</p>  <p>1 ml mélange réactionnel</p> <p>9 ml solution inactivante</p> <p>1 ml</p> <p>1 ml</p> <p>+ 14 ml TSA</p>	<p><u>LECTURE:</u> Comptage des colonies Temps (2-4-6-8h)</p>  <p><u>Prises:</u> 24 h</p>  <p>1 ml mélange réactionnel</p> <p>9 ml solution inactivante</p> <p>1 ml</p> <p>1 ml</p> <p>+ 14 ml TSA</p>	<p><u>LECTURE:</u> Comptage des colonies (temps de 24h)</p> 

5. Activité inhibitrice comparée des extraits alcaloïdiques des trois stations expérimentales sur E. coli O₁₂₇ B₃

Cette souche a été isolée de selles diarrhéiques d'un enfant de 2 ans. Elle a été repiquée à plusieurs reprises avant d'être soumise aux tests.

a)- Matériel et réactifs

- Extrait : chlorhydrates d'alcaloïdes totaux - Station Farako-Bâ - Teneur en conessine : 17,25 %
- Milieux de culture :
 - . Trypticase soya agar (TSA)
 - . Bouillon Biopolytone
- Solution tamponnée de chlorure de sodium avec peptone
- Eau distillée stérile
- tubes à essai - pipettes de 1 cc
- Agitateur vortex - Etuve.

b)- Méthodes

b.1 - Antibiogramme

Avant d'effectuer les tests d'inhibition de croissance, un antibiogramme a été réalisé en vue d'avoir une idée sur le degré de résistance de la souche. Cet antibiogramme a été réalisé avec des disques chargés d'antibiotiques couramment utilisés en microbiologie : Tétracycline, Ampicilline, Bactrim, Pénicilline, Bacitracine, Néomycine, Colistine, Gentamycine. (Voir résultats p.90)

b.2 - Détermination de la CMI et de la CMB avec les extraits alcaloïdiques des 3 stations expérimentales

Le protocole adopté est celui de Chabbert, utilisé pour les tests précédents. (Voir résultats: tableau 24 p. 90)

b.3 - Activités inhibitrices avec d'autres extraits

Ces extraits testés sont: alcaloïdes totaux de feuilles, décocté de feuilles et d'écorces de tiges. (Voir résultats :tableau 25 p.91)

C - TOXICO-PHARMACOLOGIE

Au regard des résultats fort intéressants enregistrés en microbiologie, nous entreprenons dans le cadre de ce chapitre, la détermination in vivo de la dose létale 50 % (DL50) et de l'effet d'extraits sur des fragments d'intestins isolés et maintenus en survie. L'objectif visé est de situer les différents extraits de la plante sur l'échelle de toxicité, de les standardiser et d'analyser les interactions de l'acétylcholine, neuromédiateur chimique, avec ces extraits.

1. Détermination de la dose létale 50 % (DL 50)

Par définition, la DL50 est la dose qui, administrée à une population, en tue les 50 % . Elle est obtenue à partir de mortalités cumulées.

a)- Matériel

- Biologique : souris blanches de 3 mois environ, élevées dans des conditions de laboratoire (température : 20°-25° C, humidité relative : 50-60 % -Alternance veille-sommeil (jour et nuit).

- Végétal

Organes : écorces de tiges

Extraits : + lyophilisat de décocté de feuilles et d'écorces de tiges

+ chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges (station Farako-Bâ)

+ chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de feuilles

- Balance

- Seringue de 1 cc munie d'aiguille

- Acide picrique 1 %

b)- Méthodes

Après 24 h de jeûn, les souris sont marquées à l'acide picrique et soumises à différentes doses d'extrait administrées par voie intrapéritonéale.

Des tests préliminaires sont effectués pour situer les doses à administrer.

- Avec le lyophilisat de décocté d'écorces de tiges, les doses administrées par lot de 4 souris sont:

lot 1 : 500 mg/kg poids corporel

lot 2 : 750 mg/kg pc

lot 3 : 1000 mg/kg pc

lot 4 : 1500 mg/kg pc

lot 5 : 2000 mg/kg pc

- Avec le lyophilisat de décocté de feuilles, ces doses sont : 750 mg/kg pc - 1000 mg/Kg pc - 1250 mg/Kg pc - 1400 mg/kg pc.

- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges (station Farako-Bâ), les doses administrées sont : 25 mg/kg pc - 30 mg/kg pc - 40 mg/kg pc - 50 mg/kg pc - 75 mg/kg pc - 100 mg/kg pc.

- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des feuilles les doses administrées sont : 100 mg/kg - 75 mg/kg - 50 mg/Kg. (Voir résultats : tableaux 26- 27- 28- 29- 30 p. 92-96).

2. Tests sur intestin isolé**a)- Matériel et réactifs**

- Biologique : rats Wistar albinos élevés dans des conditions du laboratoire.

- Végétal

+ organes : . écorces de tiges
 . feuilles

+ extraits : lyophilisats de décocté des écorces
 de tiges et des feuilles

- Kymographe muni d'un cylindre enregistreur

- Solution mère de tyrode, liquide physiologique composé
 comme suit :

Na Cl	160 g
KCl	4 g
Ca Cl ₂	2 g
Mg Cl ₂	2 g
Eau qsp	1 l

Solution préparée pour usage immédiat.

Tyrode concentré (solution-mère)	100 ml
Glucose	2 g
Na HCO ₃	2 g
Eau qsp	2 l.

b)- Méthodes

La méthode adoptée est celle classique effectuée sur organe isolé qui, ici, est le duodénum de rat (Rat Wistar albinos). Après 24 heures de jeûn, le rat est sacrifié, son abdomen, immédiatement ouvert. Un fragment de 2 cm prélevé dans le duodénum est plongé dans du tyrode et soumis à l'oxygénation pendant 30 minutes. Il est monté entre capteur de force isotonique et potence, dans une cellule thermostatée de 10 ml, la partie supérieure reliée au stylet inscripteur qui enregistre les contractions pour les transcrire sur le cylindre enregistreur. Après chaque essai, le fragment est rincé en vidangeant 2 ou 3 fois la cellule et en y introduisant du tyrode.

Le fragment est initialement soumis à des concentrations de plus en plus croissantes d'acétylcholine (ACH). L'amplitude de contraction augmente avec la concentration en acétylcholine. Lorsque, pour deux concentrations différentes d'ACH, l'amplitude de contraction demeure la même, cela signifie que les récepteurs muscariniques et nicotiniqes sont saturés par le spasmogène ; la contraction est maximale. La dose immédiatement inférieure à celle optimale est dite dose submaximale et c'est celle considérée pour la suite de l'enregistrement. Ici elle correspond à 1 mcg/ml.

Le premier enregistrement effectué est celui du tonus de base. Puis, dans la cellule où plonge le fragment, on ajoute 0,1 ou 0,2 ml d'ACH 10^{-1} mg/ml à la solution de tyrode, ce qui permet d'obtenir un pic. Le fragment est immédiatement rincé. Après obtention de 4 pics de même amplitude, le fragment est soumis à 0,1 ml ou 0,2 ml d'une concentration de l'extrait testé, dont l'effet est enregistré pendant 4 minutes. Puis, sans rinçage, on ajoute 0,1 ou 0,2 ml d'ACH 0,1 mg/ml, en vue d'avoir une idée sur l'interaction ACH - extrait. L'expérience est reprise après 6 minutes environ. (Voir résultats Fig. 8 et 9 p. 99 et 100)

3è PARTIE : RESULTATS

A - CHIMIE

1. Extraction des principes actifs des écorces de tiges et des feuilles par décoction - lyophilisation

- Avec les écorces de tiges

Tableau I

Prise essai en grammes éch.différents	Poids du lyophilisat en grammes	Teneur en pourcentage(%)
50	9,49 ± 0,30	18,50
150	22,55 ± 0,44	15,03
65	14,5 ± 0,23	22,30

- Avec les feuilles

Tableau II

Prise essai en grammes	Poids du lyophilisat en grammes	Teneur en pourcentage (%)
150	35,32 ± 0,28	23,54
30	7,82 ± 0,16	26,07

Les extractions des principes chimiques par décoction à partir des écorces de tiges et des feuilles faites dans les conditions mentionnées dans le protocole donnent un rendement en lyophilisat correspondant environ aux 20% du poids de la matière sèche.

2. Screening chimique

- du décocté d'écorces de tiges

- + Sucres réducteurs : +++
- + Tanins catéchiques: ++
- + Saponosides : ++
- + Alcaloïdes sels : +++

NB :

+++ signifie très abondant

++ signifie abondant

Ce screening montre que le décocté est très riche en alcaloïdes sels et en sucres réducteurs, riche en tanins et en saponosides . Ces résultats montrent également la thermostabilité des fonctions caractéristiques de ces principes chimiques extraits par décoction.

- complet des écorces de tiges

Le fractionnement des groupes de principes chimiques a été effectué par des solvants de polarité croissante (chloroforme, éthanol, eau) et l'identification des différents principes chimiques ou groupes de principes chimiques par des tests de caractérisation.

Tableau du screening chimique
 (identification des principes chimiques)
 des écorces de tiges de *Holarrhena floribunda*

Tableau III

Extraits	Groupes de principes chimiques	Résultats
<u>Chloroformique</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Matières grasses: (stéroïls et triterpènes (caroténoïdes (Acides gras - Alcaloïdes bases - Aglycones flavoniques - Emodols - Coumarines 	<ul style="list-style-type: none"> +++ ++ +++ +++ - ++ +(à 375 nm
<u>Ethanolique</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Tanins catéchiques - Composés réducteurs - Alcaloïdes sels - Anthracénosides - Dérivés coumariniques - Stéroïls glycosidiques - Flavonosides - Anthocyanes 	<ul style="list-style-type: none"> +++ +++ +++ +++ ++(à 375 nm +++ ++ (±)
<u>Aqueux</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Composés réducteurs - Glucides (oses et polyoses) - Saponosides - Tanins (-catéchiques (-galliques - Alcaloïdes sels 	<ul style="list-style-type: none"> ++ +++ +++ +++ (+) +++

Ce screening chimique montre la très grande richesse des écorces de tiges en principes chimiques divers: alcaloïdes, stéroïdes et triterpènes, composés polyphénoliques (tanins, anthracénosides), composés réducteurs, dérivés coumariniques... Les alcaloïdes ont été extraits par ces différents solvants, ce qui signifie qu'ils existent dans la matière aussi bien sous forme de bases (extractibles par des solvants organiques) que sous forme de sels hydrosolubles extractibles par l'éthanol et par l'eau.

3. Extraction des alcaloïdes totaux des écorces de tiges et des feuilles

- Avec les écorces de tiges

Tableau IV

Station expérimentale	Prise essai en g	Diamètre des rameaux (x) en cm	Poids d'alcaloïde totaux en g	Teneur en %
Gampèla	250	5 < x < 7	1,28	0,50
	80	7 < x < 9	0,8362	1,04
Farako-Bâ	200	5 < x < 7	5,2123	2,60
	100	7 < x < 9	2,8665	2,86
CNRST	250	5 < x < 7	2,4	0,96
	230	7 < x < 9	4,2919	1,86

Ces résultats montrent que la teneur en alcaloïdes varie en fonction du diamètre des rameaux sur lesquels sont prélevées les écorces. Mais le plus important est que pour des échantillons prélevés dans les mêmes conditions (diamètre des rameaux, même période de l'année) la station Farako-Bâ réunit les conditions les plus favorables à la synthèse des alcaloïdes: 2,86% contre 1,86% pour la station du CNRST et 1,04% pour la station de Gampèla.

- Avec les feuilles

Tableau V

Prise essai en g	Poids d'alcaloïdes totaux en g	Teneur en %
520	4,42 ± 0,38	0,85
100	1,2 ± 0,06	1,2

Chaque expérience a été répétée au moins trois fois et le poids d'alcaloïdes totaux obtenu est une moyenne.

Ces teneurs ont été déterminées à partir du même échantillon (prélevé à Farako-Bâ) mais les techniques adoptées sont différentes. Ainsi la deuxième technique est celle permettant une meilleure extraction des alcaloïdes et sera de ce fait retenue pour les extractions d'alcaloïdes à partir des feuilles.

4. Enrichissement du totum alcaloïdique en conessine

Après méthylation par l'acide formique et le formaldéhyde, le totum alcaloïdique donne en CCM (chromatographie sur couche mince) un seul spot correspondant à celui de la conessine dont la densité est nettement supérieure à celle avant méthylation. En effet la teneur en conessine passe après méthylation de 20,65 à 70 % .

5. Purification des alcaloïdes totaux
par le biais des oxalates

La transformation du totum alcaloïdique basique en oxalates d'alcaloïdes totaux puis en alcaloïdes bases donne en CCM des spots bien nets, supprimant ainsi toutes les traînées observées avant ces opérations. Cette opération permettra l'isolement des différents types d'alcaloïdes renfermés dans le totum alcaloïdique.

6. Dosage des alcaloïdes en CCM par spectrophotodensitométrie

+ Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges

- Etalonnage avec différentes concentrations de conessine base

tableau VI

Concentration en conessine en mg/ml	Signal n = 3
0,40	9972,65 ± 787,15
0,60	15496,29 ± 1581,08
0,80	17072,10 ± 971,66

$r = 0,9795$ ($r =$ coefficient de corrélation)

$n =$ nombre de spots lus

Ce tableau VI permet de tracer une courbe d'étalonnage à partir de laquelle seront extrapolées les différentes teneurs en conessine renfermées dans les échantillons. La valeur du signal est proportionnelle à la teneur en conessine.

- Dosage de la conessine dans les différents échantillons

Tableau VII

Station expérim.	(alc.tot.) en mg/ml	Signal	(Coness.) en mg/ml	Teneur en conessine en %
Farako-Bâ	2	15732,05±1518	0,34	17,25 ±0,2
C.N.R.S.T	2	27360,81±753	0,66	33,5 ±0,3
Gampèla	5	9138,27±219	0,16	3,28±0,35

(alc. tot.) = concentration en alcaloïdes totaux

(coness.) = concentration en conessine

Ce tableau présente les différentes teneurs en conessine à partir des échantillons provenant des trois stations expérimentales. L'échantillon du CNRST est de loin le plus riche en conessine: 33,5% contre 17,25% pour celui de Farako-Bâ et 3,28% pour celui de Gampèla. Les dosages ont été effectués à partir de solutions de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de concentrations différentes.

+ Avec la poudre et le lyophilisat de décocté
d'écorces de tiges

Tableau VIII

Standards	Concentration en conessine en mg/ml	Signal
T ₁	0,4	73980
T ₆	0,6	89028
T ₈	0,8	112831

$r = 0,992$

Tableau IX

Echantillons	(alc.tot.) en mg/ml	Signal	Teneur en conessine en %
Poudre (station Farako-Bâ)	0,210	53612	0,21
Lyophilisat de décoc- té (station Gampèla)	0,281	44466	0,05

Les teneurs en conessine des différents échantillons du tableau IX ont été obtenues à partir de la droite d'étalonnage du tableau VIII.

Le lyophilisat de décocté de l'échantillon de Gampèla est très pauvre en conessine. La poudre d'écorces de tiges de la station de Farako-Bâ est relativement riche en conessine.

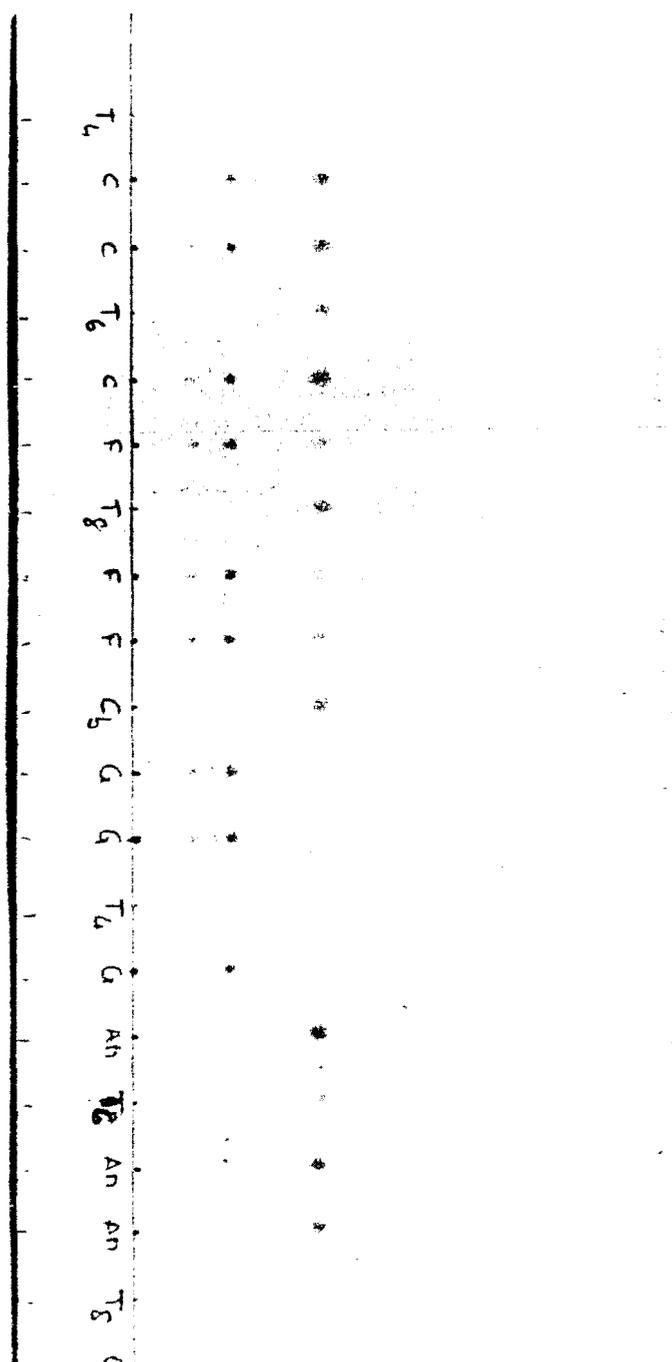


Fig.1 - Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes totaux des différentes stations expérimentales et des témoins de conessine base

T₄ = Témoin = 0,2 mg de conessine/ml
 T₆ = " = 0,3 mg/ml "
 T₈ = " = 0,4 mg/ml "
 Cb = " = 0,5 mg/ml "
 C = alcaloïdes totaux - station du CNRST
 F = " " " Farako-Bâ
 G = " " " Gampèla
 AM = " " méthylés- station de Farako-Bâ

Les spots de même Rf que ceux de la conessine témoin (T₄, T₆, T₈, Cb) correspondent à la conessine. Les spots immédiatement inférieurs sont ceux de l'isoconessimine (SCHMIT, 1950). Toujours selon Schmit, les troisième spots correspondraient à ceux de la conessimine.

Avec l'échantillon de Gampèla, les spots de la conessine sont presque inexistantes. Avec les alcaloïdes totaux méthylés, il n'existe qu'un seul spot correspondant à la conessine, les autres correspondant à ceux de l'isoconessimine et de la conessimine ont disparu. La méthylation a donc transformé les autres alcaloïdes du totum en conessine. Avec l'échantillon de Gampèla on observe des traînées de spots.

Des spectres d'absorption de la conessine, obtenus par spectrophotodensitométrie et par spectrophotométrie U.V., ont permis de situer la zone d'absorption de la conessine de même que son degré de pureté.

Un balayage vertical des différents spots issus des échantillons a permis de doser les différents alcaloïdes présents dans le totum par spectrophotodensitométrie.

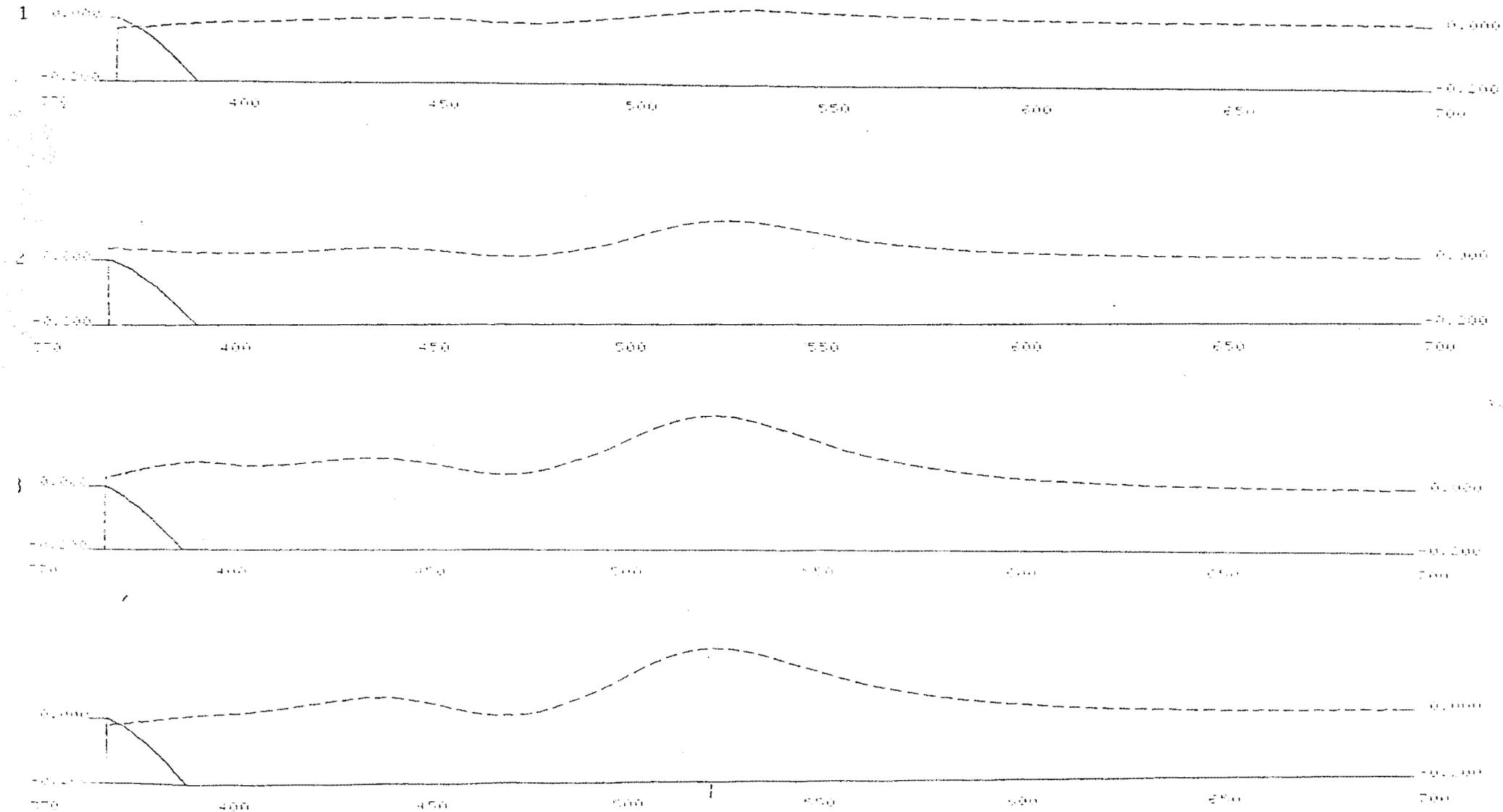
Fig. 2 : Spectre d'absorption de la conessine dans les différents échantillons ; degré de pureté

1 - Spot conessine - Station Campèla

2 - " " " Farako-Bâ

3 - Spot conessine - Station CNRST

4 - Conessine base de référence



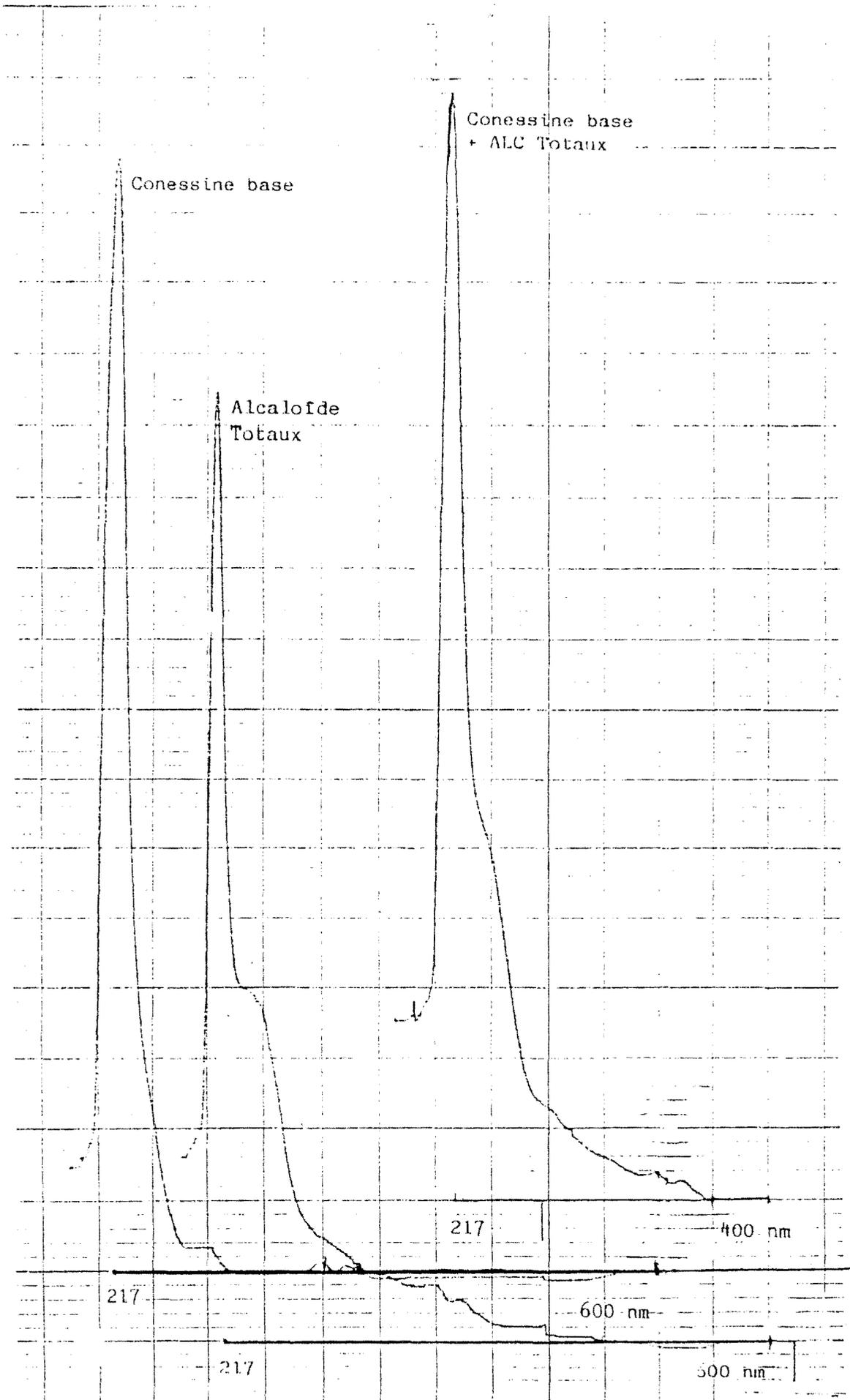


Fig. 3 Spectre d'absorption de la conessine - Spectrophotométrie U. V. - visible

Dosage spectrophotodensitométrique des alcaloïdes totaux

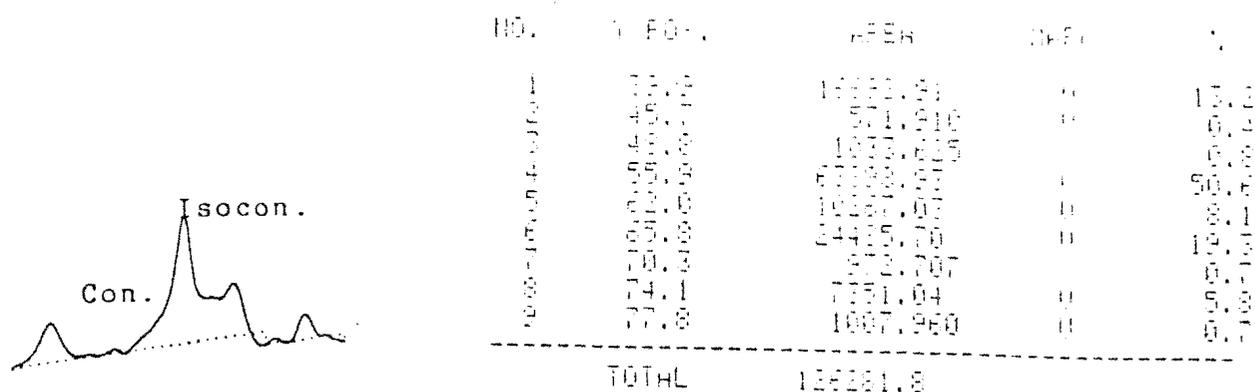


Fig.4 : Alcaloïdes totaux - Station Campéla

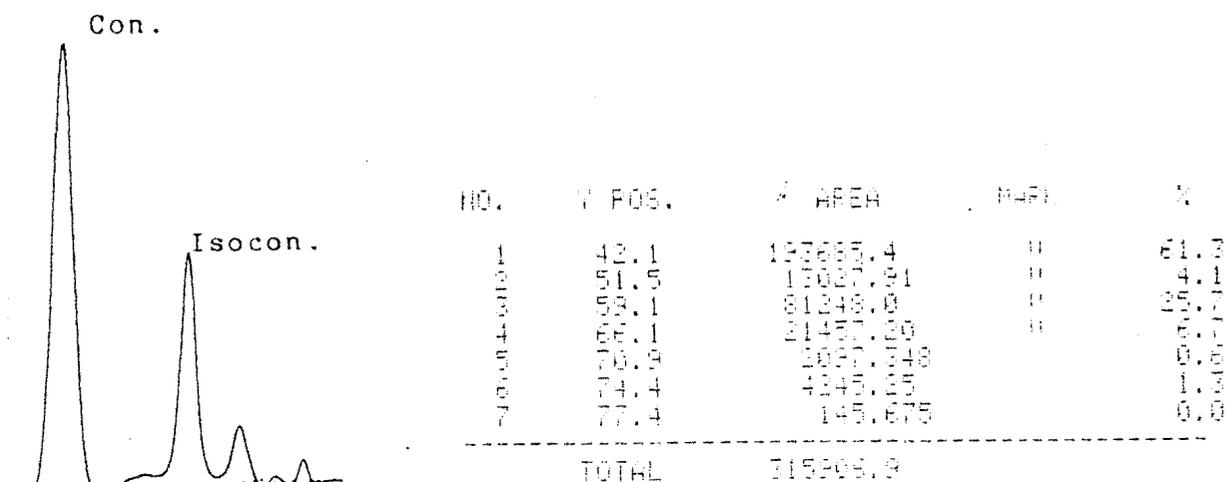


Fig.5 : Alcaloïdes totaux - Station CNRST

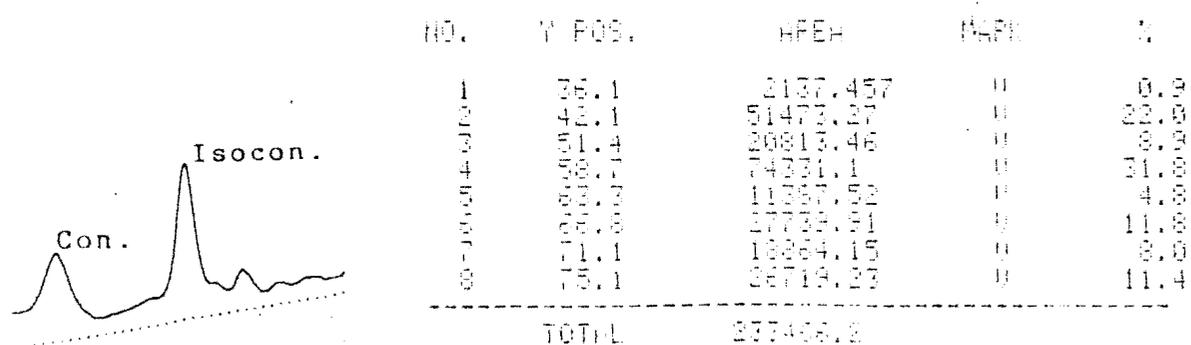


Fig.6 : Alcaloïdes totaux - Station Farako-BA

Con. = Cessine

Isocon. = Isoconessimine

Fig.2 :

- 1- Spot conessine- station de Gampèla
- 2- " " " Farako-Bâ
- 3- " " " CNRST
- 4- " conessine base de référence

Avec la conessine base de référence comme avec le totum alcaloïdique des trois stations expérimentales, on observe deux types d'absorption dont le premier se situe à environ 450 nm et le second, plus important, à 525 nm. C'est à cette longueur d'onde que se feront tous les dosages de la conessine.

fig.3 :

Avec la conessine base de référence, le pic d'absorption en spectrophotométrie U.V. visible se situe à 217 nm. Avec le totum alcaloïdique de chacune des stations on observe également un pic d'absorption à 217 nm. Avec le mélange conessine base de référence et totum alcaloïdique, on observe un seul pic également à 217 nm. La superposition de ces deux pics montre que l'absorption à 217 nm au niveau du totum est due à la conessine.

Fig. 4- 5- 6:

Ces trois figures présentent les spectres d'absorption des tota alcaloïdiques obtenus à partir d'échantillons provenant des trois stations de culture expérimentale. Elles sont obtenues à partir d'un balayage vertical des différents spots et permettent le dosage relatif des différents alcaloïdes présents dans le totum.

Les valeurs consignées à droite de ces spectres correspondent respectivement :

- aux numéros des pics
- à leur position sur la plaque
- à la valeur des signaux déterminée par une surface:area
- à leur proportion relative dans le totum alcaloïdique

Dans l'échantillon de Gampèla, le pic d'absorption de l'isoconessimine est nettement plus important que celui de la conessine et des autres alcaloïdes.

Avec l'échantillon du CNRST, le signal donné par la conessine est de loin le plus important, puis vient celui de l'isoconessimine.

Avec l'échantillon de Farako-Bâ, le signal donné par l'isoconessimine est plus important que celui de la conessine qui est lui aussi plus important que les autres signaux.

Ces différents signaux sont évalués par rapport à ceux obtenus avec la conessine base de référence.

7. Extraction et dosage des composés polyphénoliques d'écorces de tiges

- Extraction

5 g de matière sèche donnent 1,5 g de résidu brut renfermant les composés polyphénoliques dont la teneur est évaluée ci-dessous.

- Dosage complexométrique

Tableau X

(Rut.) en mcg/ml	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,80
D.O.	0,466	0,287	0,121	0,048	0,041	0,024	0,012

(Rut.) = concentration en rutoside

D.O. = densité optique Coefficient de corrélation $r = 0,993$
 A 400 nm, l'extrait E donne une D.O. = $0,016 \pm 0,001$

Concentration de la solution en composés polyphénoliques:

$$c = 1,5 \text{ mcg/ml}$$

Cette solution a été obtenue à partir de 1,5 g de résidu dissous dans 100 ml d'alcool. La quantité totale de composés polyphénoliques dans les 100 ml de solution est Q :

$$Q = 1,5 \times 100 = 1500 \text{ mcg} = 1,5 \text{ mg}$$

D'où la teneur T de l'échantillon en composés polyphénoliques est :

$$T = \frac{1,5 \times 100}{1500} = 1 \%$$

- Dosage des flavonoïdes par oxydation

+ au KMn O4

. Volume de KMn O4 (n) versé pour l'oxydation du tube témoin : $3,26 \pm 0,04 \text{ ml}$

. Volume de KMn O4 (n') versé pour l'oxydation du tube

Essai : $5,966 \pm 0,04 \text{ ml}$

$n = 3,26 \pm 0,04 \text{ ml}$

$n' = 5,96 \pm 0,04 \text{ ml}$

Indice de permanganate Ik

$Ik = 5 (n' - n)$

$Ik = 13,5 \text{ ml}$

+ Par le réactif de Folin-Denis)

Tableau XI

C.10 mg/ml	0	5,5	11	16,5	22	27,5	E
D.O.	0	0,154	0,374	0,512	0,650	0,767	0,270

Coefficient de corrélation $r = 0,98$

Lecture à 304 nm

D.O = 0,270 correspond à $9 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Pour D.O = 2,80, on aura $9 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Quantité Q de flavonoïdes dans 5 g de matière

$$Q = 9 \cdot 10^{-2} \text{ g}$$

Teneur de l'échantillon en composés poly-
phénoliques T

$$T = \frac{9 \cdot 10}{5} = 1,8 \%$$

5

B - MICROBIOLOGIE

1. Tests de cytotoxicité sur amibe pathogène Entamoeba histolytica

- Une observation de la croissance des amibes sur le milieu de Broeck a montré une croissance maximale au bout de 72h. Au delà, si le milieu n'est pas renouvelé, les amibes meurent. En effet, au bout de 72 h, le pH du milieu, initialement basique (environ 8) évolue vers un pH acide (environ 6).

- Les résultats des tests avec les amibes pathogènes dans ce milieu biphasique sont difficilement quantifiables. Les amibes ont un comportement semblable à celui observé in situ. En effet, elles ont tendance à se loger dans la phase solide constituée d'oeuf et il est impossible d'avoir une idée sur leur répartition dans ce milieu.

D'autre part, tous les milieux de culture pour amibes pathogènes que nous connaissons sont des milieux biphasiques.

Différentes concentrations du lyophilisat de décocté et des produits de référence : flagyl et 2 -déhydroémétine ont été testées et se sont avérées actives.

2. Tests de cytotoxicité sur amibes non pathogènes Amoeba proteus

a)- Avec l'émétine

Tableau XII

(Emetine) en mg/ml	Nombre d'amibes au départ	Nombre d'amibes survivantes	% d'amibes vivantes
0,1	49	49	100
0,5	50	47	94
1	51	22	43,1
2	50	20	40
2,5	51	14	27,5
5	52	4	7,7

Ces résultats montrent qu'au bout de 3h de contact, l'efficacité de l'émétine augmente avec la concentration. A 0,1mg/ml, on n'observe aucune amibe morte. A 5 mg/ml, il ne reste que 7,7% de survivants. A partir de la courbe d'étalonnage, la dose efficace 50% ou DE 50 est de 1,42 mg/ml.

b)- Effets comparés des extraits lyophilisés d'écorces de tiges et de feuilles exprimés en pourcentage de mortalité

Tableau XIII

Concentration d'extrait en mg/ml	5	7,5	10	12,5
Ecorces de tiges	22%	54%	59%	90%
Feuilles	16%	29%	34%	-

Avec les extraits totaux (lyophilisés de décocté de

feuilles et d'écorces de tiges), les concentrations inhibitrices sont relativement élevées. Avec les écorces de tiges, 5 mg de lyophilisat /ml tue 22% d'amibes tandis qu'avec les feuilles, la même concentration ne tue que 16% de la population. Avec les feuilles comme avec les écorces de tiges, l'efficacité des extraits augmente avec la concentration. A une concentration de 12,5 %, aucune lecture n'est possible avec les feuilles.

c)- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux

c1. Teneur en conessine = 23,70 %

Tableau XIV

(Alc.tot.) en mg/ml	Nb d'amibes au départ	Nb d'amibes survivantes	% d'amibes vivantes
0,5	51	51	100
1	51	38	74,5
1	58	48	82,7
2	50	24	48
3	46	15	32,5
3,5	49	11	22,5
4	47	12	25,5
5	50	11	20
5	52	10	19,2
10	48	4	8,3
15	52	1	1,9
20	50	0	0

Ce tableau montre qu'avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux d'une teneur en conessine de 23,70 %, l'efficacité est, comme avec l'émétine et les extraits totaux, fonction de la concentration. A 0,5 mg/ml, on n'observe aucune mortalité. A 20 mg/ml, on observe 100 % de mortalité.

La droite de régression obtenue à partir de ces valeurs donne une DE 50 de 2,05 mg/ml (voir tracé n°1 p.79).

Tableau XV

(Alc. tot.) en mg/ml	Nb. d'amibes au départ	Nb. d'amibes survivantes	% d'amibes vivantes
0,5	48	48	100
1	50	39	78
2	49	25	51
3	53	19	35,8
3,5	47	14	29,8
4	51	15	29,4
5	51	12	23,5
10	52	5	9,6
15	49	0	0
20	50	0	0

Obtenus exactement dans les mêmes conditions que précédemment (tableau XIV), les résultats du tableau XV permettent d'obtenir une DE 50 de 2,15 mg/ml. A partir de ces valeurs, la DE moyenne est de $2,1 \pm 0,07$ mg/ml. (Voir tracé nO2 p.80)

c2. Teneur en conessine = 20,65 %

Tableau XVI

(Alc. tot.) en mg/ml	Nb. d'amibes au départ	Nb. d'amibes survivantes	% d'amibes vivantes
1	43	36	83,7
2	50	20	60
3	49	20	40,8
4	50	15	30
5	50	10	20

La DE 50 obtenue avec totaux à une teneur en conessine de 20,65 % est de 2,44 mg/ml. Par rapport au cas précédent où la teneur en conessine était de 23,70 % la DE 50 est plus élevée. Ce qui signifie que la teneur en conessine est déterminante dans l'activité anti-amibienne.

d)- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux
méthylés - Teneur en conessine = 70 %

Tableau XVII

(Alc.tot.) en mg/ml	Nb. d'amibes au départ	Nb. d'amibes vivantes	% d'amibes vivantes
1	48	40	83,3
2,5	53	23	43,3
5	41	12	29,3

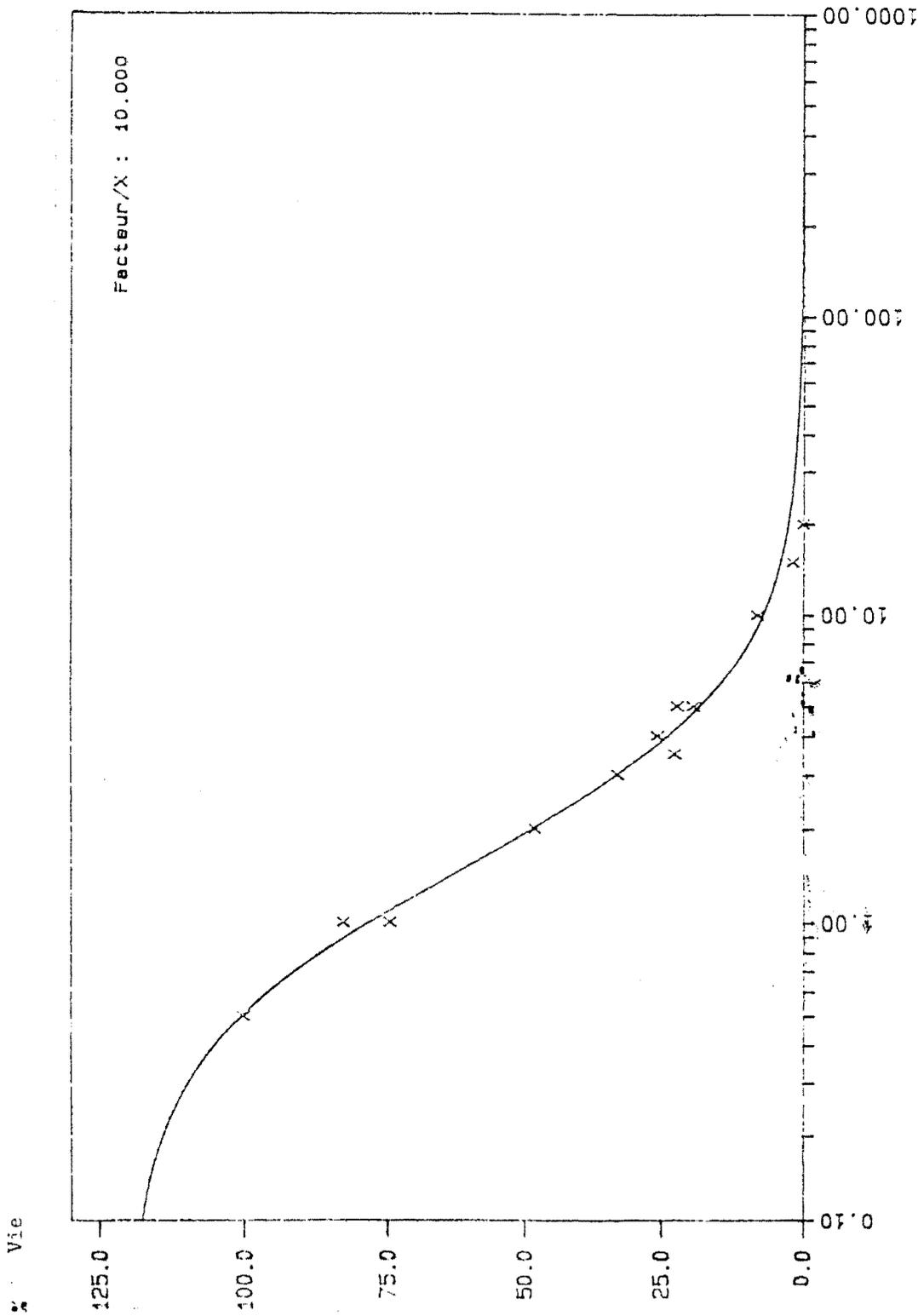
Tableau XVIII

(Alc.tot.) en mg/ml	Nb. d'amibes au départ	Nb. d'amibes survivantes	% d'amibes vivantes
1	46	43	93,5
2	53	30	56,6
2,5	50	21	42
5	49	9	18,4

A partir des résultats des tableaux XVII et XVIII la DE 50 est de $2,5 \pm 0,05$ mg/ml. La DE 50 est donc plus élevée qu'avec des teneurs plus faibles en conessine (20,65 % et 23,70 %). Ce qui signifie que l'activité anti-amibienne est plus faible à 70 % de conessine. (Voir tracé n°3 p.81).

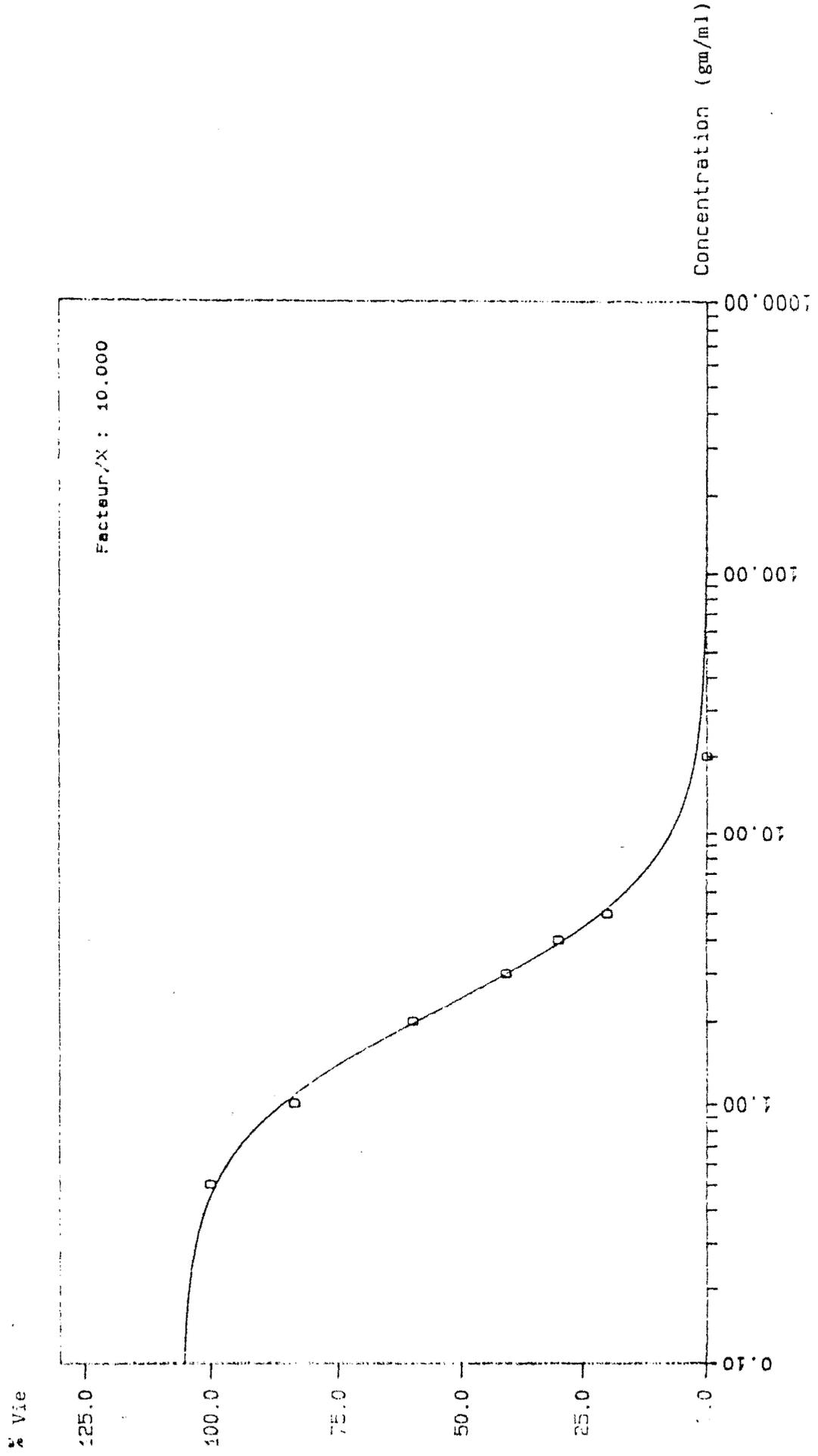
SYNTHESE : voir tracés n° 4 p.82

Ces deux tracés tenant en compte différentes concentrations d'alcaloïdes totaux non méthylés et d'alcaloïdes totaux méthylés, de teneurs différentes en conessine, sont superposables. Ce qui signifie que la différence d'activité entre alcaloïdes totaux méthylés et non méthylés n'est pas significative.

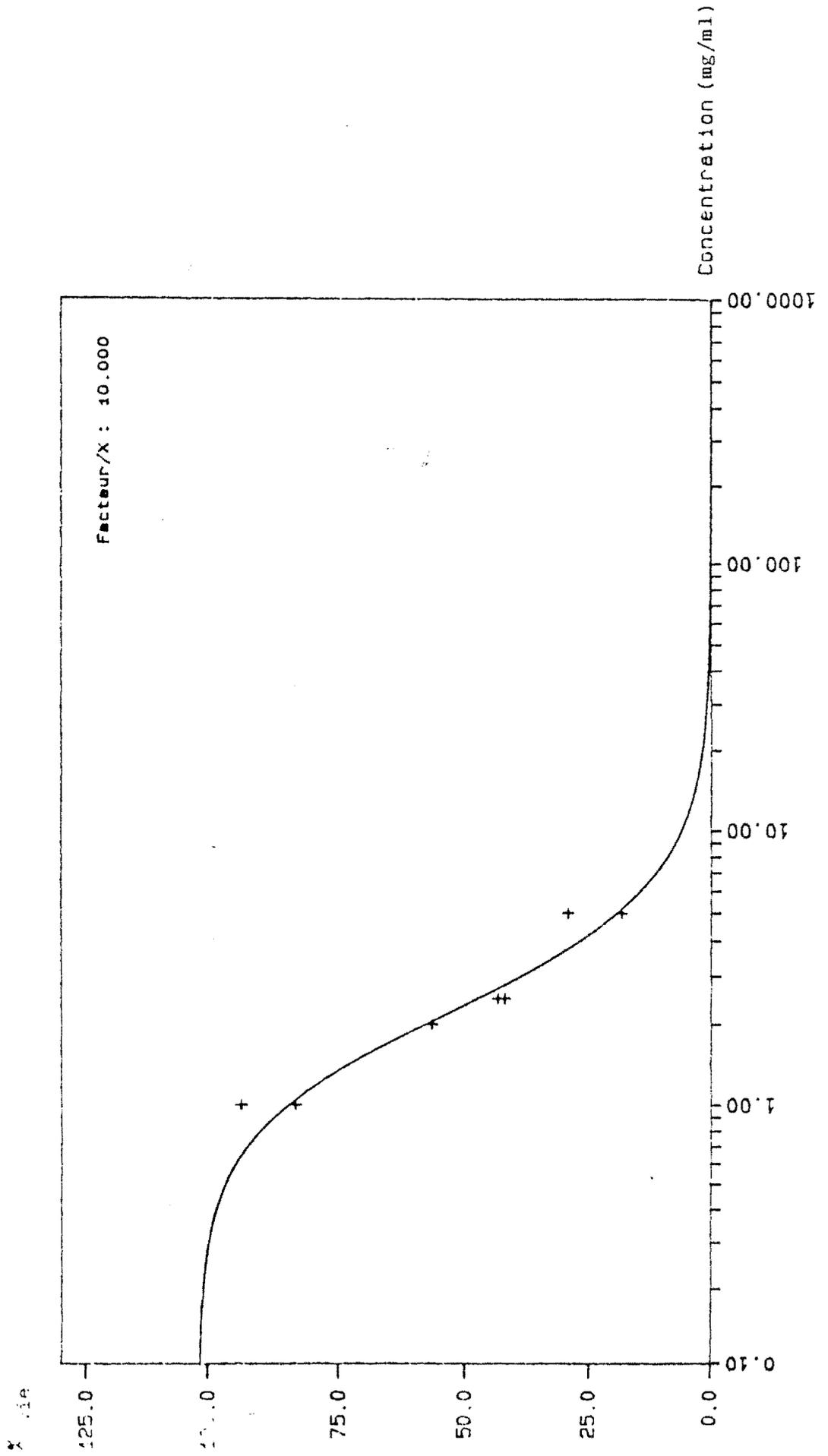


Tracé n° 1

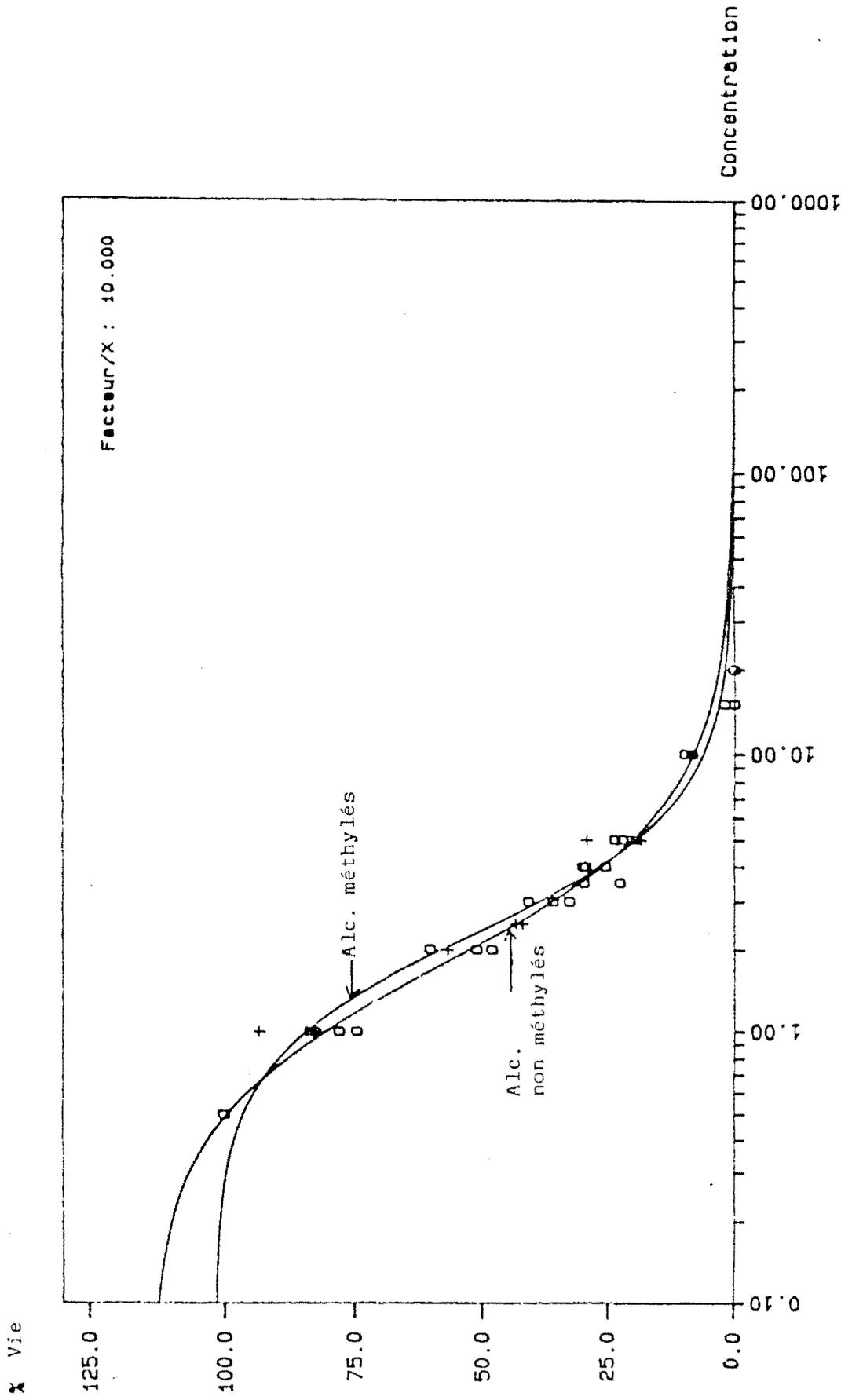
Tracé n° 2



Tracé n° 3



Tracés n° 4



3 - Criblage microbiologique sur bactéries à Gram+ et bactéries à Gram-: détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

- Teneur en alcaloïdes totaux 1 = 20,65 %
- Teneur en alcaloïdes totaux 2 = 70 %

Tableau XIX

Souches	CMI en mg/ml		CMB mg/ml		Inoc.
	1	2	1	2	
<i>Strept. faecalis</i> CNCM 5855	2,5	2,5	2,5	5	5.10 ⁴
<i>Esch. coli</i> ATCC 11229	0,625	5	1,2	5	1.10 ⁹
<i>Esch. coli</i> O ₁₁₃ B14	1,25	> 5	1,2	>5	4.10 ⁸
<i>Proteus mirabilis</i>	5	> 5	5	>5	5.10 ⁷
<i>Proteus rettgeri</i>	> 5	> 5	>5	>5	2.10 ⁹
<i>Proteus vulgaris</i> NCTC 4635	2,5	2,5	5	5	3.10 ⁸
<i>Provid. alcalifaciens</i> ..	5	> 5	>5	>5	2.10 ⁹
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 15442	5	> 5	>5	>5	2.10 ⁸
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	5	> 5	>5	>5	3.10 ⁸
<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538	0,625	5	1,2	>5	5.10 ⁷
<i>Staph. aureus</i> ATCC 13150	1,25	5	1,2	>5	7.10 ⁸
<i>Yers. enterocolitica</i>	5	> 5	5	>5	2.10 ⁸
<i>Salm.typhimurium</i>	> 5	> 5	>5	>5	2.10 ⁹

Les alcaloïdes totaux 1 d'une teneur en conessine de 20,65 % et les alcaloïdes totaux 2 de teneur en conessine 70 % ont été testés sur différentes souches de bactéries entéropathogènes (1^o colonne).

La 2^o colonne donne les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux extraits (1 et 2) pour chaque souche.

La 3^o colonne donne les concentrations minimales bactéricides (CMB) en mg/ml également pour les deux extraits et pour chaque souche.

La dernière colonne donne la densité de l'inoculum utilisé pour ces tests , déterminante dans la distribution des principes actifs.

Pour un certain nombre de souches, notamment *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, les CMI observées avec les alcaloïdes totaux sont plus faibles que celles obtenues avec les alcaloïdes totaux méthylés. Autrement dit, sur ces deux souches, le totum alcaloïdique est plus efficace que les alcaloïdes totaux méthylés.

Dans la plupart des cas, CMI = CMB, ce qui signifie que l'extrait alcaloïdique peut être considéré comme bactéricide.

4. Etudes cinétiques

A - Avec *Escherichia coli* 0119 B14

- Détermination de la CMI et de la CMB avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux A1 (teneur en conessine 23,70 %) et A2 (teneur en conessine 20,65 %)

+ avec A1, CMI = 0,625 mg/ml

CMB = 2,5 mg/ml

+ avec A2, CMI = 1,25 mg/ml

CMB = 2,5 mg/ml

avec I (inoculum) = $3,15 \cdot 10^9$ germes/ml

- Cinétique de l'activité antibactérienne de l'extrait A1

Deux séries d'études cinétiques ont été effectuées. Les colonies formées ont été dénombrées au bout de 24 H.

Les résultats de la 1^{ère} série sont consignés dans le tableau XX et ceux de la 2^{ème} série dans le tableau XXII.

Tableau XX

Temps en heures	Témoin nb. de surv./ml		E1 Nombre de surv./ml		E2 Nombre de surv./ml	
	m	\bar{m}	m1	$\bar{m}1$	m2	$\bar{m}2$
$\frac{1}{2}$	$20 \cdot 10^6$	$20,62 \cdot 10^6$ $\pm 1,38$	$43 \cdot 10^6$	$43,92 \cdot 10^6$ $\pm 1,63$	$170 \cdot 10^5$ $195 \cdot 10^5$	$182,5 \cdot 10^5$ $\pm 16,67$
	$19 \cdot 10^6$		$46 \cdot 10^6$			
	$215 \cdot 10^5$		$423 \cdot 10^5$			
	$220 \cdot 10^5$		$444 \cdot 10^5$			
2	$49 \cdot 10^6$	$41,95 \cdot 10^6$ $\pm 4,70$	$17 \cdot 10^6$	$18,5 \cdot 10^6$ $\pm 1,19$	$192 \cdot 10^5$ $171 \cdot 10^5$ $16 \cdot 10^6$ $16 \cdot 10^6$	$170,75 \cdot 10^5$ $\pm 13,06$
	$40 \cdot 10^6$		$19 \cdot 10^6$			
	$395 \cdot 10^5$		$198 \cdot 10^5$			
	$393 \cdot 10^5$		$182 \cdot 10^5$			
4 h	$9 \cdot 10^6$	$88,10^5$ $\pm 7,21$	$180 \cdot 10^5$ $202 \cdot 10^5$	$19,1 \cdot 10^6$ $\pm 1,55$	$102 \cdot 10^5$ $14 \cdot 10^6$ $17 \cdot 10^6$	$137,33 \cdot 10^5$ $\pm 34,08$
	$8 \cdot 10^6$					
	$94 \cdot 10^5$					
6h	$7 \cdot 10^6$	$62,10^5$ $\pm 5,35$	$18 \cdot 10^6$	$19,77 \cdot 10^6$ $\pm 1,28$	$37 \cdot 10^5$ $28 \cdot 10^5$ $231 \cdot 10^4$ $284 \cdot 10^4$	$29,1 \cdot 10^5$ $\pm 5,78$
	$6 \cdot 10^6$		$21 \cdot 10^6$			
	$59 \cdot 10^5$		$198 \cdot 10^5$			
	$59 \cdot 10^5$		$203 \cdot 10^5$			
8 h	$20 \cdot 10^6$	$30,10^5$ ± 14	$8 \cdot 10^6$	$91,75 \cdot 10^5$ $\pm 8,88$	$17 \cdot 10^4$ $20 \cdot 10^4$	$1,85 \cdot 10^5$ $\pm 0,21$
	$4 \cdot 10^6$		$10 \cdot 10^6$			
			$90 \cdot 10^5$			
			$97 \cdot 10^5$			
24 h	$13 \cdot 10^3$	$12,95 \cdot 10^3$ $\pm 1,65$	$503 \cdot 10^3$	$52,15 \cdot 10^4$ $\pm 2,61$	$17 \cdot 10^2$ $14 \cdot 10^2$ $141 \cdot 10^1$ $151 \cdot 10^1$	$15,05 \cdot 10^2$ $\pm 1,39$
	$14 \cdot 10^3$		$540 \cdot 10^3$			
	$142 \cdot 10^2$					
	$106 \cdot 10^2$					

Ce tableau présente dans la 1^o colonne le temps de contact entre le germe et la substance testée.

Dans la 2^o colonne, le témoin correspond à l'extrait alcaloïdique à une concentration de 1 mg/ml pour une teneur en conessine de 23,70 % .

Dans la 3^o colonne, E1 représente le mélange Alcaloïdes totaux (1 mg/ml) + Protamine sulfate (100mcg/ml)

Dans la 4^o colonne, E2 représente la protamine sulfate à 100 mcg/ml.

Pour chaque prélèvement, des dilutions ont été effectuées. Celles ayant permis des lectures fiables de colonies sont celles qui ont été retenues ici. Les trop fortes ou trop faibles dilutions ont été écartées.

m représente le nombre de colonies formées à partir de ces dilutions au bout de 24h.

\bar{m} représente la moyenne obtenue à partir de ces colonies.

Il en est de même pour m_1 et m_2 , m_1 et m_2 .

La densité de l'inoculum est de $8 \cdot 10^8$ germes /ml. Pour faciliter son exploitation ce tableau a été résumé à travers un autre faisant appel au logarithme décimal.

Tableau XXI

Temps en heures	T(Alc. tot.) 1 mg/ml		E2 Alc. + Prot.		E1(Protamine) 100 mcg/ml	
	logm	$\sqrt{\log}$	logm1	$\sqrt{\log}$	logm2	$\sqrt{\log}$
1/2	7,31	0,19	7,64	-0,14	7,26	0,24
2	7,62	-0,12	7,23	0,23	7,20	0,27
4	6,94	0,56	7,13	0,37	7,14	0,36
6	6,93	0,57	7,30	0,2	6,46	1,04
8	6,48	1,02	7,56	-0,06	5,27	2,23

$\sqrt{\log}$ = diminution logarithmique.

Pour tous les trois tubes renfermant respectivement Alcaloïdes totaux(alc. tot.), Protamine + alcaloïdes totaux Protamine, la densité de l'inoculum au temps t_0 est de $3,2 \cdot 10^7$ germes/ml.

$$\log 3,2 \cdot 10^7 = 7,50$$

Les études cinétiques ont consisté à étudier l'évolution de la densité de cette population bactérienne au cours du temps et en fonction des différentes substances testées à des concentrations bien définies.

Avec les alcaloïdes totaux, le logarithme de la densité bactérienne passe de 7,50 au temps t_0 à 7,31 au bout de 1/2h. Au bout de 2h, cette densité augmente pour décroître à partir de la 4^e heure jusqu'à la 8^e heure.

Avec le mélange Protamine + Alcaloïdes totaux, la densité de la population bactérienne augmente au bout de 1/2h. Elle décroît ensuite jusqu'au bout de 4h de contact. Puis vers la 6^e heure on note une croissance jusqu'à la 8^e heure.

Avec la protamine, la diminution de la densité bactérienne est nette du début jusqu'au bout de 8h de contact.

Ainsi, il apparaît qu'au bout de 8h de contact, la diminution logarithmique avec le témoin (alc. tot.) est plus faible (1,02) qu'avec la protamine sulfate (2,23). Par contre, avec le mélange (alc.tot. + protamine) on observe une diminution logarithmique négative, donc une augmentation de la densité bactérienne.

- 2^e série

Tableau XXII

Temps en heures	Témoin		Essai	
	nb. survivants/ml		nb. de surv./ml	
	n	n	nl	nl
0	36.10 ⁶	3,42.10 ⁷ ± 0,27	6.10 ⁶	6,4.10 ⁶ ± 1,01
	37.10 ⁶		5.10 ⁶	
	315.10 ⁵		74.10 ⁵	
	322.10 ⁵		72.10 ⁵	
1/2	10.10 ⁶	8,2.10 ⁶ ± 1,27	25.10 ⁶	2,7.10 ⁶ ± 0,35
	7.10 ⁶		30.10 ⁶	
	78.10 ⁵			
	80.10 ⁵			
2	16.10 ⁴	1,77.10 ⁵ ± 0,14	6.10 ⁵	6,5.10 ⁴ ± 0,70
	18.10 ⁴		70.10 ⁴	
4	35.10 ³	3,33.10 ⁴ ± 0,56	11.10 ⁴	1,43.10 ⁵ ± 0,30
	38.10 ³		15.10 ⁴	
	270.10 ²		170.10 ³	
6	50.10 ²	4,61.10 ³ ± 0,34	25.10 ³	2,85.10 ⁴ ± 0,5
	45.10 ²		32.10 ³	
	435.10 ¹			
8	9.10 ²	8,2.10 ² ± 1,2	53.10 ²	5,9.10 ³ ± 0,84
	73.10 ²		65.10 ²	

Ce deuxième tableau présentant des résultats d'études cinétiques a été obtenu dans les mêmes conditions que le précédent.

La 1^{ère} colonne correspond au temps de contact entre le germe et la substance testée.

Dans la 2^{ème} colonne, le témoin correspond à des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de concentration 4 mg/ml pour une teneur en conessine de 23,70% .

Dans la 3^{ème} colonne, l'essai correspond au mélange Alcaloïdes totaux (4 mg/ml) + Protamine sulfate (16 mg/ml).

La différence essentielle avec les études cinétiques précédentes est que la protamine sulfate a été utilisée à une concentration subinhibitrice dans la deuxième série.

La densité de l'inoculum utilisé est de $1 \cdot 10^9$ germes/ml

Ce tableau, pour faciliter son exploitation a été résumé à travers le tableau n°XXIII.

Tableau XXIII

Temps en heures	Témoin		Essai	
	log n	\backslash log n	log n1	\backslash log n1
0	6,81	0,79	7,53	0,07
1/2	6,74	0,86	6,91	0,69
2	5,85	1,75	5,23	2,37
4	5,16	2,44	4,52	3,08
6	44,45	3,15	3,66	3,94
8	3,77	3,83	2,91	4,69

\backslash log = diminution logarithmique

Pour tous les deux tubes réactionnels à savoir celui renfermant les alcaloïdes totaux (Témoin: 4mg/ml) et celui renfermant le mélange (alcaloïdes totaux + protamine) la densité de la population bactérienne au temps t_0 est de $4 \cdot 10^7$

$$\log 4 \cdot 10^7 = 7,60$$

Ce nombre a évolué au cours du temps dans les deux tubes. Dans le tube témoin renfermant les alcaloïdes totaux, la diminution logarithmique de cette densité est de 3,83 au bout de 8h de contact. Avec le tube essai (alc. tot. + prot.), cette diminution est plus considérable. Elle est de 4,69 au bout du même temps. La différence entre les deux diminutions logarithmiques est inférieure à 1 unité et peut être considérée comme négligeable.

5. Activités inhibitrices comparées des extraits alcaloïdiques des écorces de tiges des trois stations expérimentales et d'autres extraits sur Escherichia coli 0127 B8

b1 - Antibiogramme

Effectué sur du Mueller Hinton, l'antibiogramme donne les résultats suivants en ce qui concerne la souche :

1) Résistant à :

Tétracycline
Ampicilline
Lactrim
Pénicilline
Bacitracine

2) Sensible à :

Néomycine : Diamètre d'inhibition : 20 ± 1 mm
Colistine : " : $16,66 \pm 0,57$ mm
Gentalline " " : 22 ± 1 mm

b2 - Détermination de la CMI et de la CMB avec les extraits alcaloïdiques des 3 stations expérimentales

Tableau XXIV

Station Expérimentale	Teneur en conessine (%)	CMI en mg/ml	CMB en mg/ml
Farako-bâ	17,25	1,25	1,25
CNRST	33,5	1,25	1,25
Gampèla	3,28	0,625	0,625

Avec les extraits alcaloïdiques des stations expérimentales de Farako-Bâ et du CNRST, la concentration minimale inhibitrice est la même : 1,25 mg/ml. Avec ceux de Gampèla, la CMI est de 0,625mg/ml.

Dans tous les trois cas, CMI = CMB. Ces extraits peuvent donc être considérés comme bactéricides.

La différence d'activité entre ces extraits alcaloïdiques est négligeable malgré des teneurs très différentes en conessine.

b3 - Activités inhibitrices avec d'autres extraits

Tableau XXV

Extraits	CMI en mg/ml	CMB en mg/ml
alcaloïdes totaux de feuilles	0,625	0,625
décocté de feuilles	15	15
décocté d'écorces de tiges	25	25

Ce tableau présente des résultats de tests d'inhibition effectués avec différents organes de la plante (feuilles et écorces de tiges) et différents extraits (chlorhydrates d'alcaloïdes totaux et décoctés).

Ainsi, au niveau des feuilles, les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux sont nettement plus efficaces que le décocté (CMI = 0,625 mg/ml contre 15 mg/ml avec le décocté).

Au niveau des écorces de tiges, il est de même; 1,25 mg/ml contre 25 mg/ml pour le décocté (voir tableau XXIV).

De ces expériences, il ressort que les extraits alcaloïdiques des feuilles et d'écorces de tiges sont nettement plus efficaces que les décoctés correspondants. Les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des feuilles sont plus efficaces que ceux des écorces de tiges.

C - TOXICO-PHARMACOLOGIE

1. Détermination de la dose létale 50 % (DL 50)

- Avec le lyophilisat de décocté d'écorces de tiges (Station de Farako-Bâ)

Tableau XXVI

Souris	Poids en g	Dose administrée en mg/kg	% Morts	
			< 24h	> 24h
lot 1	36,6 ± 3,43	500	0	0
lot 2	37,5 ± 1,06	750	20	20
lot 3	40,2 ± 1,15	1000	60	60
lot 4	36,2 ± 2,65	1500	80	80

Ce tableau XXVI présente les résultats de tests de cytotoxicité effectués sur 4 lots de souris. Chaque lot est constitué de 5 souris dont le poids moyen est déterminé de même que l'écart-type.

Ainsi, pour chaque lot de souris, il est précisé le poids moyen, l'écart-type et la dose administrée en mg par kg de poids corporel. Des tests préliminaires ciblent la zone de toxicité. Les doses administrées vont de 500 mg/kg pour le lot 1 à 1500 mg/kg pour le lot 4. Le taux de mortalité est déterminé au bout de 24h et de 24h à 72h. Il s'agit là d'une étude de la cytotoxicité aigüe.

Le taux de mortalité va de 0% à une dose de 500mg/kg à un taux de 80% à la dose de 1500mg/kg.

La DL 50 (ou dose létale 50%) obtenue à partir du tracé est de 950 mg/kg.

Pour la détermination de l'index thérapeutique ou marge d'utilisation, nous avons déterminé la DL10 et la DL 90.

DL 10 = 675 mg/kg

DL 90 = 1300 mg/kg

Soit un différentiel correspondant à l'index thérapeutique de 625 mg/kg

- Avec le lyophilisat de décocté de feuilles

Tableau XXVII

Souris	Poids en g	Dose administrée en mg/kg	% Morts	
			< 24h	> 24h
lot 1	33,5 ± 1,08	750	25	25
lot 2	36,25 ± 5,31	1000	50	50
lot 3	34,25 ± 1,25	1250	75	75
lot 4	34,25 ± 1,04	1400	75	75

Pour ces tests, chaque lot est constitué de 4 souris. Les doses administrées vont de 750 mg/kg à 1400 mg/kg. Le pourcentage de morts va de 25% pour le lot 1 à 75% pour le lot 4.

La DL 50 obtenue à partir du tracé est de 1000 mg/kg

DL 10 = 600 mg/kg

DL 90 = 1700 mg/kg

L'index thérapeutique est de 1100 mg/kg.

- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges (Station Farako-Bâ)

Tableau XXVIII

Souris	Poids en g	Dose administrée en mg/kg	% Morts	
			< 24h	> 24h
lot 1	27,50 ± 2,51	20	0	0
lot 2	29,5 ± 1,91	50	50	50
lot 3	31 ± 4,96	75	100	100

Les tests ont été effectués sur 3 lots de souris. Chaque lot est constitué de 4 souris. Les doses administrées vont de 20 à 75 mg/kg et les taux de mortalité de 0 à 100% .

DL 50 = 48,33 mg/kg

DL 10 = 30 mg/kg

DL 90 = 37,5 mg/kg

L'index thérapeutique est de 37,5 mg/kg

**- Avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux
de feuilles**

Tableau XXIX

Souris	Poids en g	Dose administrée en mg/kg	% Morts	
			< 24h	> 24h
lot 1	31,75 ± 2,21	50	0	0
lot 2	30,25 ± 0,64	75	75	75
lot 3	35,25 ± 2,06	100	100	100

Là également, les tests ont été effectués sur 3 lots de souris, avec chaque lot constitué de 4 souris. Les doses administrées vont de 50 à 100 mg/kg et les taux de mortalité de 0 à 100% .

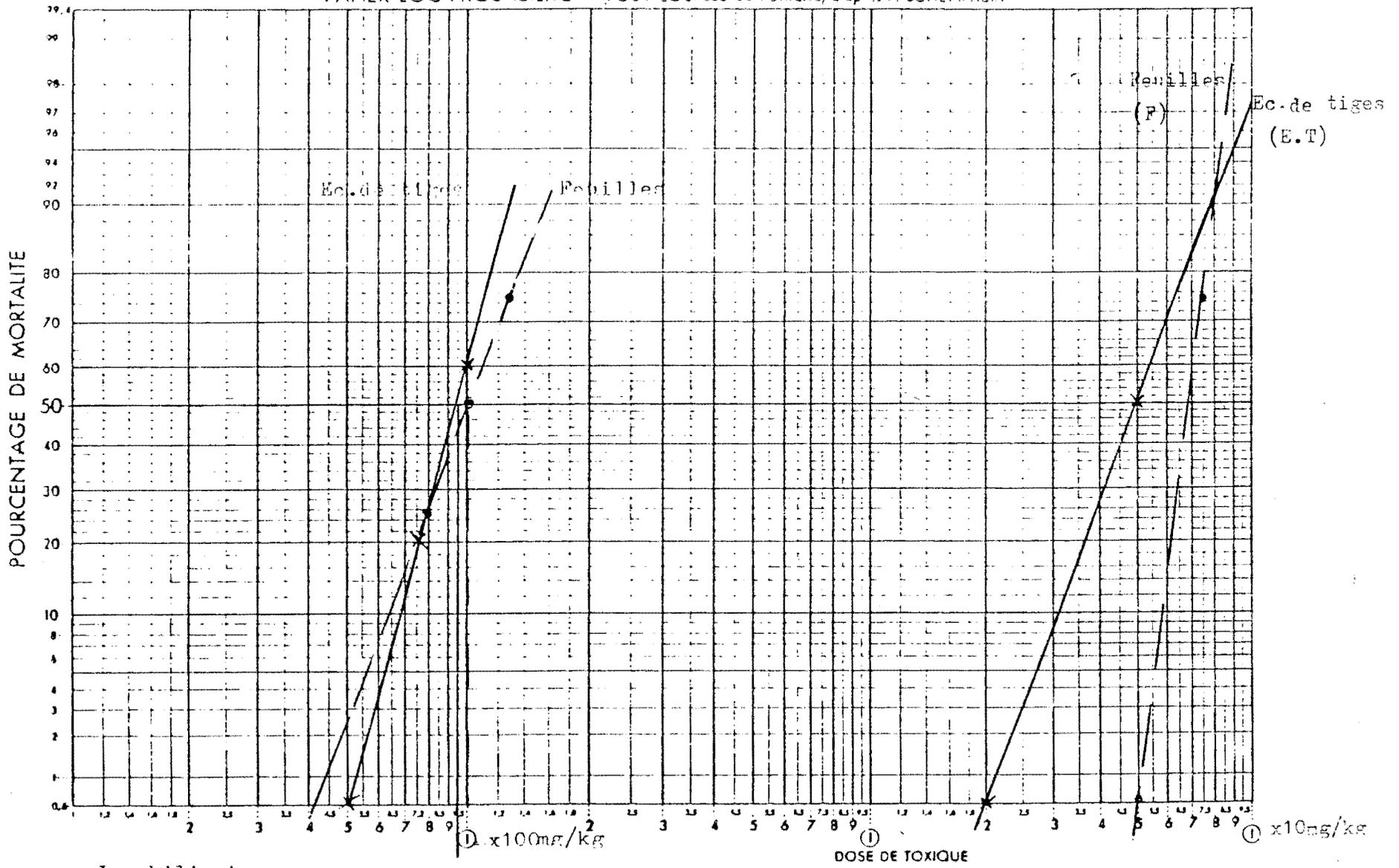
La DL 50 = 65,55 mg/kg

DL 10 = 55,5 mg/kg

DL 90 = 80 mg/kg

L'index thérapeutique est de 24,5 mg/kg

PAPIER LOG PROBABILITÉ POUR COURSES DE TOXICITÉ d'après P. BONET MAURY



Lyophilisat
de
décocté

DL 50 Ec. de tiges = 950 mg/kg
DL 50 Feuilles = 1000 mg/kg

Chlorhydrates

DL 50 F. = 65,55 mg/kg
DL 50 E.T. = 48,33 mg/kg

TABLEAU DE SYNTHÈSE

Tableau XXX

Extraits	DL 50 en mg/kg	Index Thérapeutique
- décocté de feuilles	1000	1100
- décocté d'écorces de tiges	950	625
- chlorh. d'alc. tot. d'écorces de tiges	48,33	37,5
- chlorh. d'alc. tot. de feuilles	65,55	24,5

Ce tableau donne les DL 50 de tous les extraits et organes testés de même que leur index thérapeutique (ou marge d'utilisation). Les décoctés de feuilles et d'écorces de tiges donnent des DL 50 nettement plus élevées que celles obtenues avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux correspondants. Seul le décocté de feuilles présente un index thérapeutique relativement élevé.

L'échelle de toxicité classe les décoctés de feuilles et d'écorces de tiges parmi les substances moyennement toxiques et les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges et des feuilles parmi les substances très toxiques. De plus, ces alcaloïdes présentent une marge d'utilisation très étroite.

Notons en outre que l'administration de ces extraits alcaloïdiques aux souris entraîne des difficultés de motricité, de respiration. La mort survient de façon brutale ; dans les 5 à 10 minutes suivant l'administration.

2 - Tests sur intestin isolé

- Avec le lyophilisat de feuilles

Amplitude de contraction Enregistremets	Tonus de base	Acétylcholine (ACH)	Extrait (E)	E + ACH	% inhibition
1	1,2 ± 0,44	22 ± 5,03	1 ± 0	20,8 ± 1,64	5 ± 0,67
2	2,5 ± 1	30,1 ± 1,66	2 ± 0	23,5 ± 0,70	21 ± 0,57
3	1,66 ± 0,28	12,25 ± 1,5	2 ± 0	9 ± 0	26 ± 1

Voir enregistrements.

- Avec le lyophilisat d'écorces de tiges

Amplitude de contraction en mm Enregistremets	Tonus de base	Acétylcholine (ACH)	Extrait (E)	E + ACH	% inhibition
1	2 ± 0	16,23 ± 1,42	1,25 ± 0,5	13, ± 1,7	19
2	1,16 ± 0,28	22,3 ± 5,03	1 ± 0	13 ± 0	41
3	1,65 ± 0,7	16 ± 0,70	3,33 ± 0,57	14 ± 1,41	12,5
4	2,63 ± 0,45	4,63 ± 1,68	4,12 ± 1,18	2,5 ± 1	46
5	1,16 ± 0,28	21,1 ± 2,37	1,5 ± 0	12,66 ± 0,57	40
6	1,64 ± 0,55	25,41 ± 4,98	1,21 ± 0,26	15,71 ± 5,35	32

Ces tableaux présentent les résultats de tests effectués sur des fragments d'intestins de rats, fragments de 2 cm environ prélevés dans le duodénum.

Avec les feuilles, des séries d'enregistrements ont été effectuées de même qu'avec les écorces de tiges (Voir fig.7 p.99 et fig.8 p.100).

Pour chaque expérience, on enregistre d'abord le tonus de base que présente tout fragment d'intestin maintenu en survie dans une solution physiologique.

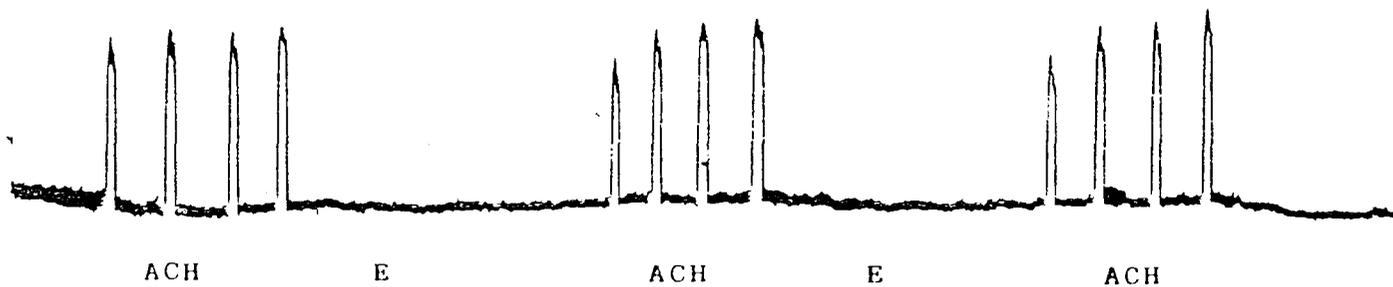
- l'amplitude de contraction sous l'effet de l'acétylcholine (ACH) neuromédiateur
- l'amplitude de contraction sous l'effet de l'extrait
- l'amplitude de contraction résultant de l'interaction Extrait - Acétylcholine (E + ACH)

De ces différents résultats, on détermine le pourcentage d'inhibition selon la formule :

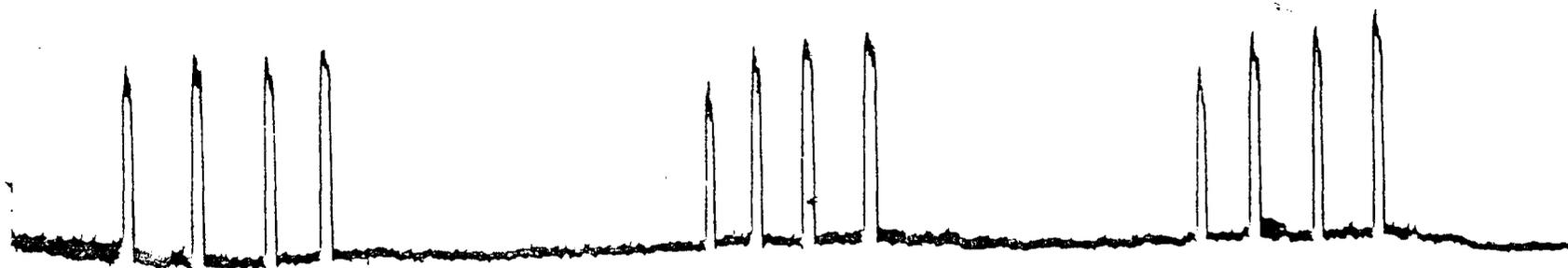
$$\% \text{ inhibition} = E \times 100 / (E + \text{ACH}).$$

Le tonus de base correspond à une amplitude relativement faible. Sous l'effet de l'ACH, cette amplitude augmente considérablement. Avec l'extrait, l'amplitude de contraction est faible. L'interaction extrait - acétylcholine donne une amplitude plus faible que celle obtenue avec l'ACH.

Ainsi, aussi bien avec les écorces de tiges qu'avec les feuilles, le pourcentage d'inhibition n'est pas négligeable. Les plus forts pourcentages d'inhibition ont été obtenus avec les écorces de tiges.

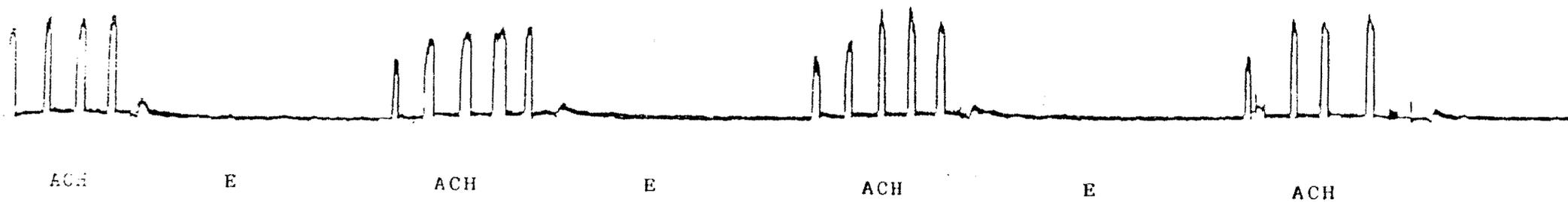


a: - Lyophilisat de décocté de feuilles (E)
 0,2ml à 2mg/ml
 - Acétylcholine (ACH) = 0,1ml à 10^{-1} mg/ml



b: E = 0,1ml à 2mg/ml
 ACH = 0,2ml à 10^{-1} mg/ml

Fig.7 : Tests sur intestin isolé de rat



- Lyophilisat de décocté d'écorces de tiges (E) 0,1ml à 5mg/ml
- Acétylcholine (ACH) 0,1ml à 10^{-1} mg/ml

Fig. 8 : Tests sur intestin isolé de rat



- Lyophilisat de décocté d'écorces de tiges (E) = 0,2ml à 2mg/ml
- Acétylcholine (ACH) = 0,2ml à 10^{-1} mg/ml

4è PARTIE : DISCUSSIONS

A - CHIMIE

1. Extraction des principes chimiques (actifs) et dosage des composés polyphénoliques

- Extraction et identification

Des réactions appropriées ont permis de mettre en évidence la richesse de la drogue en principes chimiques divers : alcaloïdes, dérivés stéroïques, flavonoïdes, anthracénosides, tanins, etc. à partir de solvants de polarité croissante (chloroforme, éthanol, eau).

La plupart de ces principes actifs sont présents dans le décocté : alcaloïdes, tanins, dérivés osidiques (anthracénosides, saponosides, etc). Ce qui justifie utilisation de la plante dans le traitement d'un ensemble de pathologies gastro-intestinales, sous la forme de décocté.

La forme de conservation du décocté, véritable bouillon, est le lyophilisat qui, avec les écorces de tiges, comme avec les feuilles, correspond environ aux 20 % de la matière première.

- Dosages quantitatifs

Dans le cadre de la standardisation chimique ultérieure pour la formulation galénique à base d'extraits de *Holarrhena floribunda* il a été mis à profit la spectrophotocomplexiométrie de dosage des dérivés polyphénoliques présents dans la plante.

L'oxydation des composés polyphénoliques par KMnO_4 et par le réactif de Folin-Denis, intéressant du point de vue analytique a été effectuée. L'indice KMnO_4 constitue un paramètre chimique qui peut donner des signes alarmants d'altération d'une préparation pharmaceutique au cours de sa conservation.

La présence de sucres réducteurs et d'hétérosides divers (stéroliques, saponosiques...) implique l'évaluation de ces composés, notamment les sucres réducteurs libres, susceptibles d'entraîner une fermentation en milieu liquide si l'on utilise l'eau comme solvant d'extraction des principes chimiques.

2. Extraction des alcaloïdes totaux des écorces de tiges et des feuilles et leur dosage

Les études chimiques antérieures entreprises par différentes équipes de chercheurs, notamment par Goutarel et coll. ont surtout porté sur les alcaloïdes (nature, isolement, identification).

Ces études antérieures qui en fait n'ont porté essentiellement que sur le Séoulou (*Holarrhena floribunda* en provenance du Sénégal) concluaient que la conessine constitue l'alcaloïde majeur des écorces de racines de *H. floribunda* (environ 50 % du totum alcaloïdique).

De nos travaux, il ressort que si la conessine constitue effectivement l'alcaloïde majeur dans certains cas, comme c'est le cas avec l'échantillon du CNRST, dans d'autres cela est loin d'être vérifié. En effet, avec les échantillons issus de la station de Gampèla, la teneur en conessine est très faible, nettement plus faible que celle en isoconessimine et en conessimine dans les mêmes échantillons. De même dans l'échantillon de Farako-Bâ, la teneur en isoconessimine est plus importante que celle en conessine.

De plus, le dosage global de ces alcaloïdes montre que selon la provenance (station expérimentale) les échantillons présentent des teneurs différentes en alcaloïdes. Avec l'échantillon de Farako-Bâ, cette teneur est de 2,86 % contre 1,86 % avec l'échantillon du CNRST et 1,04 % pour l'échantillon de

Gampèla. De ses analyses chimiques effectuées en 1950, Melle Schmit établissait que les écorces de racines de cette plante renferment 2,50 à 3,08 % d'alcaloïdes totaux tandis que les écorces de tiges en renferment 1,20 à 2,44 % . Elle concluait également que la différence essentielle entre *Holarrhena floribunda* et *Holarrhena antidysenterica* se situe au niveau de la teneur en conessine. La conessine représente suivant les échantillons 30 à 67 % des alcaloïdes totaux, le taux étant généralement supérieur à 50 % alors que dans *H. antidysenterica*, la teneur en conessine est seulement de 20 à 30 % (SCHMIT, 1950). Très visiblement, ces résultats ne tenaient compte ni du diamètre des rameaux sur lesquels les écorces ont été prélevées ni des facteurs écologiques (climatique et édaphique), ces facteurs qui sont d'une importance capitale dans les synthèses végétales. En effet, les sols renferment des précurseurs qui varient d'un point à l'autre. La synthèse des principes chimiques actifs par les plantes est tributaire de ces précurseurs. Un sol riche en éléments azotés favorisera la synthèse de substances azotées aussi bien qualitativement que quantitativement. Ces résultats des travaux antérieurs ne se justifient que dans un contexte bien précis. De plus, il amènent à pencher du côté de Chevalier qui, après analyse concluait que le genre *Holarrhena* ne regroupe qu'une seule espèce, *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz, qui subirait des variations selon les microclimats. Cela, d'autant plus que dans notre cas nous sommes partis de pieds de *Holarrhena floribunda* de même origine (site naturel de Dindéresso) placés dans des conditions écologiques différentes (Stations de Gampèla, de Farako-Bâ et du CNRST).

Par méthylation, il a été possible d'enrichir les extraits totaux alcaloïdiques en conessine conformément à la technique préconisée par Schmit en 1950. La différence essentielle entre la conessine et les autres alcaloïdes se situe effectivement au niveau des radicaux méthylés (-CH₃) rattachés au noyau stéroïdique. L'isoconessimine et la conessimine diffèrent de la conessine par un radical méthyle (-CH₃) de moins que la conessine.

Après méthylation, les spots de ces deux alcaloïdes disparaissent en CCM (chromatographie sur couche mince) entraînant ainsi une augmentation de la densité du spot de la conessine. L'activité antimicrobienne des extraits méthylés et non méthylés a été testée sur différentes souches entéropathogènes.

Les spectres de différence enregistrés en spectrophotodensitométrie et les spectres U.V. ont montré que la conessine base présente deux pics d'absorption dont le premier se situe à 450 nm et le second à 520 nm. La chromatographie bidimensionnelle n'arrive pas à dédoubler ces spots. Avec la conessine base de référence vendue au commerce, d'un degré de pureté de 97 % on observe également le même phénomène. Les spectres U.V. visibles obtenus par spectrophotométrie avec les alcaloïdes totaux, la conessine base puis le mélange alcaloïdes totaux + conessine base donnent un seul pic d'absorption se situant à 217 nm. Il s'agit donc d'un seul composé (la conessine) absorbant à deux longueurs d'onde différentes.

B - MICROBIOLOGIE

Les tests de cytotoxicité effectués sur amibes pathogènes montrent que les lyophilisats de décocté d'écorces de tiggés de même que les produits de synthèse : Flagyl, 2-Déhydroémétine sont efficaces sur *Entamoeba histolytica* (amibe pathogène). Mais, ces germes étant anaérobiques, leur comportement en milieu biphasique ne facilite pas la quantification de l'efficacité des extraits. Les dénombrements sont plus aisés en milieu liquide, mode de culture utilisé dans les laboratoires spécialisés.

Des tests de cytotoxicité ont été effectués sur amibes non pathogènes, *Amoeba proteus*, avec l'émétine et des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de teneurs en conessine différentes, différentes du fait des diamètres des rameaux sur lesquels ont été effectués les prélèvements des échantillons et différentes du fait de la provenance (site de culture).

Avec l'émétine, la DE 50 est plus faible (1,42 mg/ml) qu'avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux (2,1 mg/ml et 2,44 mg/ml respectivement pour 23,70 % et 20,65 % de conessine) de même qu'avec les alcaloïdes totaux méthylés (2,5 mg/ml).

L'émétine, produit de synthèse, est donc plus efficace que les tota alcaloïdiques testés.

Il n'y a pas de différence significative au niveau de l'activité anti-amibienne entre les alcaloïdes totaux bruts extraits des écorces de tiges et ceux méthylés.

Sans pouvoir préciser le mode d'action ni le mécanisme d'action, au vu des résultats obtenus avec l'extrait enrichi en conessine nous pouvons supposer qu'à partir d'une certaine teneur en conessine, il y aurait saturation des sites récepteurs par la molécule active de sorte qu'un apport supplémentaire en conessine n'a aucun effet et pire, entraînerait une certaine inhibition ; mais cette différence d'activité peut être considérée comme non significative sur ces amibes non pathogènes.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux et d'alcaloïdes totaux méthylés (enrichis en conessine) ont été déterminées sur des bactéries entéropathogènes à Gram+ et à Gram-. Les CMI et les CMB obtenues avec les alcaloïdes totaux et les alcaloïdes totaux méthylés diffèrent pour la même souche et pour toutes les souches. Les expériences ayant été effectuées dans les mêmes conditions, les variations sont essentiellement dues aux souches elle-mêmes et à la densité de l'inoculum mis en contact avec les extraits.

La variabilité des CMI est plus importante entre laboratoires qu'au sein du même laboratoire. L'ordre de grandeur des limites de confiance des CMI se situe en général entre 1 et 4 et souvent entre 1 et 8 (COURVALIN, 1985). Ce qui nous permet de

dire que la différence d'efficacité entre alcaloïdes totaux et alcaloïdes totaux méthylés n'est pas significative avec les bactéries également. Donc l'enrichissement en conessine par méthylation n'est pas nécessaire.

Les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des feuilles semblent presque aussi actifs que les alcaloïdes totaux d'écorces de tiges tandis qu'avec les décoctés (de feuilles et d'écorces de tiges) les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont relativement élevées.

Avec les *Proteus* et *Providencia* qui font partie de la flore commensale du tube digestif de l'homme, ces valeurs sont relativement élevées ; ce qui signifie qu'une entérobactérie pathogène plus sensible à l'extrait (c'est-à-dire présentant une CMI plus faible) peut être combattue sans nuire à cette autre partie de la flore intestinale bénéfique.

La sensibilité des staphylocoques (*St. aureus* ATCC 6538 et *St. aureus* ATCC 13150) laisse supposer que ces extraits, utilisés en dermatologie, pourraient remédier aux maladies dermiques dont *Staphylococcus aureus* serait à l'origine.

Les tests de cytotoxicité effectués sur *E. coli* O₁₁₉B₁₄ montrent que la teneur en conessine est déterminante dans l'activité antimicrobienne.

Des études cinétiques ont été effectuées avec des chlorhydrates d'alcaloïdes totaux de teneur en conessine différentes.

Les résultats de la première série d'études cinétiques nous permettent de dire que les alcaloïdes totaux, à une concentration de 1mg/ml s'avèrent efficaces sur *E. coli* O₁₁₉B₁₄. La protamine, à elle seule, dont la concentration fut arbitrairement choisie au départ a un effet largement inhibiteur. L'association

protamine-alcaloïdes totaux donne un mélange moins efficace. Dans cette situation, nous pouvons émettre de hypothèses : soit il existe une interaction entre la protamine et les alcaloïdes totaux rendant l'un et l'autre moins actif ; soit il existerait une compétition au niveau des sites récepteurs de ces molécules actives de sorte qu'un déséquilibre entraînerait une diminution de l'action recherchée.

Les résultats obtenus à partir de la deuxième étude cinétique montrent qu'à une concentration sub-inhibitrice, la protamine associée aux alcaloïdes totaux présente une activité inhibitrice un peu plus importante que les alcaloïdes totaux seuls. Donc, à cette concentration de la protamine, même s'il y a eu augmentation de la perméabilité membranaire (ce qui n'a pas été prouvé) cela n'augmente pas de façon significative l'efficacité de l'extrait. Cette association n'est donc pas utile surtout que la protamine sulfate, à une dose relativement élevée, est nocive pour le coeur.

L'antibiogramme effectué sur la souche *Escherichia coli* O₁₂₇F₁ montre que cette souche est résistante à certains antibiotiques tels que la Tétracycline, l'Ampicilline, le Bactrim, la Pénicilline, la Bacitracine. Par contre elle est sensible à la Néomycine, la Colistine et la Gentalline. C'est donc une souche normale qui n'a pas été au préalable soumise à des antibiotiques, ce qui justifie son utilisation ici pour nos tests microbiologiques.

La CMI et la CMB sur cette souche ont été déterminées avec les extraits alcaloïdiques des trois stations expérimentales (Farako-Bâ, Gampèla, CNRST). Bien que de teneurs différentes en conessine les extraits de Farako-Bâ (17,25 % de conessine), du CNRST (33,5 % de conessine) présentent les mêmes CMI et CMB (1,25 mg/ml). Lorsque la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide ont la même valeur, l'extrait peut être considéré comme bactéricide ; ce qui est le cas ici avec

les extraits alcaloïdiques.

L'échantillon de la station expérimentale de Campèla, bien que très pauvre en conessine (3,28 %) présente la plus faible CMI, donc s'avère comme la plus bactéricide des trois échantillons.

Ces résultats nous permettent de déduire que la conessine n'est pas la seule molécule du totum alcaloïdique à présenter une activité antibactérienne importante. L'efficacité du totum alcaloïdique en provenance des différentes stations expérimentales peut être considérée comme identique ; de 0,625 mg/ml à 1,25 mg/ml, la différence n'est pas significative.

C - TOXICO-PHARMACOLOGIE

Maintenu dans des conditions idéales (solution de tyrode, oxygénation), un fragment d'intestin grêle, isolé de l'organisme, maintient son tonus de base. Sous l'effet de l'acétylcholine, neuromédiateur, l'amplitude de contraction augmente considérablement.

- Le lyophilisat de décocté de feuilles diminue le tonus de base de même que l'amplitude de contraction enregistrée sous l'effet de l'acétylcholine (effet curatif). Cette inhibition, réversible, est plus forte avec le lyophilisat de décocté d'écorces de tiges.

Administré avant l'acétylcholine (effet préventif), l'extrait diminue l'amplitude de contraction due à l'effet cholinergique. Cette inhibition de la contraction aurait pour rôle de remédier à une évacuation rapide du chyle, donc de prévenir des cas de diarrhées où l'émission fréquente des selles liquides est accélérée sous l'effet des contractions intestinales dues à l'acétylcholine. Les tests sur intestin isolé ont été effectués avec des lyophilisats de décoctés (de feuilles et d'écorces de tiges) très riches en principes chimiques d'effets divers. Malgré

la richesse de ces extraits en anthracénosides (véritables laxatifs), le degré d'inhibition des contractions observées avec ces extraits n'est pas négligeable. Il existerait parmi ces principes chimiques certains dont l'effet s'opposerait à celui des anthracénosides ou d'éléments susceptibles de les inactiver.

La DL 50 (dose létale 50 %) a été déterminée aussi bien avec les décoctés de feuilles et d'écorces de tiges qu'avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux (tous les échantillons provenant de la station expérimentale de Farako-Bâ).

Avec le décocté de feuilles, la DL 50 est de 1000 mg/kg, avec les écorces de tiges, elle est de 950 mg/kg et avec les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux des écorces de tiges, elle est de 48,33 mg/kg ; avec ceux des feuilles, elle est de 65,5 mg/kg. Avec la conessine isolée et purifiée, elle est de 28,7 mg/kg (STEPHENSON, 1948).

Ces résultats montrent qu'un extrait enrichi en un groupe de principes actifs (alcaloïdes) ou un principe isolé et purifié, s'il est plus spécifique donc plus actif, reste cependant bien plus toxique que l'extrait total qu'est le décocté. De plus, ces extraits enrichis présentent une marge de manipulation très étroite, rendant leur utilisation très difficile.

CONCLUSION

Préconisée dans la tradithérapeutique des diarrhées dysentériques, *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur et schinz est une plante qui présente un polymorphisme lié notamment au microclimat environnemental et à la nature du sol. En effet, des rameaux de même taille et de même diamètre prélevés du site naturel de Dindéresso en Juin 1983 et transférés sur les sites expérimentaux de Farako-Bâ, CNRST et Gampéla connaissent à l'heure actuelle un polymorphisme qui risquerait de les faire considérer comme des espèces différentes. Des études pédologiques, menées au BUNASOLS (Bureau National des Sols) nous aident à comprendre ces résultats. En effet :

- La station du CNRST est constituée de sols à sesquioxydes de fer et de manganèse. Ils appartiennent au groupe des sols ferrugineux tropicaux lessivés.

- La station de Gampéla est constituée par les mêmes types de sols que ceux rencontrés au CNRST mais ils diffèrent par les matériaux originels.

- La station de Farako-Bâ est constituée de sols ferrallitiques. Ils sont très profonds et moins argileux que dans les deux autres cas.

Les études chimiques, entreprises à partir des échantillons provenant de chacune de ces stations montrent que même s'il n'y a pas de variations essentielles au niveau des constituants chimiques, notamment alcaloïdiques, leur teneur dans les échantillons varient pratiquement du simple au double et même plus.

Les études microbiologiques entreprises sur microorganismes (amibes non pathogènes, bactéries à Gram+ et bactéries à Gram-) montrent que ces extraits alcaloïdiques présentent pratiquement la même toxicité pour une même souche, qu'ils soient enrichis en conessine ou non. Par ailleurs, les souches étudiées ne présentent pas la même sensibilité vis à vis des extraits testés.

Membrane plasmique et paroi ne semblent pas constituer une barrière essentielle à l'efficacité des extraits ; l'association de la protamine qui, au niveau de certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27854, accroît la perméabilité membranaire (BOUSSARD, 1991), n'augmente pas la sensibilité de *E. coli* O₁₁, B₁, vis à vis des extraits alcaloïdiques. Les études cinétiques montrent qu'au bout de 4 heures, l'efficacité de l'extrait est sensible et augmente en fonction du temps.

Les études toxico-pharmacologiques montrent que les extraits alcaloïdiques sont toxiques et leur index thérapeutique étroit. Les décoctes de feuilles et d'écorces de tiges sont peu toxiques et spasmolytiques.

En conclusion nous pouvons dire que les extraits alcaloïdiques (des feuilles et des écorces de tiges) sont nettement plus efficaces que les décoctés correspondants. Malheureusement ces extraits alcaloïdiques sont très toxiques et présentent un index thérapeutique étroit, rendant leur utilisation très délicate.

Les feuilles comme les écorces de tiges sont efficaces contre les microorganismes mais les écorces de tiges sont plus toxiques.

Au vu des résultats, nous orienterons nos recherches vers une forme plus enrichie en alcaloïdes que le décocté et moins toxique que le totum alcaloïdique ; l'extrait hydro-alcoolique serait plus indiqué. Les extraits stéroliques et triterpéniques de même que des extraits enrichis en composés polyphénoliques feront l'objet d'investigations. Dans le même ordre d'idée, nous envisageons poursuivre l'étude plus approfondie des feuilles qui présentent au regard des études préliminaires, une toxicité moins accrue.

BIBLIOGRAPHIE

- BAILLEUL F. (1980). - Le *Feretia apondanthera* Del.
(Rubiacées), Recherches chimiques et pharmacologiques ; Thèse de Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques, Série E n°39, Paris.
- BEHRAUT J. (1971). - Flore illustrée du Sénégal, Dicotylédones, Acanthacées à Avicenniacees, Edit. Maisonneuve 1, 385 Sainte Ruffine.
- BENNET R.D., HEFTMANN E., SHUI-TZEKO (1966). -
Phytochemistry, 5, 517
- BERTHO A. (1944). - Pharmacologische Prüfung der Extracte und Alkaloids aus *Holarrhena antidysenterica*, Arch. Exp. Pharm. 203, pp 41-46.
- BISSET N.C. (1958). - Ann. Bogor., 3, part 1, 105
- BOUSSARD P., DEVLEESHOUWER M.J, DONY J. (1991). - In vitro modification of antimicrobial efficacy by pro*amine. Int. J. Pharm. 72, 51-55, Bruxelles.
- BROWN R. (1809). - Mém. Wern. Soc., 1, 62
- BROWN H.C. (1922). - Observations on the amoebicidal action of conessin, Bull. Med. J., 1, 993.
- CAVIER R. (1959). - Acquisitions récentes en thérapeutique anti-amibienne, Méd. Trop. 19, pp 619-645.
- CHABBERT Y.A., DAGUET G.L (1985). - Techniques en bactériologie, Flammarion, Med - Sc. 3, Sérologie bactérienne - Antibiotiques en bactériologie médicale.

- CHEVALIER A. (1938). - Flore vivante de l'Afrique Occidentale Française, Larose Edit., Paris, 1, 360 p.
- COURVALIN P. GOLDSTEIN F., PHILIPPON A., SIROT J. (1985). - L'antibiogramme, mpc - vidéom, 1, 12
- CROSNIER R., DARBON A., DUCOURNAU P. COSTE- ROUSSE L. (1952)
- Le dibromhydrate d'amine oxyconessine en thérapeutique de l'amibiase intestinale ou hépatite, Bull. Soc. Path. exot. 45, pp 86-92.
- CROSNIER R., MERLE F., BERNIER G., MOLINIER, TABUSSE (1948)
- Traitement de la dysentérie amibienne par les extraits d'*Holarrhena floribunda* . - Bull. Ac. Méd., 132, pp 336-338
- DE KRUIF A.P.M. (1981). - Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen 81 - 2 : 1 - 40
- DUEZ P., LIVATIDIS A., GUISSOU P. I. , SAWADOGO M., HANOCQ M. (1991).- Use of *Amoeba proteus* model for in vitro cytotoxicity testing in phytochemical research. Application to *Euphorbia hirta* extracts, Journal of Ethnopharmacology, Ireland, 34, 35.
- FAUST et HABICH, in KEIDEL (1878) - Ueber die physiologische Wirking des conessins, Dissert. Göttingen
- GIEMSA G., HALBERKANN J. (1918). - Ueber conessin, Arch. Pharm. Berlin, 256, 201
- GODET R. (1950). - La vaginite à *Trichomonas vaginalis*. Son traitement par la conessine, Thèse Doct. Méd., Paris.
- GOUTAREL R. (1964). - Les alcaloïdes stéroïdiques des Apocynacées, 1 vol., 289 p., Hermann, Paris, pp 166-171

- GUINKO S. (1984). - Végétation de la Haute-Volta,
Thèse de Doctorat d'Etat
Université de Bordeaux III

- HAINES R. (1865). - Notes en conessine alias wrightine,
Pharm. J. Bombay, 6, 432

- JANOT M-M, CAVE A., GOUTAREL R. (1959). -Togholamine, holamine,
holaphyllamine et holaphylline :trois nouveaux
alcaloïdes retirés des feuilles de *Holarrhena
floribunda*. Alcaloïdes stéroliques. Bull. Soc.
Chim. Fr., pp 896-900

- JANOT M.M, DEVISSAGUET Ph., KHUONG-HUU Q., GOUTAREL R.
(1967). - Alcaloïdes stéroïdiques. Structure de
l'holaline, alcaloïde mineur des écorces de
Holarrhena floribunda (G.Don) Dur. et Schinz.
Bull. Soc. Chim. Fr., pp 4315-4318

- JANOT M.M., KHUONG-HUU Q., MONNERET C., KABORE I.,
HILDESHEIM J., GERO S.D., GOUTAREL R. (1970). -
Tetrahedron, 26, 1695 - 1709, Paris

- KEIDEL A. (1878) .- Ueber die physiologische wirkung des
conessins. Dissert. Göttingen.

- KERHARO J. (1973) . - La pharmacopée sénégalaise tradition-
nelle - Plantes medicinales et toxiques, Ed. Vigot
Frères, Paris.

- LAVIER G., CROSNIER R., MERLE F. (1948). - Le traitement de
l'amibiase par la conessine, Bull. Soc. Pathol.
exot., 41, pp 548-533

- LEBOEUF M., CAVE A., GOUTAREL R. (1969). - Alcaloïdes
stéroïdiques. Composition chimique des feuilles de
Holarrhena floribunda Dur. et Schinz. Isolement de
la progestérone et de quatre nouveaux alcaloïdes :

méthylholaphylline, holaphyllinol, holaphyllidine
et dihydroholaphyllamine. Ann. Pharm. Fr. 27,
217-228

- LEPESME P. (1948). - Rev. Int. Bot. Appl. et Agr.
Trop., 28 : 120 - 125

- MILLOGO H. (1989). - Contribution à l'étude chimique et
pharmacologique de *Holarrhena floribunda*
(G. Don) Dur. et Schinz. - Etude de cytotoxicité
comparée d'extraits lyophilisés vis-à-vis
d'amibes non pathogènes -, Mém. DEA,
Univ. Ouagadougou, 34.

- PARIS R. (1938). - Etude d'une Apocynacée africaine : le
Séoulou (*Holarrhena africana* A.DC.)
Bull. Sc. Pharmacolog., 45, 453.

- PARIS R. (1942). - Nouvelles recherches sur le Séoulou
(*Holarrhena africana* A.DC.). - Bull. Sc. Pharmacolog.
49, 33.

- PARIS R. (1950). - Sur quelques drogues nouvelles d'AOF,
d'AEF et de Madagascar. Biologie Méd., 39, n° hors
série, pp LIV.

- PICHON M. (1948). - Mém. Mus. Hist. Nat. Paris
24, 117

- PIETTE M. (1948) .- Contribution à l'étude expérimentale et
thérapeutique de la conessine. Thèse Doct.
Med., Paris.

- POLSTORFF K., SHIRMER P. (1886). - Ueber conessin. Ber.
deutsch. Chem. Ges., 19 , pp 1682-1685

- RIBERAUX R. (1968). - Les composés polyphénoliques des
végétaux, Ed. Dunod, Paris.

- ROSTOCK H. SEEBECK E. (1958). - Holarfrin und holarrrhtin, Zuei unbekannte Esteralkaloïde aus *Holarrrhena floribunda* D.C. Helv. Chim. Acta, 41, 11-12

- SCHMIT A. (1950). - Recherches botaniques, chimiques et pharmacodynamiques sur *Holarrrhena Floribunda* (G.Don) Dur. et Schinz., Thèse Doctorat Pharm., Paris.

- SIGUIER F., PIETTE M., CROSNIER J. (1949). - Etude expérimentale comparative de la conessine et de l'émétine, Méd. Trop., 9, pp 99-109.

- SOULAGE J., PORTE L. (1950). - A propos de deux observations d'hépatites amibiennes traitées par le chlorhydrate de conessine - Méd. trop. 10, pp 287-290.

- STEPHENSON R.P. (1948). - The pharmacological properties of conessine, isoconessine and neocoenessine. J. Pharmacolog. Chem ; 3, 168.

- TANGUY F., ROBIN Ch., RAOULT A. (1948) .- Nouveaux essais de traitement de la dysentérie amibienne par le chlorhydrate de conessine - Thèse Doct. Médecine, Paris.

- ULRICI F. (1918). - Ein Betrag zur kenntnis der conessins. Arch. Pharm. Berlin, 256, 57

- UNICEF (1992) .- La situation des enfants dans le monde. Statistique de 1990, 72

RESUME

Holarrhena floribunda (G. Don) Dur. et Schinz est une Apocynacée rencontrée typiquement dans la région Ouest Africaine.

La plante est appelée en langues nationales :

Moore = Yabraogo

Jula = Fufu, Kuna

Fulfulde = Kenkeledi, Indama, Tarki

Ce travail présente un schéma de production d'extraits de la plante, adaptable à l'échelle semi-industrielle; *H. floribunda* étant recommandée dans la tradithérapeutique des diarrhée - dysentérieformes au sens général du terme. L'activité antibactérienne des extraits, quasi-négligée jusqu'ici, est évaluée vis-à-vis de microorganismes incriminés dans des pathologies gastro-entérites.

La standardisation chimique a été effectuée par évaluation de la teneur en principaux constituants actifs, notamment les dérivés alcaloïdiques et polyphénoliques.

Au regard des résultats chimiques et microbiologiques il a été entrepris l'évaluation toxicopharmacologique des extraits.

Mots clés

Holarrhena floribunda: - plante - tradithérapeutique - gastro-entérites - microorganismes - chimie microbiologie - toxicopharmacologie - échelle semi-industrielle.