



Université d'Abomey Calavi (UAC)
Faculté des Sciences de la Santé (FSS)



Ecole doctorale Sciences de la Santé (EDSS)

N°001/EDSS/FSS/UAC/2011



Plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin: ethnobotanique, évaluation de l'activité *in vitro* sur *Mycobacterium ulcerans*, identification, isolement, détermination structurale et premiers essais de quantification de principes actifs

THESE UNIQUE

**Présentée et soutenue en vue de l'obtention du grade
de Docteur de l'Université d'Abomey Calavi
en Sciences de la Santé
Option : Sciences Pharmaceutiques/Chimie Analytique**

par

YEMOA Loconon Y. Achille

Pharmacien diplômé d'Etat

le 08 Juillet 2011 devant la commission d'examen composée de :

Président : Prof Joëlle QUETIN LECLERCQ (UCL, Belgique)
Rapporteurs : Prof Brigitte EVRARD (Université de Liège, Belgique)
Prof André BIGOT (UAC, Bénin)
Membres : Prof Mansourou MOUDACHIROU (UAC, Bénin)
Prof Sévérin ANAGONOU (UAC, Bénin)

Directeurs

Prof Mansourou MOUDACHIROU (UAC; Bénin)
Prof Sévérin ANAGONOU (UAC; Bénin)

Co-directeurs

Prof Joëlle QUETIN LECLERCQ (UCL, Belgique)
Prof Françoise PORTAELS (IMT Anvers, Belgique)

REMERCIEMENTS

A mon Seigneur JESUS- CHRIST

Merci pour ta divine protection et tes bénédictions dans ma vie.

A nos Maîtres, Directeurs et Co-directeurs de cette thèse :

Chers maîtres, vous avez accepté de diriger ce travail malgré vos multiples préoccupations.

Veuillez recevoir, le témoignage de notre profonde gratitude. Puisse Dieu vous bénir et vous accorder longévité.

A notre Président de Jury

Nous vous remercions très respectueusement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de soutenance de thèse. Nous sommes convaincus que vos critiques et suggestions aideront à améliorer ce travail.

Hommage respectueux.

Aux distingués membres de jury

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous sommes convaincus que vos critiques et suggestions aideront à l'améliorer.

Hommage respectueux.

Cette thèse a été financée par le **WBI (ex CGRI)** à travers le projet « Appui à l'autonomisation de l'Ecole de Pharmacie de Cotonou-Bénin ». Je tiens à témoigner toute ma gratitude à cette institution ainsi qu'aux différentes personnes qui y travaillent (WBI-Bruxelles et WBI-Cotonou).

Au Professeur **Françoise PORTAELS**, je vous dis sincèrement merci pour tout. Par vos précieux conseils et votre encadrement, vous m'avez fait découvrir l'univers de la mycobactériologie par le biais de la recherche. Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre laboratoire qui fut un cadre idéal pour réaliser ce travail.

Remerciements

Au Professeur **Joëlle QUETIN- LECLERCQ**, je vous dis sincèrement merci pour tout. Par vos précieux conseils et votre encadrement, vous m'avez fait découvrir l'univers de la pharmacognosie par le biais de la recherche. Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre laboratoire qui fut un cadre idéal pour réaliser ce travail. Merci pour m'avoir choisi comme doctorant sur ce projet.

Au Feu Professeur **Paul VAN BRANDT** pour son implication dans la coopération entre notre université et l'Université Catholique de Louvaine (UCL).

Au Professeur **André BIGOT**, Doyen de la Faculté des Sciences de la Santé, Directeur de l'école doctorale «Science de la Santé», je vous remercie pour votre soutien et vos orientations. Merci pour tout ce que vous faites pour cette faculté.

Au Professeur **Mansourou MOUDACHIROU**, Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre laboratoire qui fut un cadre idéal pour réaliser ce travail. Merci pour votre soutien.

Au Professeur **Sévérin ANAGONOU**, Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre laboratoire qui fut un cadre idéal pour réaliser ce travail. Merci pour votre soutien.

Au Professeur **Joachim GBENOU**. Merci pour vos conseils et votre encadrement.

Au Dr **Anandi MARTIN**, pour ses conseils et son initiation aux tests colorimétriques REMA. Resazurin Microtiter Assay

Au Dr **Leen RIGOUTH** pour ses conseils

Au Dr **Juan Carlos PALOMINO** pour ses encouragements et conseils

Au Dr **Roc Christian JOHNSON**, pour ses conseils et son soutien

Au Dr **Dissou AFFOLABI**, pour ses conseils et orientation

Au Dr **Fernand GBAGUIDI**, pour ses conseils et orientation

Au Dr **Salomé KPOVISSI**: Je t'ai personnellement côtoyé lors de la rédaction de ce travail. Cela m'a beaucoup fortifié. Merci pour tes conseils et tes prières.

Remerciements

Aux doctorants de l'IMT avec qui j'ai passé un bout de temps (certains sont maintenant PhD): Dr KIBADI, Dr SOPOH, Dr EDDYANI, Dr PANHZU. Merci pour vos échanges enrichissants.

A Mr Elie NDUWAMAHORO, Mme Cécile UWIZEYE, Mme Krista FISSETTE pour votre disponibilité, et votre aide.

A Mr Patrick SUYKERBUYK pour sa sollicitude.

A tout le Personnel du LRM (Cotonou): Merci pour votre aide.

A tout le personnel du LAPHE (Cotonou): Merci pour votre aide

A tout le personnel de L'IMT (Anvers) pour leur aide

A tous les amis du CHAM (Bruxelles), pour votre accueil et votre disponibilité. Merci Mme Marie-Christine FAYT pour tes initiations à l'utilisation des appareils.

Mme Françoise GELDERS, Merci pour tes nombreuses aides lors des démarches administratives: inscription, commune.....merci pour tout.

Merci aux doctorants de CHAM qui ont partagé ces moments avec moi (certains sont PhD maintenant): Joanne, Joseph, Mamy, Nadège, Aecio, Eric.

Merci aux post Doc de CHAM pour leurs conseils et soutien: Gabrielle, Emmanuelle.

A tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail, je vous dis: «miwanu».

A mon Père Théodore YEMOA

Ce jour marque pour toi l'aboutissement d'une longue période d'espoir.

Puisse Dieu te bénir et t'accorder longévité.

A ma mère Eugénie HINVI

Au prix de tant de sacrifices, ton rêve est désormais réalisé.

Puisse Dieu te bénir et t'accorder longévité.

A tous mes frères et sœurs,

Ma réussite a toujours été un souci permanent pour vous.

Vous m'avez toujours soutenu financièrement et moralement.

Profonde gratitude

Remerciements

A toute ma grande famille

Merci pour votre soutien

A ma tendre épouse Angèle DOHOU YEMOA

Merci pour ton soutien

A mes deux filles Primaèle et Praise Eliana

Je vous prie de ne pas me tenir rigueur pour mon absence pendant mes périodes de recherches doctorales.

A tous les membres du corps de Christ

Merci pour vos prières

Aux tradipraticiens de la Commune de Ouinhi

Merci pour votre franche collaboration. Je ne trahirai pas votre confiance.

LISTE DES ABREVIATIONS

UAC: Université d'Abomey Calavi
FSS: Faculté des Sciences de la Santé
EDSS: Ecole doctorale Sciences de la Santé
UCL: Université Catholique de Louvain
IMT: Institut de médecine tropicale
WBI: Wallonie Bruxelles Internationale
UB: Ulcère de Buruli
BU: Buruli ulcer
LC-MS: Liquid chromatography coupled with Mass spectrometry
OMS: Organisation mondiale de la santé
WHO: World health organization
BAAR: Bacilles acido-alcool-résistants
RDC: République démocratique du Congo
PNLUB: Programme national de lutte contre l'ulcère de Buruli
CSNG: Centre sanitaire et nutritionnel GBEMOTEN
ZN: Ziehl Neelsen
PCR: Polymerase chain reaction
DST: Drug susceptibility test
CMI: Concentration minimale inhibitrice
CSC: Centre de santé de commune
CSA: Centre de santé d'arrondissement
CNHPP: Centre national hospitalier de pneumo-physiologie
LAPHE: Laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles
LRM: laboratoire de référence des mycobactéries
REMA: Resazurin microtiter assay
DMSO: Dimethyl sulfoxide
CCM: Chromatographie sur couche mince
HPLC- MS: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
MPLC: Medium Pressure Liquid chromatography
CLPA: Chromatographie liquide à pression atmosphérique
MS: masse spectrometry
RMN: Résonance magnétique nucléaire

SM: Spectrométrie de Masse

ESI: electrospray ionisation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Eléments de diagnostic clinique de l'UB.....	17
Tableau 2.2 : Eléments du diagnostic biologique de l'UB.....	18
Tableau 2.3 : Traitement spécifique de l'UB.....	21
Tableau 2.4 : Antibiotiques efficaces <i>in vitro</i> sur <i>M. ulcerans</i>	23
Tableau 2.5 : Antibiotiques actifs sur <i>M. ulcerans</i> chez l'homme.....	24
Tableau 3.1 : Répertoire des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB au Bénin	39
Tableau 4.1 : Résultats du criblage mycobactériologique	50
Tableau 5.1 : Résultats du criblage phytochimique des feuilles de <i>H. floribunda</i>	69
Tableau 5.2 : Résultats du test <i>in vitro</i> des fractions sur <i>M. ulcerans</i>	69
Tableau 5.3 : Récapitulatifs des résultats de l'analyse CCM.....	74
Tableau 6.1 : Composés identifiés dans les fractions après la spectrométrie de masse	89
Tableau 6.2 : Récapitulatif des composés identifiés par spectrométrie de masse.....	92
Tableau 6.3 : Données spectrométriques ^1H RMN du composé D dans CDCl_3 -MeOD (2:1) comparées à celles de la base de données et de la littérature.....	99
Tableau 6.4 : Données spectrométriques ^1H , ^{13}C RMN du composé D dans CDCl_3 -MeOD..	104
Tableau 6.5 : Résultats des tests d'activité biologique.....	106

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Structure de la mycolactone.....	12
Figure 2.2 : Structure chimique de la rifampicine et de la streptomycine	26
Figure 2.3 : Ablation de la nécrose par application de cataplasme	29
Figure 2.4 : UB sous traitement traditionnel.....	30
Figure 3.1 : Carte du Bénin situant la zone d'étude (commune de Ouinhi).....	35
Figure 3.2 : Carte de la commune de Ouinhi.....	35
Figure 4.1 : Structure chimique de la rezaurine (C ₁₂ H ₇ NO ₄).....	41
Figure 5.1 : Photographie d'un rameau feuillé de <i>H. floribunda</i> (G.Don) T.Durand et Schinz.....	56
Figure 5.2 : Schéma de la partie aérienne de <i>H. floribunda</i>	57
Figure 5.3 : Structure chimique de composés isolés de <i>H. floribunda</i> (G.Don) T.Durand et Schinz.....	61
Figure 5.4 : Schéma d'un percolateur.....	63
Figure 5.5 : Mode d'utilisation d'une ampoule à décanter.....	64
Figure 5.6 : Mode opératoire du fractionnement liquide liquide.....	65
Figure 5.7 : Développement chromatographique d'une plaque.....	66
Figure 5.8 : Schéma d'extraction d'alcaloïdes totaux.....	68
Figure 5.9 : Plaque REMA après révélation avec la rezaurine.....	70
Figure 5.10 : Plaque CCM après révélation par le réactif de Dragendorff.....	71
Figure 5.11 : Plaque CCM après révélation avec le réactif de NEU/PEG.....	72
Figure 5.12 : Plaque CCM après révélation avec l'anysaldéhyde sulfurique.....	73
Figure 5.13 : Plaque CCM après révélation avec le réactif de FeCl ₃	74
Figure 5.14 : Plaque REMA après révélation avec la rezaurine.....	75
Figure 6.1 : CCM de la fraction alcaloïdique totale.....	79
Figure 6.2 : CCM de l'extrait brut.....	80
Figure 6.3 : CCM de quelques sous fractions alcaloïdiques issues de la MPLC.....	81
Figure 6.4 : Photographie du spectromètre de masse couplé à l'HPLC.....	84
Figure 6.5 : Schéma de l'analyseur LTQ orbitrap XL.....	85
Figure 6.6 : Schéma de l'ionisation à pression atmosphérique par electrospray.....	86
Figure 6.7 : Chromatogramme de la fraction V obtenu en mode positif avec appel d'ion, montrant le composé D (<i>m/z</i> : 330,3) ainsi que son TR.....	90
Figure 6.8 : Spectre de masse du composé D.....	93
Figure 6.9 : Structure proposée pour le composé D.....	93
Figure 6.10 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé (D) à <i>m/z</i> 330,28 (mode positif).....	94
Figure 6.11 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à <i>m/z</i> 344,29.....	95

Figure 6.12 : Structure proposée pour le composé C.....	95
Figure 6.13 . Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à m/z 316,26.....	96
Figure 6.14 : Structure proposée pour le composé B.....	97
Figure 6.15 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à m/z : 332.....	98
Figure 6.16 : Structure proposée pour le composé A.....	98
Figure 6.17 : Spectre RMN du ^1H	100
Figure 6.18 : Spectre RMN du ^1H mentionnant quelques valeurs de déplacements chimiques.....	101
Figure 6.19 : Spectre RMN montrant la corrélation homonucléaire ^1H - ^1H COSY.....	102
Figure 6.20 : Spectre RMN montrant la corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HSQC.....	103
Figure 6.21 : Holadysamine.....	104
Figure 6.22 : Propositions de structures des composés A, B, C	105
Figure 7.1 : Chromatogramme obtenu avec une distance de migration de 7 cm.....	116
Figure 7.2 : Chromatogramme obtenu à une distance de migration de 8 cm.....	117
Figure 7.3 : Chromatogramme obtenu à une distance de migration de 7,5 cm ...	117
Figure 7.4 : Essai à J_1	118
Figure 7.5 : Essai à J_2	119
Figure 7.6 : Séparation à J_3	119
Figure 8.1 : Proposition d'algorithme de la prise en charge de l'UB intégrant la Phytothérapie.....	131

SOMMAIRE

	PAGE
RESUME	1
I - BUT DU TRAVAIL	5
II - INTRODUCTION	8
III - IDENTIFICATION DES PLANTES	33
IV - ETUDE DE L'ACTIVITE IN VITRO SUR <i>M .ulcerans</i>	44
V - CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE	54
VI - IDENTIFICATION, ISOLEMENT DETERMINATION STRUCTURALE.....	76
VII - ESSAIS PRELIMINAIRES DE DEVELOPPEMENT DE METHODE DE QUANTIFICATION	109
VIII - DISCUSSION GENERALE	121
IX - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	132
X - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	135
ANNEXE	150

Résumé

L'ulcère de Buruli (UB), connu sous le nom d'ulcère de Bairnsdale, maladie provoquée par *Mycobacterium ulcerans*, fait partie des maladies tropicales les plus négligées, alors qu'il peut être traité. Actuellement, seul le traitement par antibiotiques spécifiques associé ou non à la chirurgie a une efficacité prouvée.

Mais au Bénin, les croyances et les pratiques socioculturelles influent fortement sur la recherche des soins par les sujets atteints. Le traitement traditionnel est souvent leur premier recours. L'UB entraîne des coûts économiques élevés pour les ménages concernés et les systèmes de santé devant diagnostiquer la maladie et traiter les patients. Il faut faire des recherches pour trouver des traitements efficaces à moindre coût pour cette maladie onéreuse. Les plantes demeurent toujours une source importante de nouvelles molécules pharmacologiquement actives. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de l'activité antimycobactérienne et de la composition de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB au Bénin. Ainsi, dans un premier temps, nous avons entrepris un screening microbiologique de 44 plantes sélectionnées à l'issue d'une enquête ethnobotanique que nous avons réalisée. Au terme de celui-ci, nous avons décidé de travailler sur *Holarrhena floribunda*; plante la plus active *in vitro* sur *M. ulcerans*. Nous avons montré que l'extrait alcaloïdique de cette plante ainsi qu'un des quatre alcaloïdes stéroïdiques alcooliques qu'elle contient possèdent une activité antimycobactérienne intéressante *in vitro* sur *M. ulcerans*. Au cours de ces travaux, nous avons proposé un schéma d'extraction et de purification de ces alcaloïdes stéroïdiques et une méthode analytique d'identification rapide de ceux-ci dans les extraits végétaux par LC-MS.

Abstract

Buruli ulcer (BU), commonly known as Bairnsdale ulcer, disease caused by *Mycobacterium ulcerans*, is one of the most neglected but treatable tropical diseases. Currently, only the treatment with specific antibiotics with or without surgery has proven efficacy.

In Benin, sociocultural beliefs and practices strongly influence the health-seeking behaviours of people affected by BU. The first recourse is often traditional treatment. BU imposes a serious economic burden on affected households and on health systems that are involved in diagnosing the disease and treating patients. Research is needed to find cost-effective therapies for this costly disease. Plants have always been an important source of new pharmacologically active molecules. Consequently we decided to undertake the study of plants used in traditional treatment of BU in Benin and investigate their antimycobacterial activity as well as their chemical composition. Initially we performed a screening of 44 plants chosen on an ethno botanical basis. This screening allowed us to focus our work on *Holarrhena floribunda* which proved to be most active on *M. ulcerans*. We showed that the alkaloid extract from this plant as well as one of the four steroidal alkaloids isolated from it were active *in vitro* on *M. ulcerans*. During this work, we proposed some purification procedures for this steroidal alkaloids and developed analytical methods allowing their rapid identification in plant extracts by LC-MS.

PLANTES UTILISEES DANS LE TRAITEMENT TRADITIONNEL DE L'ULCERE DE BURULI AU BENIN: ETHNOBOTANIQUE, EVALUATION DE L'ACTIVITE *IN VITRO* SUR *MYCOBACTERIUM ULCERANS*, IDENTIFICATION, ISOLEMENT, DETERMINATION STRUCTURALE ET PREMIERS ESSAIS DE QUANTIFICATION DE PRINCIPES ACTIFS.

I.

BUTS DU TRAVAIL

L'ulcère de Buruli (UB) est une affection cutanée provoquée par une mycobactérie appelée *Mycobacterium ulcerans*. Les foyers sont circonscrits géographiquement presque toujours autour d'un écosystème aquatique (fleuve, lac artificiel ou naturel, zone marécageuse, système d'irrigation) (Portaels; 2009). A ce jour, l'UB a été recensé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans plus de trente pays de plusieurs continents (Afrique, Amérique, Asie, Océanie). Au Bénin, c'est la deuxième affection mycobactérienne après la tuberculose, avec près de 7000 cas entre 1989 et 2006 (WHO; 2007). L'UB débute par un nodule, une plaque ou un œdème indolore au niveau de la peau qui, en l'absence de traitement, évolue vers une ulcération massive de la peau (Asiedu; 2000). Actuellement, seul le traitement par antibiotiques spécifiques associé ou non à la chirurgie a une efficacité prouvée (Etuaful; 2005, Chauty; 2007, Kibadi; 2010). Il ne peut cependant être réalisé que dans certains centres médicaux disposant d'un plateau technique adéquat et de personnel spécialisé (Nienhuis; 2010). Pour les malades, lorsque la chirurgie s'avère nécessaire, ce traitement paraît coûteux et pourvoyeur de mutilations diverses, voire des amputations (Stienstra; 2002).

Le traitement traditionnel pour des raisons aussi bien culturelles qu'économiques, est donc le premier recours qui s'offre à ces malades qui sont en général pauvres (Johnson; 2004). Malgré son importance pour les malades, il est peu documenté. Deux études antérieures réalisées au Bénin ont décrit ce type de traitement, notamment le contexte culturel et les différentes formes de ce traitement (Guédénon; 1995, Johnson; 2004). Cependant, la plupart des différentes composantes entrant dans ce traitement appartiennent au règne végétal et sont peu connues.

L'objectif général de ce travail est d'identifier et d'isoler des composés naturels extraits de plantes entrant dans ce traitement et actifs sur *M. ulcerans*, agent étiologique de l'UB.

Notre but est d'une part de contribuer à la connaissance des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB au Bénin, d'évaluer leur activité antimycobactérienne *in vitro* sur *M. ulcerans*, et de valider leur usage en médecine traditionnelle, mais également d'identifier de nouvelles molécules, ce qui pourrait renforcer l'arsenal thérapeutique contre l'UB.

Les différentes étapes sont:

- ✓ Identification et récolte des plantes répertoriées dans la localité de Ouinhi
- ✓ Mise au point d'un test rapide d'évaluation *in vitro* d'activité d'extraits végétaux sur *M. ulcerans*
- ✓ Etude de l'activité *in vitro* de différents extraits sur *M. ulcerans*;
- ✓ Etude phytochimique de l'extrait le plus actif
- ✓ Fractionnement bio guidé
- ✓ Isolement et détermination structurale de composés actifs
- ✓ Premiers essais de séparation des alcaloïdes pour leur quantification.

II.
INTRODUCTION

2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR L'UB

2.1.1. Historique et répartition géographique

L'UB a été reconnu pour la première fois par Sir Albert Cook en 1897 dans une région de l'Ouganda appelée le Buruli, puis en Australie en 1937. Les premières observations ont été publiées en Australie en 1948 par MacCallum qui relie l'infection à la présence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR). Ce bacille a été isolé d'un ulcère à la jambe d'un enfant et est alors appelé bacille de Bairnsdale, du nom de la ville dont l'enfant est originaire (Marchandin; 2004).

En 1950, Van Oye et al décrivent le cas d'un enfant américain porteur de l'ulcère cutané caractéristique et vivant dans la région de Kwilu au Congo Belge (Van Oye; 1950). Un autre foyer est identifié à Kasongo par Janssens en 1958 (Janssens; 1959).

L'appellation «UB» quant à elle date de 1961, année où Clancey et al publient les premières observations portant sur 40 patients au nord est de Kampala (Ouganda), dont 28 vivant dans la région de Buruli (Clancey; 1961). Plusieurs pays d'Afrique centrale ont été également touchés: le Gabon (Bruchard; 1985), l'Angola (Bär; 1998) et le Cameroun (Ravisse; 1977).

Le premier foyer d'UB en Afrique de l'ouest est découvert au Nigéria en 1967 (Oluwasamni; 1976). En 1971, la maladie est découverte au Ghana (Bayley; 1971).

Au Bénin, la première description de cas remonte à 1988 (Muelder; 1988), bien que des malades aient déjà été répertoriés en 1977 (Aguiar; 1997). Des cas d'UB sont également reconnus en Côte d'Ivoire (Perraudin; 1980), au Liberia (Ziefer; 1981), au Togo (Meyers; 1996), en Sierra Leone (Monson; 1984) et au Burkina Faso (Ouaba; 1998).

2.1.2. Incidence, Prévalence, distribution de cas.

L'UB est signalé dans plus de trente (30) pays dans le monde entier (Janssens ; 2005). La plupart de ces pays sont situés en zone intertropicale:

- Afrique: Angola, Bénin, Burkina Faso, Cameroun, Congo-Brazzaville, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée Equatoriale, Kenya, Liberia, Nigeria, République Démocratique du Congo (RDC), Ouganda, Soudan, Togo (Janssens; 2005, Walsh;2009).

- Amériques: Guyane française (Pradinaud; 1974), Mexique (Coloma; 2005), Pérou (Guerra; 2008), Suriname (Janssens; 2005)
- Asie: Malaisie (WHO; 2008)
- Océanie: Australie (Veitch; 1997), Papouasie Nouvelle Guinée (Igo; 1998). Certains cas sont en zone non tropicales:
- Asie: Chine (Faber; 2000), Japon (Tsukamura; 1982).

L'Afrique est le continent le plus touché. Les cas d'UB sont regroupés en foyers (Portaels; 2009). Le fait de résider dans une zone d'endémie et à proximité de certaines étendues d'eau constituent d'importants facteurs de risque (Johnson; 2005).

Deux pays ont effectué une étude de prévalence de l'UB: il s'agit du Ghana et de la Côte d'Ivoire. Au Ghana, Amofah et al ont identifié 5.619 cas d'UB. La prévalence pour les lésions actives était de 20,7/100.000 mais dans les districts les plus endémiques (Amansie West), cette prévalence pourrait atteindre 150,8/100.000 (Amofah; 2002). En Côte d'Ivoire, Kanga et al ont enregistré 10.382 cas d'UB. Parmi eux, 4.642 étaient des cas actifs donnant un taux de prévalence de 32/100.000 (Kanga; 2001).

Au Bénin, aucune donnée nationale sur la prévalence de l'UB n'existe. Cependant, une étude réalisée en 1996 dans le département du Mono recense 219 malades (prévalence de 28,5/100.000) [données du programme national de lutte contre l'ulcère Buruli: PNLUB]. Johnson et al ont décrit des prévalences pouvant aller de 58/100.000 à 3263/100.000 d'un village à l'autre dans l'arrondissement de Gnizounmè, dans ce même département du Mono. La diminution de la prévalence dans ce cas serait fonction de la distance par rapport au fleuve et du type de point d'eau utilisé (Johnson; 2005).

Deux enquêtes effectuées en 1997 dans Ouinhi et Zagnanado, deux sous-préfectures du département du Zou, recensent respectivement 749 et 234 cas d'UB. En 2010, 34 cas ont été recensés à Ouinhi et 12 cas à Zagnanado [données PNLUB].

En 1997, Aguiar et al publient les résultats d'une étude portant sur 635 malades souffrant de l'UB qui se sont présentés au centre de dépistage et de traitement de l'UB (CDTUB), le centre sanitaire et nutritionnel GBEMOTEN (CSNG), entre 1991 et 1997 (Aguiar; 1997).

Debacker et al publient les données de 1700 patients vivant dans le sud du Bénin et reçus au CSNG de Zagnanado, de 1997 à 2001. Dans la région du Zou au Bénin, en 1999, l'UB avait un taux de détection plus élevé (21,5/100.000) que la lèpre (13,4/100.000) et la tuberculose (20/100.000) (Debacker; 2004).

Sopoh et al présentent les données de routine de 2598 cas nouveaux et récurrents de 2003 à 2005 (Sopoh; 2007).

L'UB entraîne peu de décès, mais de lourdes conséquences notamment:

- sociales: déscolarisation, désorganisation de la structure familiale, problèmes de réinsertion sociale.
- économiques: répercussion importante sur l'économie rurale à long terme, compte tenu des coûts directs et indirects élevés de la prise en charge.
- les complications requièrent une hospitalisation prolongée et des ressources importantes comparées à d'autres maladies (Asiedu; 2000).

2.1.3. Epidémiologie

2.1.3.1 Agent pathogène

M. ulcerans appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille renferme un seul genre (*Mycobacterium*) et plus de 100 espèces.

M. ulcerans est un bacille acido-alcool-résistant (BAAR) car une fois coloré par la fuschine ou bien par l'auramine, il n'est ni décoloré par l'alcool ni par l'acide. Ceci est dû à la richesse de sa paroi en lipides. Il présente un certain nombre de particularités:

- Il possède une séquence d'insertion spécifique, l'IS2404 présente en plus de 200 copies dans le génome.
- Il produit une toxine lipidique, nécrosante et immunosuppressive: la mycolactone. Sa structure est représentée sur la figure 2.1.

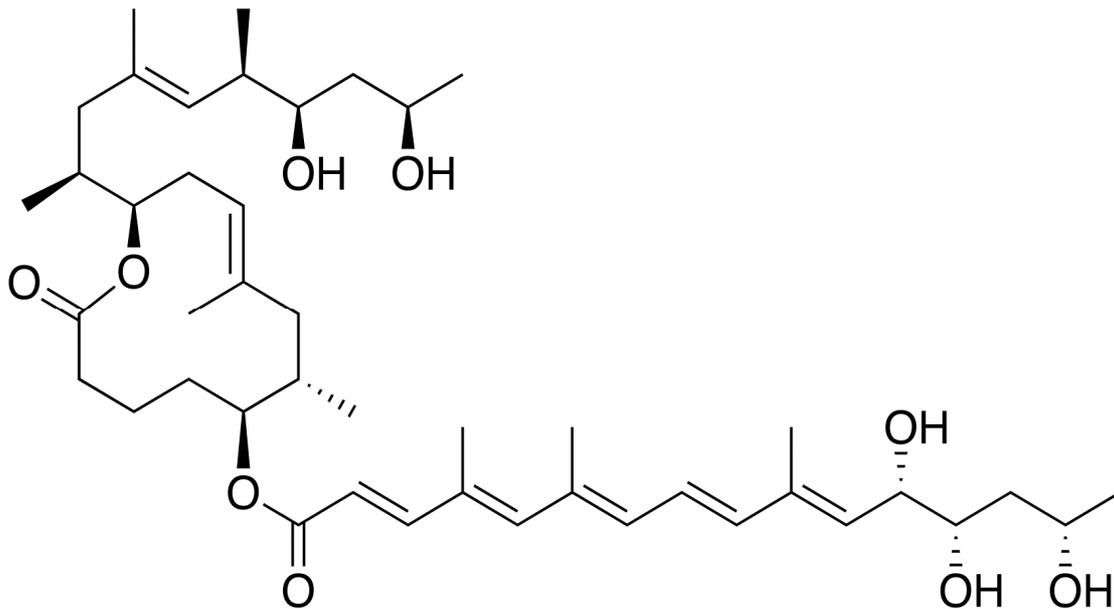


Figure 2.1 : Structure de la mycolactone

➤ Caractères cultureux

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente (Marchandin; 2004). Le milieu de Löwenstein-Jensen (LJ) est le milieu de culture qui convient le mieux, parmi les milieux solides classiquement utilisés pour la culture des mycobactéries (OMS; 2001). Il se cultive également sur les milieux Middlebrook 7H11 agar (Ji; 2006), Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H12 (Palomino; 1998) qui sont des milieux liquides.

La température optimale de développement de *M. ulcerans* est de 32°C (30-33°C). Le temps d'incubation dépend du milieu de culture utilisé.

➤ Pouvoir pathogène

M. ulcerans appartient à un groupe de mycobactéries potentiellement pathogènes pour l'homme et l'animal (Asiedu; 2000).

- Réservoir et mode de transmission

➤ Réservoir

Le biotope hydro tellurique fut en premier suspecté d'être étroitement lié à la survenue de cas endémiques de la maladie. En effet, ces cas endémiques sont principalement observés dans des zones géographiques peu drainées, marécageuses, éventuellement après survenue d'inondations importantes.

2.1.3.2. Terrain

➤ Age

Tous les groupes d'âges sont atteints. Mais on note surtout la maladie chez les enfants de moins de 15 ans. Aucun groupe racial ou socio-économique n'est à l'abri de la maladie (Asiedu; 2000).

➤ Sexe

La répartition en fonction du sexe est à peu près équivalente, bien que chez les jeunes, la maladie atteigne plus de garçons que de filles, tandis que c'est l'inverse chez les adultes (Walsh;2011).

➤ L'infection à VIH

L'infection à VIH aggrave l'évolution clinique des formes ostéomyélitiques (Johnson; 2002, Portaels; 2003) et pourrait constituer un facteur de risque pour l'UB comme le suggère une récente étude cas témoins (Jonhson; 2008).

2.1.4. Pathogénie

Après introduction dans le derme ou le tissu sous-cutané, *M. ulcerans* passe par une phase de latence (Portaels; 2009). Il prolifère ensuite et produit la mycolactone (Asiedu; 2000). Cette toxine a une affinité pour les tissus gras qui se traduit par la destruction de la graisse hypodermique (Marchandin; 2004, Asiedu; 2000). La nécrose qui en résulte, constitue un milieu favorisant la prolifération de *M. ulcerans* qui, de ce fait s'en trouve accélérée. La prolifération permet au germe dans certains cas d'atteindre l'os par contiguïté ou par dissémination hématogène (Portaels; 2003, Portaels; 2009).

➤ Immunité

Au cours de la phase de nécrose, la réponse immunitaire de l'hôte est incapable de détruire *M. ulcerans*, et l'intra-dermo réaction à la buruline, un extrait brut de lysat de *M. ulcerans*, reste négative. On peut expliquer cela en considérant que l'accumulation subséquente de la toxine à ce stade pourrait provoquer la lyse des macrophages de l'hôte et paralyser les fonctions des lymphocytes et des macrophages (Walsh; 2011).

Au stade de la cicatrisation, caractérisé par l'apparition de granulomes, l'intra-dermo réaction à la buruline redevient positive. Ceci suggère que l'hôte

est alors en mesure de développer une réaction immunitaire à médiation cellulaire. Toutefois, le mécanisme de survenue de la phase de cicatrisation demeure inconnu (Marchandin; 2004).

2.1.5. Etude clinique

L'UB est une infection chronique nécrosante de la peau et de la graisse sous-cutanée qui évolue en trois phases (Walsh; 2011):

- 1- Une phase pré-ulcéralive
- 2- Une phase ulcéralive
- 3- Une phase de cicatrisation

L'incubation dure en moyenne 6 à 12 semaines, voire plusieurs mois ou même des années.

2.1.5.1. Les stades cliniques (Guédénon et Portaels; 2000)

2.1.5.1.1. Stade pré ulcéré

Souvent méconnu ou négligé par les patients, ce stade marque le début de la maladie. Les différentes formes caractérisant cette phase sont: la formation de papule, nodule, plaque ou d'œdème. On ne note pas les signes généraux d'infection à ce stade (Marchandin; 2004).

- Papule: c'est une lésion cutanée indolore surélevée de moins d'un centimètre de diamètre.
- Nodule: c'est une lésion ferme, indolore, palpable, d'un à deux centimètres de diamètre, localisée dans le tissu sous-cutané et en général adhérente à la peau. Il s'accompagne souvent d'un prurit.
- Plaque: c'est une lésion indolore, bien démarquée, surélevée, ferme et indurée de plus de 2 centimètres de diamètre à bords irréguliers.
- Œdème: c'est une tuméfaction diffuse, étendue, ferme, « ne prenant pas le godet », à bords mal définis, parfois douloureux, avec ou sans modification de pigmentation de la peau affectée.

2.1.5.1.2. *Stade ulcéré*

On note une lésion cutanée, se caractérisant par un centre nécrosé, des bords creusés et une peau œdématiée. En l'absence de surinfection, les ulcères restent indolores ou très peu douloureux (Asiedu; 2000).

2.1.5.1.3. *Stade cicatriciel*

La cicatrisation n'est pas toujours spontanée. Elle s'effectue au prix de brides chéloïdiennes, d'ankyloses, de raideurs, d'atrophies, et de séquelles fonctionnelles gênant le mouvement des articulations du voisinage.

2.1.5.2. *Les autres formes cliniques*

- La forme mixte : Il s'agit de patients présentant simultanément au moins deux des stades décrits plus haut.
- La forme disséminée: elle comporte la présence simultanée ou consécutive d'ulcères ou d'autres formes sur différentes parties du corps. Ces formes sont probablement le résultat de la propagation par voie hématogène ou lymphatique de l'agent pathogène.
- Des atteintes osseuses sont également observées. Les ostéomyélites causées par *M. ulcerans* sont confirmées par les tests bactériologiques et histopathologiques (Lagarrigue; 2000, Portaels; 2003).

2.1.6. Diagnostic

2.1.6.1. *Diagnostic clinique*

Il repose essentiellement sur l'aspect et le site des lésions, leur caractère souvent indolore, mais aussi sur l'âge des patients, leur lieu d'habitation ou la notion d'un éventuel séjour en zone d'endémie. Le tableau 2.1 reprend ces différents éléments (Marchandin; 2004).

En zone d'endémie, ces critères cliniques sont en général suffisants à une personne expérimentée pour poser le diagnostic clinique de l'UB.

Tableau 2.1 : Eléments de diagnostic clinique de l'UB.

Critères cliniques	Eléments de diagnostic
Habitat, séjour ou voyage en zone d'endémie	Zone intertropicale
Age du patient	Principalement enfants d'âge inférieur à 15 ans Mais aussi adultes de tous âges
Localisation des lésions	Tout le corps mais principalement les membres
Aspect caractéristique des lésions	Nodule, papule, plaque, œdème, ulcérations plus ou moins vastes à bords décollés et souvent indolores

2.1.6.2. Diagnostic microbiologique

Il comprend deux volets: l'examen histopathologique et le diagnostic bactériologique (Marchandin; 2004). Les étapes capitales afin de rendre le diagnostic possible sont: la qualité de l'échantillon à analyser, les conditions de transport des échantillons au laboratoire et les conditions de culture.

2.1.6.2.1. Prélèvement (Marchandin; 2004).

Il se réalise en fonction de la forme clinique de l'UB.

➤ Lésions non ulcératives

Il faut exciser la lésion ou effectuer une aspiration à l'aide d'aiguille fine (Eddyani; 2009) et faire le prélèvement au centre présumé de la lésion.

➤ Lésions ulcératives

Il faut réaliser un prélèvement sous les bords creusés de l'ulcère (à l'aide d'un écouvillon) ou une biopsie au niveau des bords creusés de l'ulcère comprenant du tissu sous-cutané.

➤ Infection osseuse

Il faut réaliser un curetage osseux.

2.1.6.2.2. Critères biologiques

Le diagnostic biologique d'UB sera posé si au moins deux des quatre critères suivants s'avèrent positifs. Il s'agit de l'examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen (ZN), la culture *in vitro*, l'analyse histopathologique et la PCR spécifique de *M. ulcerans*. Le tableau 2.2 présente un résumé de ces différents éléments du diagnostic biologique.

Tableau 2.2 : Eléments du diagnostic biologique de l'UB

Critères microbiologiques	Eléments de diagnostic
Examen direct après coloration de ZN	Présence de BAAR
Culture	Positive à <i>M. ulcerans</i> : culture lente, à 32°C, scotochromogène, résistante à l'isoniazide.
Aspect histopathologique	Nécrose extensive, panniculite, cellules graisseuses fantômes, vascularite, amas de BAAR.
PCR spécifique de <i>M. ulcerans</i> (IS2404)	Obtention d'un amplicon de taille attendue.
PCR en temps réel	Obtention d'un amplicon de taille attendue suivie d'une quantification (Fyfe; 2007)

2.1.6.3. Diagnostic radiologique (Asiedu; 2000).

- La radiographie montre fréquemment une calcification de la graisse sous-cutanée.
- Les atteintes osseuses peuvent également être détectées par radiographie (Pszolla; 2003).

2.1.6.4. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel de l'UB comprend plusieurs affections (Guédénon et Portaels; 2000). Ainsi :

a) Devant un nodule

Il faut éliminer:

- Une piqûre d'insecte

- Un furoncle, un anthrax, un abcès
- Un kyste sébacé
- Un érythème noueux
- Une hidrosadénite
- Des myiases furonculoïdes
- Un nodule douloureux de l'oreille
- Un lipome
- Un nodule onchocerquien
- La forme nodulaire de leishmaniose
- Un granulome à corps étranger
- Un dermato fibrome
- Les gomes: sporotrichose, actinomycose, pyococcie froide, syphilis tertiaire, tuberculose

b) Devant un œdème

Il faut éliminer

- Une cellulite cutanée infectieuse
- Des traumatismes
- Des ostéomyélites à staphylocoques, streptocoques ou salmonelles
- Une insuffisance rénale, une insuffisance cardiaque, une anémie, une malnutrition
- Un œdème kaposien, une compression lymphatique

c) Devant un placard

Il faut éliminer

- Un érysipèle
- Un hématome
- Un lupus tuberculeux
- Une urticaire
- Un psoriasis
- Une mycose
- Un eczéma
- Une sarcoïdose

d) Devant un ulcère

Il faut éliminer

- Un ulcère phagédénique
- Un ulcère d'origine veineuse
- Un ulcère d'origine artérielle
- Une tuberculose cutanée ulcérée
- Une histoplasmosse africaine
- Une fasciite nécrosante
- Une sporotrichose
- Un carcinome ou un mélanome ulcéré
- Une leishmaniose cutanée
- Un ulcère drépanocytaire

e) Devant une cicatrice

Il faut éliminer

- Une cicatrice dystrophique de brûlure
- Une ankylose secondaire à une tuberculose cutanée ou osseuse.

2.1.7. Traitement de l'UB: historique

2.1.7.1. Le traitement chirurgical

Le traitement de l'UB est resté longtemps dans le domaine de la chirurgie (Cornet; 1992, Ouattara; 2004, Aguiar; 1997). Ainsi, suite à l'ampleur de l'UB, l'OMS décide de publier un ouvrage sur la prise en charge de l'UB basée essentiellement sur la chirurgie (OMS; 2001). L'essentiel de ce traitement est résumé dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Traitement spécifique de l'UB

Formes cliniques	Traitement spécifique
Nodule	Excision de la lésion et suture primitive.
Plaque	Excision plus autogreffe cutanée
Œdème	Excision suivie de greffe cutanée
Ulcère évolutif	Ablation des tissus suivie de greffe cutanée après formation du tissu de granulation
Ulcère avec atteinte osseuse	Ablation des tissus nécessitant parfois une amputation
Ostéomyélite	<ul style="list-style-type: none"> - Excision large des tissus mous infectés. - Curetage des foyers osseux - Enlèvement d'éventuels séquestres et application des greffes dermo-épidermiques minces

Malgré les recommandations de l'OMS faisant du traitement chirurgical un traitement de choix, des cas de rechute sont enregistrés: 17% de rechute sur une série de 346 patients traités chirurgicalement en Côte d'Ivoire (Kanga; 2003), 6,1% de rechute avec un recul allant jusqu'à 7 ans, après traitement d'UB par la chirurgie au CSNG au Bénin de 1989 à 2001 (Debacker; 2005).

Entre 2001 et décembre 2002 plusieurs essais cliniques ont été menés incluant des antibiotiques antimycobactériens dans le traitement de l'UB. Ainsi l'essai clinique mené au Ghana, sous la direction de l'OMS avait conclu que le traitement antibiotique associant rifampicine (R) et streptomycine (S) est efficace sur les formes précoces de la maladie pourvu qu'il soit administré pendant 8 semaines (Grosset; 2004). En effet, les antibiotiques antimycobactériens sont actifs *in vitro* (Portaels; 1998, Almeida; 2011) ainsi que sur des souris infectées expérimentalement par *M. ulcerans* (Bentoucha ; 2001).

Au Ghana, des observations cliniques ont montré des résultats prometteurs sur les formes précoces d'UB (Etuafu; 2005) ainsi qu'au Bénin sur les formes ulcératives et non ulcératives (Chauty; 2007) chez les patients traités par le protocole de l'OMS (WHO; 2004). Mais les résultats du Bénin montrent également que les ulcères plus étendus (≥ 15 cm) ont moins bien répondu au traitement médical (R et S) seul, comparativement aux formes non ulcératives ($P=0,0146$) et que le traitement de ces ulcères de diamètre ≥ 15 cm a nécessité le recours à la

chirurgie dans 73% de cas contre 17% pour les ulcères de diamètre ≤ 5 cm (Chauty; 2007, Kibadi; 2010).

Suite à ces résultats encourageants, l'OMS recommande depuis 2004 l'utilisation de l'association rifampicine-streptomycine associée ou non à la chirurgie suivant les cas (WHO; 2004). La chirurgie ne peut cependant être réalisée que dans certains centres médicaux disposant d'un plateau technique adéquat et de personnel spécialisé. Pour les malades, ce traitement paraît coûteux et pourvoyeur de mutilations diverses, voire des amputations (van der Werf; 2005).

2.1.7.2. Le traitement médicamenteux

Au regard des nombreux problèmes qui s'associent aux interventions chirurgicales comme l'incapacité physique définitive, les cicatrices inesthétiques, les surinfections, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité des médicaments antimycobactériens notamment sur les stades non ulcératifs et ulcératifs précoces de la maladie (Asiedu; 2000).

2.1.7.2.1. Drug Susceptibility Test (DST)

L'efficacité de plusieurs antibiotiques antimycobactériens a été testée *in vitro* sur diverses souches de *M. ulcerans*. Le tableau 2.4 ci-dessous reprend certains de ces antibiotiques ainsi que leur concentration minimale inhibitrice (CMI).

Tableau 2.4 : Antibiotiques efficaces *in vitro* sur *M. ulcerans*

Antibiotique	Milieu de culture utilisé	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Souche	Références
Clarithromycine	7H11	0.125 à 2 à pH 6.6 <0.125 à 0.5 à pH 7.4	ATCC 19423	Portaels;1998
Moxifloxacin (MXF), Streptomycin (S), Rifampin (R) Amikacin (AMK), Linezolid (LZD),	7H11	R: MIC ₉₀ =2.0 S: MIC ₉₀ =0.5 AMK:MIC ₉₀ =2.0 MXF:MIC ₉₀ =0.5 LZD : MIC ₉₀ =2.0	ATCC 19423	Ji;2006
Rifampicine Amikacin Ofloxacin Ciprofloxacine Sparfloxacine (SPAR)	7H11	0.1-2 0.25-1 1-2 0.25-1 0.1-0.5	Souches isolées de lésions cliniques	Thangaraj; 2000

2.1.7.2.2. Antibiotiques actifs sur *M. ulcerans* chez l'homme

Le tableau 2.5 ci-dessous présente les résultats des études cliniques obtenus chez l'homme et publiés durant ces dix dernières années et la figure 2.2 montre la structure chimique des deux antibiotiques majeurs utilisés: la streptomycine et la rifampicine.

Tableau 2.5 : Antibiotiques actifs sur *M. ulcerans* chez l'homme

ANTIBIOTIQUES/ AUTRES MEDICAMENTS	FORME CLINIQUE	NOMBRE DE PATIENTS	Confirmation par test de laboratoire	DUREE TRAITEMENT	CHIRURGIE	Résultats	REFERENCES
Rifampicine (R) Clarithromycine (CL) Ciprofloxacine(Cip) Rifabutinne (Rib)	Ulcère	1	Oui	2mois: R+CL résistance à R d'où: 5 semaines: CIP+ Rib	Non	Guérison de l'ulcère	Faber; 2000
Rifampicine Enoxaparine (Enox)	Œdème du visage	1	Oui	12 mois: R 3 mois: Enox	Oui mais esthétique	Guérison	Kanga; 2001
Rifampicine Dapsone	Ulcère	15	Oui	2mois	Non	82% des ulcères ont connu une amélioration: diminution de taille de 14 cm ² sous antibiotiques	Espey; 2002
Rifampicine Ofloxacin (Oflox) Enoxaparine	Toutes formes cliniques	157	Non	3 à 6 mois: R et Oflox 2 mois: Enox	Non	Résultats fonction forme clinique	Kanga; 2004

ANTIBIOTIQUES	FORME CLINIQUE	NOMBRE DE PATIENTS	Confirmation par test de laboratoire	DUREE DU TRAITEMENT	CHIRURGIE	Résultats	REFERENCES
R, Isoniazide (INH) Ethambutol (EMB) S, Pyrazinamide (P) Levofloxacin (Lev)	Ulcère	2	Oui	1er cas 1er mois: R+INH puis 2ème mois: EMB+S 2ème cas 2 mois: P+ INH + S + Lev Puis S+EMB puis 10mois: R+EMH	Non Oui	Guérison	Coloma; 2005
Streptomycine Rifampicine	Nodule Plaque de moins de 10 cm	16	Oui	2 à 12 semaines	Oui	Culture négative à 4 semaines d'antibiothérapie Réduction de la taille des lésions	Etuaful; 2005
Streptomycine Rifampicine	Ulcère Nodule, plaque, œdème	219	Oui Non	12 semaines	Oui: 83 Non: 122	96% de guérison Parmi eux 98 patients sans chirurgie.	Chauty;2007
Streptomycine Rifampicine	Ulcère	92	Oui	12 semaines	4 semaines après début traitement	Taux de guérison: 92.4% (85 patients/92)	Kibadi; 2010
Streptomycine Rifampicine Clarithromycin (Cl)	Plaque Nodule Ulcère Oedème	151	Oui	Groupe I: 8 semaines S +R Groupe II: 4 semaines S+R puis 4 semaines R+ Cl	Oui/Non	Groupe I: 73 guéris dont une chirurgie Groupe II: 68 guéris dont une chirurgie	Nienhuis; 2010

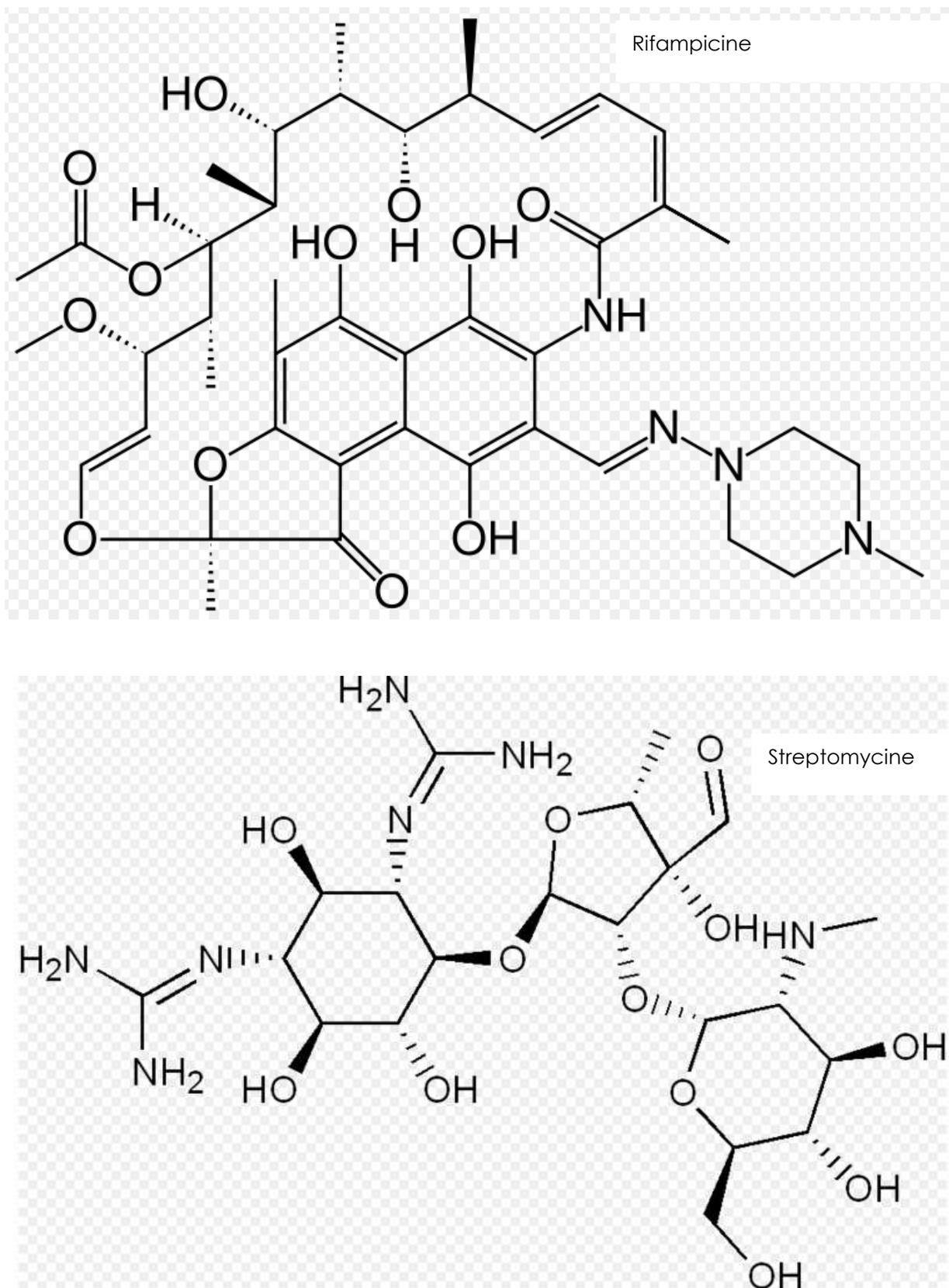


Figure 2.2: Structure chimique de la rifampicine et de la streptomycine

2.1.7.3. *La réadaptation*

Elle débute au lit du malade. Elle prévient l'apparition des séquelles telles que les rétractions musculaires ou tendineuses, les attitudes vicieuses en flexion ou en hyper extension. La réadaptation est un traitement adjuvant au traitement chirurgical.

2.1.7.4. *Traitements liés aux caractéristiques de M. ulcerans*

2.1.7.4.1. *Thermothérapie* (Meyers; 1974, Junghanss; 2009)

La sensibilité à la chaleur de *M. ulcerans* a conduit à envisager l'utilisation des températures élevées pour traiter les lésions d'étendue limitée. La guérison de ces lésions est favorisée par la réalisation d'un échauffement local continu à 40° C pendant plusieurs semaines.

2.1.7.4.2. *Traitement de l'UB par des agents chimiques* (Philips; 2004)

L'étude montre que *M. ulcerans* est très sensible *in vitro* à l'action de l'acide nitrique.

2.1.7.5. *Traitement traditionnel de l'UB*

Le traitement traditionnel pour des raisons aussi bien culturelles qu'économiques, est le premier recours qui s'offre aux malades d'UB qui sont en général pauvres (Guédénon; 1995). Malgré son importance pour les malades, il est peu documenté.

1995 : Guédénon et al au Bénin ont décrit la technique d'une tradithérapeute du sud Bénin, qui, à l'aide d'une préparation à base de savon et antibiotiques, arrivait à extraire la graisse nécrosée chez les patients d'UB. Un petit nombre de ses patients ont été guéris, mais avec de graves séquelles.

2004 : Johnson et al ont identifié quatre étapes dans la prise en charge de l'UB dans une étude réalisée dans la commune de Lalo au Bénin. Ces quatre étapes sont: le diagnostic de la maladie, l'ablation des tissus nécrosés, le nettoyage de la plaie et l'exorcisme.

➤ Diagnostic traditionnel de la maladie

Sur la base des nombreuses expériences acquises, les tradipraticiens sont capables de poser le diagnostic. Les termes utilisés en milieu «fon» et «mahii» au Bénin pour désigner l'UB sont: «ouévikpa» ce qui signifie «la plaie causée par les vers», «djomakou» qui signifie «la plaie qui ne guérit pas» (Aujoulat; 2003). En milieu «holli», l'UB est désigné par le terme «tefoun-tefoun», terme qui fait référence à l'aspect cotonneux de la base nécrotique d'un ulcère non traité (Guédénon; 1995).

Les appellations de l'UB dans les différents pays endémiques d'Afrique et leurs significations apparaissent semblables, mises à part les appellations liées à l'origine géographique de la maladie (Kibadi; 2007): au Cameroun: «atom» signifie «une plaie qui ne guérit pas»; au Congo: «muanza» signifie «plaie incurable due au mauvais sort», «plaie des attaques des sorciers», «kinkanda» se rattache à une «plaie incurable due au mauvais sort qui s'accroche à sa proie à l'instar d'un singe appelé «kinkanda»; en Côte d'Ivoire: «kani pli» signifie «plaie chronique qui fait peur provenant des sorciers, du mauvais sort» et «djori bélébéléba» «plaie chronique due à une malédiction reconnue par son odeur, son aspect»; au Ghana: «hella gbonyo » signifie «vilaine maladie», «kokoram ebo» signifie «qui prend le contrôle du corps, saisit tout le corps», «kessi kuro» signifie «plaie chronique», «aboa gbonyo » décrit la nature redoutable de la maladie. En Ouganda, l'UB se nommait anciennement «juwe okoro» ou «bibi okoro» qui signifiait «plaie incurable». Actuellement la maladie se nomme «lupi lupi» qui signifie «plaie qui ne guérit jamais». La même appellation de l'UB et sa signification se retrouvent également au Sud Soudan. En RDC, les dénominations de l'UB suivantes se rattachent actuellement à l'incurabilité et à la sorcellerie : «mbasu» signifie «plaie chronique due aux attaques des sorciers», «phuta luzingu» signifie «plaie incurable ou plaie de toute la vie», «kinvea» signifie «plaie des attaques des sorciers, des fétiches», «ksüng» signifie «plaie qui ne guérit pas, des attaques des sorciers»; au Togo, la dénomination «abi, abidze makou» signifie «plaie chronique».

Ces différentes appellations montrent que l'UB est une maladie bien connue des populations dans les régions où la maladie est fréquente.

➤ Ablation des tissus nécrosés

C'est une étape reconnue par tous les guérisseurs traditionnels. En Fon, la nécrose est appelée «aho» (Guédénon; 1995). L'ablation de la nécrose s'effectue de deux manières: soit par application de cataplasme de feuilles variées sur la partie malade, soit de façon mécanique au moyen de lame ou de ciseaux.



Figure 2.3 : Ablation de la nécrose par application de cataplasme (Photo: Dossou; 2005).

➤ Soins de la plaie

Cette étape est relativement plus aisée. Les tradipraticiens utilisent tous les produits qui peuvent permettre de guérir une plaie.

➤ Exorcisme

C'est la dernière étape du traitement traditionnel de l'UB. L'exorcisme découle des considérations sociologiques de la maladie. En effet, l'UB est considéré par certaines populations comme une maladie provoquée. D'autres semblent croire que la maladie est d'origine naturelle, mais empire sous l'action conjuguée de la sorcellerie (Guédénon; 1995, Kibadi; 2007).

Pour les tradipraticiens, l'exorcisme est destiné à «remercier les ancêtres pour avoir facilité la guérison». Ainsi, ils immolent des poulets et des cabris selon la gravité de la maladie et la durée du traitement.



Figure 2.4 : UB sous traitement traditionnel (Photo: Dossou; 2005).

La représentation populaire de l'UB explique aussi les sortes de recours effectués par les malades (Kibadi; 2004). Ainsi quatre types de recours thérapeutiques ont été identifiés dans la zone de santé rurale de Nsona-Mpangu (Bas-Congo) en RDC (Kibadi; 2009) :

- L'automédication: les patients ou leurs parents utilisent des médicaments allopathiques de la médecine conventionnelle tels que: antibiotiques non-spécifiques, anti-inflammatoires, antiseptiques locaux sans prescription médicale. Les soins sont effectués à la maison.
- L'église: le patient ou ses parents vont à l'église dans le but de faire disparaître les lésions par les prières.
- Le centre de santé: deux possibilités de recours au centre de santé ont été identifiées par l'étude à ce niveau: un mauvais diagnostic (fait en général par les infirmiers) et la prescription d'un traitement non spécifique ou un bon diagnostic suivi d'une meilleure prise en charge.
- Le traitement traditionnel: le patient ou sa famille peut solliciter l'aide d'un tradithérapeute ou d'une «personne douée» afin d'obtenir un traitement qui comprend généralement des cataplasmes d'herbes et de feuilles sur la plaie. Les plaies sont traitées avec des solutions telles que l'eau salée ou de l'huile de palme. Ce traitement est parfois associé à des tabous alimentaires: viande de porc par exemple.

2.1.7.6. Traitement préventif de l'UB

Aucun traitement préventif n'est actuellement disponible. Toutefois l'efficacité de la vaccination BCG a été démontrée dans la prévention des complications osseuses de l'UB (Portaels; 2004).

La lutte contre l'UB passe également par :

- des campagnes d'information à l'endroit des populations.
- la création d'un système de surveillance à base communautaire.
- La mise en place d'un système décentralisé pour l'administration de l'antibiothérapie spécifique.
- la mise en place d'un système accessible pour l'excision de toutes les lésions dermiques suspectes avant l'ulcération.
- l'installation de puits dans les communautés.
- l'assainissement du milieu, le port de vêtements protégeant les membres inférieurs et de bottes au cours des travaux champêtres.

2.1.8. Situation de l'UB au Bénin

L'UB constitue un problème de santé publique dans certaines localités situées près des cours d'eau, des lacs, et des marais des départements du Mono, du Couffo, de l'Atlantique, du Littoral, de l'Ouémé, du Plateau, du Zou et des Collines (Johnson; 2005, Sopoh; 2011).

De 1989 à 2004, près de 6100 cas cumulés ont été détectés (données cumulées du PNLUB). L'analyse selon l'âge, montre que les personnes âgées de moins de 15 ans représentent 52 % des cas contre 33% pour les personnes âgées de 15 à 49 ans et 15 % pour celles de plus de 49 ans.

Certaines communes (Lalo dans le département du Mono-Couffo), Ouinhi (dans le département du Zou), Zê (Département de l'Atlantique) et Adjohoun, Bonou, et Dangbo (département Ouémé) connaissent des taux d'endémicité croissants d'année en année (Sopoh; 2011).

Actuellement il existe quatre centres qui s'occupent du dépistage et du traitement de l'UB au Bénin :

- le CSNG de Zagnanado (Département du Zou).
- le Centre de Santé de Lalo (Département du Couffo).
- le CDTUB d'Allada (Département de l'Atlantique).
- le CDTUB de Pobè (Département du Plateau).

A côté de ces centres, on a aussi l'hôpital «La Croix» de Zinvié (département de l'Atlantique) qui apporte ses prestations aux patients. Ces centres reçoivent l'appui du PNLUB.

III.

*IDENTIFICATION DES PLANTES
UTILISEES POUR TRAITER L'UB
DANS LA LOCALITE DE OUINHÍ*

3.1. INTRODUCTION

La plupart des composantes entrant dans le traitement traditionnel de l'UB appartiennent au règne végétal mais sont peu connues. C'est dans le but d'identifier les plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB et de caractériser les grands groupes de substances chimiques contenus dans ces plantes que la présente étude a été réalisée.

3.2. CADRE D'ETUDE

L'étude s'est déroulée au Bénin dans la commune de Ouinhi dans le département du Zou. La commune de Ouinhi (Figures 3.1 et 3.2) couvre une superficie de 483 km² avec une population estimée à 38319 habitants en 2005 (Données de l'Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique: INSAE; 2010). Son système sanitaire comporte un Centre de Santé de Commune (CSC) et quatre Centres de Santé d'Arrondissement (CSA).

Ouinhi se situe dans une dépression argilo-marneuse marquée par une plaine d'inondation (Adjanooun; 1989). La végétation est constituée de mosaïques de cultures et de jachères, de savanes à emprise agricole et de savanes marécageuses. Ce biotope est très favorable au développement de *M. ulcerans*. En effet, Ouinhi constitue un foyer d'UB à forte endémicité: en 1997, on a noté 73 cas. Ce chiffre est le deuxième après Zagnanado (76 cas). En 2001, on a noté 32 cas, contre 52 cas pour Zagnanado qui vient toujours en première position dans le département du Zou (Debacker; 2004).

Identification des plantes

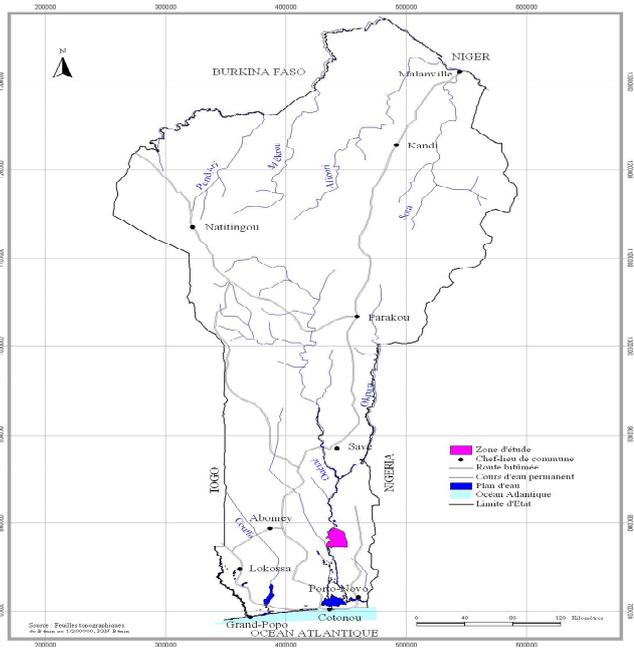


Figure 3.1 : Carte du Bénin situant la zone d'étude (commune de Ouinhi).

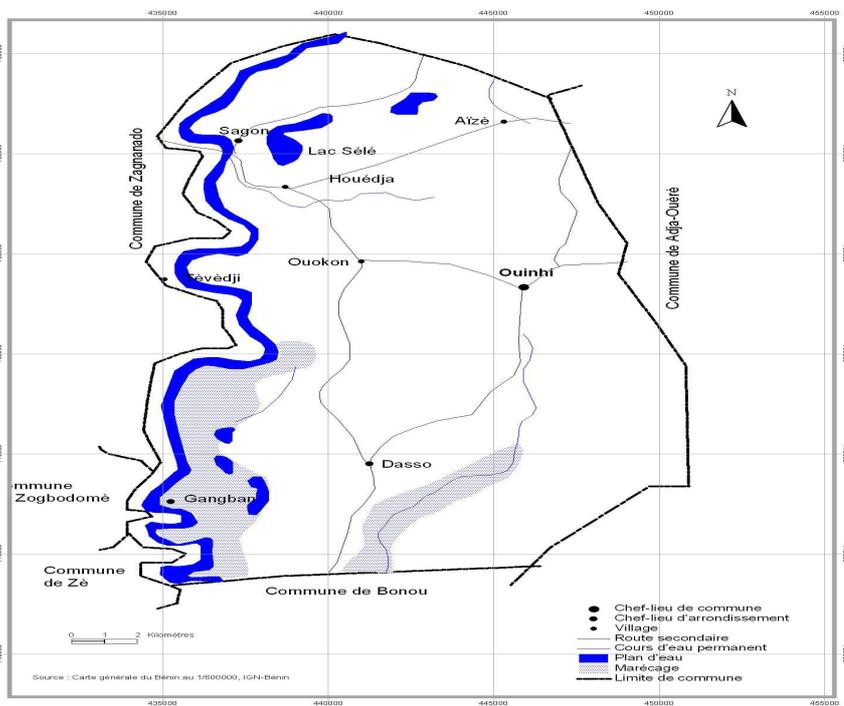


Figure 3.2 : Carte de la commune de Ouinhi.

3.3. MATERIELS ET METHODE

3.3.1. Nature de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale qualitative effectuée en deux phases:

- une phase préparatoire allant de février à avril 2005 pour la phase prospective et la prise de contact avec les autorités, l'édition d'une fiche d'enquête en collaboration avec le coordonnateur du PNLUB et le pré-test.
- une phase d'enquête proprement dite allant d'avril à octobre 2005 pour l'enquête ethnobotanique, la récolte des plantes et l'identification, le traitement des données et l'analyse phytochimique.

3.3.2. Population d'étude

L'étude porte sur dix-sept (17) tradipraticiens de la commune de Ouinhi et sur les plantes médicinales qu'ils utilisent pour traiter l'UB.

3.3.3. Collecte de données

3.3.3.1. L'enquête ethnobotanique.

Afin de mettre en confiance les cibles de l'enquête et assurer la fiabilité des informations à recueillir, l'enquête ethnobotanique a nécessité une phase de préparation du terrain. A cet effet, des rencontres et discussions avec des tradipraticiens de la commune de Ouinhi et le médecin-chef du CSC ont été effectuées.

Pour l'enquête ethnobotanique proprement dite, un questionnaire a été adressé aux tradipraticiens. Il renferme des questions relatives aux informations botaniques, ethnobotaniques et ethnopharmacologiques. Il a été procédé à une enquête individuelle et les informations reçues ont été notées. Ainsi, à l'aide de guides ayant une connaissance des plantes et de botanistes, les plantes indiquées par les tradipraticiens ont été systématiquement photographiées et des échantillons représentatifs ont été récoltés en vue de leur identification.

Ont été inclus dans l'étude: les tradipraticiens résidant dans la commune de Ouinhi, ayant des connaissances sur l'UB ainsi que sur son traitement traditionnel et ayant traité et gardé chez eux plusieurs cas d'UB.

3.3.3.2. Récolte des échantillons

La position spatiale de l'espèce végétale est d'abord déterminée grâce à un G.P.S (Global Positioning System). Les plantes herbacées sont récoltées entières, avec, si possible, fleurs et fruits. Pour les arbres et arbustes, un rameau feuillé avec fleurs et fruits est coupé. La récolte d'un fragment d'écorce est souvent nécessaire pour faciliter l'identification.

Lorsque les échantillons sont trop longs (exemple: Poaceae de savanes), on récolte les parties fructifiées, les feuilles supérieures et les feuilles inférieures ainsi que les fragments caractéristiques des racines.

Les fleurs délicates sont étalées au moment de la récolte entre deux morceaux de papier humide. Les plantes aquatiques sont récoltées en masse dans du papier humide.

Au moment de la récolte, la date de récolte, la localité, la station (savane, forêt, prairie), la couleur des fleurs, le nom scientifique et si possible le nom vulgaire sont répertoriés; un numéro est ensuite attribué à chaque échantillon.

3.3.4. Identification des espèces végétales

L'herbier national du Bénin et le laboratoire d'écologie appliquée de la faculté des sciences agronomiques de l'université d'Abomey Calavi se sont chargés de l'identification à partir des échantillons récoltés: numéro d'herbier, nom de la famille, nom latin, nom français et nom vernaculaire.

3.3.5. Traitement des données: analyse statistique

L'analyse statistique est faite à l'aide du logiciel <SPSS for windows> version 11.5. Pour l'analyse des données, le taux d'utilisation (t) de chaque plante est calculé comme suit :

$$t = \frac{\text{Nombre d'utilisateurs d'une plante donnée} \times 100}{\text{Nombre total d'utilisateurs}}$$

3.4. RESULTATS

3.4.1. L'enquête ethnobotanique

Au terme de l'enquête, 49 plantes différentes sont identifiées. Elles appartiennent à 32 familles. Le tableau 3.1 liste les plantes utilisées, leurs formes biologiques, la partie utilisée ainsi que le mode d'utilisation. Différentes parties de ces plantes sont utilisées sous diverses formes de préparations telles que: décoction, infusion, cataplasme, triturât, macérât, poudre. L'utilisation des plantes se fait principalement au cours des deuxième (l'ablation des tissus nécrosés) et troisième phases (nettoyage de la plaie) du traitement et se trouve être influencée par chacune de ces phases. En effet, *Kedrostis foedissima* (Jacq.) Cogn., *Eugenia aromatica* (L.) Baill., *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock, *Piper guineensis* Schum. et Thonn., et *Clausena anisata* (Wild.) Hook.f. se retrouvent uniquement au stade de soin de la plaie.

Erythrophleum suaveolens (Guill. et Perr.) Brenan et *Strophanthus hispidus* DC sont les deux plantes les plus utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB au Bénin.

Tableau 3.1 : Répertoire des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB au Bénin

Famille	Nom (genre et espèce)	Forme biologique	Partie utilisée	Mode d'utilisation
Anarcadiaceae	<i>Lannea kerstingii</i> (Engl.) K. Krause	Arbuste (3 à 8m)	Ecorce	Décoction
	<i>Spondias mombin</i> L.	Arbre (10 à 15m)	Feuille	Décoction
Annonaceae	<i>Xylopia aethiopica</i> (Dunal) A. Rich.	Arbre (20m)	Fruit	Décoction
	<i>Monodora myristica</i> (Gaertn) Dunal	Arbre (25m)	Graine	Décoction
Apocynaceae	<i>Strophanthus hispidus</i> DC.	Arbuste sarmenteux	Racine	Décoction; Macéré
	<i>Holarrhena floribunda</i> (G.Don) T. Durand et Schinz	Arbre	Feuille	Décoction
Araceae	<i>Anchomanes difformis</i> (Bl.) Engl.	Herbe géophyte à gros rhizome	Racine	Décoction
Asteraceae	<i>Launaea taraxacifolia</i> (Wild.) Amin	Herbe érigée, rhizomateuse	Feuille	Décoction
	<i>Vernonia amygdalina</i> L.	Arbuste (3 à 8m)	Feuille	Bandage
Bignoniaceae	<i>Spathodea campanulata</i> P. Beauv.	Arbre (10 à 25m)	Ecorce, Racine	Infusion
	<i>Stereospermum kunthianum</i> Cham.	Arbuste (5 à 12m)	Ecorce	Infusion
	<i>Newbouldia laevis</i> (P. Beauv.) Seem.	Arbuste (3 à 12m)	Racine	Trituration
Caesalpinaceae	<i>Erythrophleum suaveolens</i> (Guill. et Perr.) Brenan	Arbre (15 à 35m)	Ecorce, Racine	Trituration, Décoction
	<i>Piliostigma thonningii</i> (Schum.) Milne-Redh.	Arbuste (5 à 10m)	Feuille	Décoction
Capparaceae	<i>Ritchiea capparoides</i> (Andrews) Britten	Arbuste sarmenteux (1 à 6m)	Racine	Macération
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Plante annuelle ou vivace (1m)	Feuille	Macération
Clusiaceae	<i>Garcinia kola</i> Heckel	Arbre (10 à 18m)	Racine	Pulvérisation, Infusion

Tableau 3.1 (suite). Répertoire des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

Famille	Nom (genre et espèce)	Forme biologique	Partie utilisée	Mode d'utilisation
Combretaceae	<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. et Perr.	Arbre (15 à 20m)	Feuille, Racine	Décoction
	<i>Terminalia glaucescens</i> Planch.	Arbuste (8m)	Ecorce Racine	Décoction
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	Plante crassulescente	Feuille	Pulvérisation
Cucurbitaceae	<i>Kedrostis foedissima</i> (Jacq.) Cogn.	Liane herbacée annuelle, grimpante ou rampante	Feuille	Trituration
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia kamerunica</i> Pax.	Arbuste cactiforme	Ecorce	Trituration
	<i>Hymenocardia acida</i> Tul.	Arbuste de (4m)	Ecorce	Pulvérisation, décoction
	<i>Bridellia ferruginea</i> Benth.	Arbuste (1 à 8m)	Ecorce	Trituration
	<i>Euphorbia unispina</i> N.E.Br.	Plante charnue (0,5m)	Feuille, Tige	Macération
	<i>Jatropha curcas</i> L. <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Arbuste (3 à 4m) Arbuste sous ligneux buissonnant	Feuille	Décoction, Pulvérisation Décoction, Pulvérisation
Fabaceae	<i>Lonchocarpus cyanescens</i> (Schum. et Thonn.) Benth.	Arbuste sarmenteux	Racine	Macération
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Abrisseau odoriférant, peu lignifié	Feuille	Infusion
	<i>Ocimum canum</i> Sims	Plante herbacée odoriférante	Feuille	Infusion
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Herbe vivace croissant en touffe	Bulbe	Infusion
	<i>Aloë buettneri</i> A. Berger	Plante herbacée		Macération
Melastomataceae	<i>Dissotis rotundifolia</i> (Sm.) Triana	Plante herbacée rampante, vivace	Feuille	Décoction
Mimosaceae	<i>Tetrapleura tetraptera</i> (Schum. et Thonn.) Taub.	Arbre (15 à 20m)	Fruit	Macération
Moraceae	<i>Ficus exasperata</i> Vahl	Arbuste	Feuille	Latex

Tableau 3.1 (fin). Répertoire des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

Famille	Nom (genre et espèce)	Forme biologique	Partie utilisée	Mode d'utilisation
Musaceae	<i>Musa sinensis</i> Sag.	Herbe géante à bulbe ou rhizome	Tige	Macération
Myrtaceae	<i>Eugenia aromatica</i> (L.) Baill.	Arbre (10 à 15m)	Fruit	Décoction
Nyctagynaceae	<i>Boerhavia erecta</i> L.	Plante herbacée (0,40m)	Feuille, Racine	Décoction
Periplocaceae	<i>Parquetina nigrescens</i> (Afzel.) Bullock	Plante vivace à tiges volubiles, ligneuse à la base (7 à 8m)	Feuille	latex
Piperaceae	<i>Piper guineense</i> Schum. et Thonn.	Liane dioïque (0,20m)	Graine	Infusion
Poaceae	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Herbe annuelle ou pérenne (0,50m)	Plante entière	Pulvérisation
Polygalaceae	<i>Carpolobia lutea</i> G. Don.	Arbuste (4,5m)	Tige	Pulvérisation
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Arbuste (3 à 5m)	Fruit	Décoction
Sapindaceae	<i>Clausena anisata</i> (Wild.) Hook. f.	Plante suffrutescente (2m)	Racine	Infusion
	<i>Paullinia pinnata</i> L.	Liane ligneuse munie de vrilles ramifiées	Feuille	Trituration, Décoction
Sapotaceae	<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn.	Arbuste (9 à 12m)	Feuille	Décoction
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i> L.	Suffrutex (1,5m)	Fruit	Macération
Zingiberaceae	<i>Aframomum melegueta</i> K. Schum.	Plante herbacée poussant en touffes (1m)	Fruit	Carbonisation
	<i>Curcuma longa</i> L.	Géophyte rhizomateux	Feuille	Décoction

3.4.1.1. Mode d'emploi des différentes préparations.

- Les infusés ou tisanes sont utilisés comme boisson du malade et sont donc administrés par voie orale.
- Les décoctés sont utilisés en usage externe pour le lavage de la plaie.
- Certains macérés sont administrés par voie orale, d'autres sont utilisés pour le lavage de la plaie. Ils sont donc destinés à l'usage externe et interne.
- Les poudres sont utilisées en usage externe. Elles sont saupoudrées dans la plaie après ablation de la nécrose, incorporées dans des cataplasmes ou dans des huiles végétales. Elles sont aussi utilisées par scarification ou ingérées par voie orale.
- Les liquides pour application locale obtenus après trituration sont utilisés en usage externe pour l'ablation des nécroses et pour le soin de la plaie.

3.5. DISCUSSION ET CONCLUSION

Selon les données que nous avons recueillies au cours de cette étude, différents extraits provenant des plantes sont administrés par les tradipraticiens per os et/ou localement sous forme d'associations diverses, sans tenir compte des problèmes de toxicité et ou d'interactions. Ceci rejoint plusieurs autres études réalisées sur les traitements traditionnels en Afrique et qui ont fait état de problèmes similaires (Pousset; 2004). Ces formes d'associations diverses pourraient éventuellement causer des échecs thérapeutiques voire des accidents. Il ressort de cette analyse, l'intérêt d'une standardisation des remèdes traditionnels à base de plantes. Par ailleurs, il existe une nécessité urgente d'études toxicologiques et pharmacologiques sur ces remèdes.

En 2000, Neuwinger rapporte que le décocté de l'écorce d'*Erythrophleum suaveolens* (Guill et Perr.) Brenan est utilisé traditionnellement en Afrique pour traiter la tuberculose et la lèpre. Cette décoction est administrée sous forme de tisane par voie orale pour traiter la tuberculose et est utilisée en bain dans le cas de la lèpre. Cette plante est également utilisée dans notre étude par voie orale sous forme de décoction et par voie externe sous forme de macération et de pulvérisation. Nous faisons un rapprochement entre ces deux usages car ces trois maladies (tuberculose, lèpre, UB) sont toutes causées par des mycobactéries.

Le traitement traditionnel de l'UB au Bénin se fait principalement à base de plantes. Selon une étude réalisée aux Etats unis, 61% des molécules chimiques isolées et introduites comme médicaments entre 1981 et 2002 dans le monde entier proviennent de produits naturels (Newman; 2003). Les plantes constituent alors une riche source de nombreux composés ayant des activités biologiques (Heinrich; 2001).

Ainsi, étant donné qu'au Bénin comme dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest tel le Ghana, la majorité des patients atteints d'UB consultent en premier lieu un tradipraticien, la phytothérapie pourrait être alors explorée pour renforcer l'arsenal thérapeutique de l'UB.

L'étape suivante de ce travail est de tester *in vitro* sur *M. ulcerans* les extraits des plantes répertoriées à l'issue de l'enquête ethnobotanique réalisée afin d'étudier leurs effets.

IV.
ETUDE DE L'ACTIVITE IN VITRO SUR
M. ULCERANS DES EXTRAITS HYDRO
ETHANOLIQUES DES PLANTES
IDENTIFIEES : MISE AU POINT DE LA
METHODE

4.1. INTRODUCTION

Dans le but d'effectuer un criblage mycobactériologique, il est indispensable d'utiliser un test *in vitro* qui est simple, rapide, sensible et abordable financièrement.

Les antibiogrammes effectués sur LJ nécessitent un temps d'incubation long et parfois des quantités élevées de produits à tester. Lorsqu'on utilise le milieu de culture 7H11, cela nécessite un incubateur à CO₂ car *M. ulcerans* est un germe qui se cultive bien en microaérophilie. Il en est de même lorsque nous utilisons le système BACTEC 460 (microaérophilie: 2.5 to 5% d'oxygène). Ce dernier utilise des équipements lourds et très chers.

Nous nous sommes alors focalisés sur le test REMA (Resazurin Microtiter Assay) pour effectuer le criblage des extraits des plantes répertoriées et identifiées dans le chapitre précédent (Chapitre III). Il s'agit d'une technique qui aurait été développée pour analyser l'effet des antibiotiques (médicaments antituberculeux par exemple) (Palomino; 2002, Martin; 2007, Martin; 2003, Rivoire; 2007) ou des produits naturels (Sarker; 2007, Leitao; 2008, Ramos; 2008) sur divers germes que nous avons dû modifier et adapter pour tester des extraits de plantes sur *M. ulcerans*.

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. Matériels végétaux

Ils sont constitués des drogues végétales (feuille, écorce, racine, tige, plante entière) de quarante quatre (44) des quarante neuf plantes identifiées et répertoriées. Les extractions des drogues végétales ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacognosie et des Huiles Essentielles (LAPHE) de l'université d'Abomey-Calavi (UAC; Bénin) et au Laboratoire de Pharmacognosie du «Louvain Drug Research Institute» (Université catholique de Louvain; Belgique). Les tests biologiques ont été réalisés au Laboratoire de Référence des Mycobactéries (LRM) du Centre National Hospitalier de Pneumo-phthisiologie (CNHP-P) à Cotonou et au laboratoire de mycobactériologie de l'Institut de Médecine Tropicale (IMT) d'Anvers.

4.2.1.1. Préparation des extraits

Les drogues végétales séchées des différentes plantes sont réduites en poudre par un pulvérisateur (National Mixer Grinder Mx-119N, Japan). 50g de chaque poudre ont été mis à macérer pendant 48h dans de l'éthanol 70% (w/v). Après filtration, le filtrat est concentré sous pression réduite à 40°C à l'aide du Rotavapor (Buchi Rotavapor R-200/205, Switzerland). Nous obtenons ainsi un extrait brut concentré. Ces extraits ont été lyophilisés (Labconco Freeze Dryer 4.5, Belgium) et conservés à 4°C.

4.2.1.2. Préparation des solutions d'extrait pour le test

Les solutions des extraits sont préparées dans du dimethyl sulfoxide (DMSO) à 40mg/ml. Plusieurs séries de dilutions sont ensuite réalisées avec de l'eau distillée stérile (EDS) et ensuite avec du milieu de culture 7H9 Middlebrook afin d'obtenir des solutions de travail à 1mg/ml. Ces solutions subissent une filtration stérilisante sur membrane millipore 0,2µm (Acrodisc, USA). Un contrôle expérimental est réalisé avec le DMSO seul à différentes concentrations afin de déterminer son effet inhibiteur ou non de la croissance *in vitro* de *M. ulcerans*. Les différentes concentrations des solutions d'extraits testées sont les suivantes: 250µg/ml; 125µg/ml; 62.5µg/ml; 31.25µg/ml; 15.62µg/ml; 7.81µg/ml.

4.2.2. Matériels biologiques

La souche biologique utilisée est la souche de *M. ulcerans* ATCC 19423 ayant un profil de sensibilité pharmacologique connu et ayant fait l'objet de plusieurs études de tests de sensibilité pharmacologique (Portaels; 1998, Palomino; 1998). Cette souche provient de la collection de mycobactéries du laboratoire de mycobactériologie de l'IMT d'Anvers. *M. ulcerans* étant classé «micro-organisme pouvant causer des maladies graves pour l'espèce humaine»; il constitue donc un danger pour les hommes directement exposés. Pour cela, toutes les manipulations ont été faites sous des postes microbiologiques de classe II avec port obligatoire de gants.

4.2.2.1. Préparation de l'inoculum

Des colonies fraîches de *M. ulcerans* ATCC 19423 sont prélevées à partir du milieu LJ et mises en suspension dans de l'EDS. La turbidité qui en résulte est ajustée avec de l'EDS jusqu'à avoir celle de la suspension standard qui est à 1mg/ml de *M. bovis* BCG (contenant approximativement 10^8 CFU per ml). Plusieurs dilutions sont réalisées à partir de cette suspension correspondant à la turbidité du standard: 10^{-1} et 10^{-2} mg/ml. 100 μ l de cette solution à 1mg/ml de *M. ulcerans* constituent l'inoculum.

4.2.2.2. Incubation

Les plaques sont incubées entre 30°C-33°C pendant 15 jours après les avoir emballées dans des sacs plastiques.

4.2.3. Sels Redox de resazurine

4.2.3.1. Principe

Le sel de resazurine (Acros Organic NV, Geel, Belgium) dont la structure est représentée à la figure 4.1 est un indicateur coloré de couleur bleue qui en présence de toute croissance bactérienne vire du bleu au rose.

La solution de resazurine est préparée à 0.02% (w/v) dans de l'EDS puis filtrée sur membrane millipore 0,2 μ m (Acrodisc, USA). Elle se conserve à 4°C pendant maximum 2 semaines. C'est cette solution qui est utilisée pour révéler les plaques après 15 jours d'incubation. Elle vire au rose en présence de croissance de *M. ulcerans*, ce qui traduit une inactivité de l'extrait testé à cette concentration. Mais garde sa couleur initiale bleue dans les puits où l'extrait de plante a inhibé la croissance de *M. ulcerans*. Ainsi, dans cette étude, la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une solution d'extrait de plante est sa plus faible concentration à laquelle il n'y a pas de croissance de *M. ulcerans*.

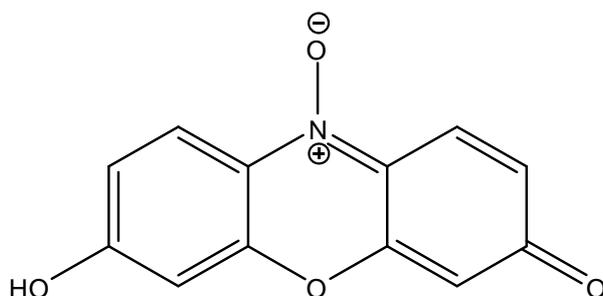


Figure 4.1: Structure chimique de la resazurine (C₁₂H₇NO₄).

4.2.4. Test Biologique

4.2.4.1. Préparation du milieu de culture 7H9

0,94 g de poudre de la base du milieu 7H9 sont solubilisés dans 180ml d'eau distillée.

Ajouter 1 ml de glycérol

Peser 0,2g de casitone et ajouter à la solution précédente. Mélanger jusqu'à la solubilisation complète. Chauffer le mélange si nécessaire.

Autoclaver le milieu dans un flacon de 250ml et laisser refroidir.

Ajouter ensuite 20ml d'OADC (acide Oléique Albumine Dextrose Catalase).

Incuber à 37°C pendant 24H pour contrôler la stérilité. Ensuite garder le milieu à 4°C à l'abri de la lumière.

4.2.4.2. Préparation de la plaque REMA

La plaque contient 96 puits (8 lignes numérotées A à H et 12 colonnes numérotées 1 à 12). Nous avons testé 9 extraits sur une plaque à deux reprises à des jours différents à 6 concentrations différentes.

- Distribuer 100µl du milieu 7H9 dans les puits des colonnes 2 à 10 (ligne B à G).
- Additionner 100 µl de la solution d'extrait N°1 dans le puits B2
- Additionner 100 µl de la solution d'extrait N°2 dans le puits B3
- Additionner 100 µl de la solution d'extrait N°3 dans les puits B4, ainsi de suite pour les solutions d'extrait et ce respectivement dans B5, B6, jusqu'à B10.

A l'aide d'une micropipette de 100µl procéder à des séries de dilutions de B à G. Après avoir mélangé dans le dernier puits, rejeter 100 µl du mélange. Changer de pipette en passant d'un extrait à l'autre.

Mettre 200 µl d'EDS dans les puits extérieurs (colonne 1, 12 ; ligne A ; ligne H).

Contrôle négatif : mettre uniquement 200 µl du milieu 7H9 dans les puits B11 ; C11 ; D11. Cela constitue également un test de stérilité.

Contrôle positif : mettre 100 µl du milieu 7H9 dans les puits E11 ; F11 ; G11.

Les concentrations finales des extraits de plantes testées sont respectivement en µg/ml : 250µg/ml ; 125µg/ml ; 62.5µg/ml ; 31.25µg/ml ; 15.62µg/ml ; 7.81µg/ml.

4.2.4.3. Inoculation des plaques.

Nous inoculons 100 µl de la solution à 1 mg/ml de *M. ulcerans* dans les puits contenant les extraits ainsi que dans les puits destinés au contrôle positif.

4.2.4.4. Addition de la resazurine

Après 15 jours d'incubation, nous ajoutons 30 µl de la solution aqueuse de resazurine à 0,02% (initialement bleue) dans le premier puits contrôle positif. Nous recouvrons à nouveau les plaques, les mettons à l'étuve à 30°C-33°C. On observe la coloration dans ce puits après 24 heures. L'apparition d'une coloration rose indique la croissance de *M. ulcerans*. Toute la plaque est ensuite révélée par addition de 30 µl de resazurine dans chaque puits et lue 24 heures plus tard. En l'absence de changement de couleur durant ces deux jours supplémentaires, les résultats sont non concluants. Les résultats sont interprétables et concluants si et seulement si les contrôles négatifs sont demeurés bleus et les contrôles positifs sont roses.

4.3. RESULTATS

Dans cette étude, les extraits de plantes dont la CMI est > 250 µg/ml sont considérés comme inactifs (Tosun; 2004). Les résultats du criblage mycobactériologique sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.1 : Résultats du criblage mycobactériologique

Voucher specimen	Famille	Nom scientifique	Drogue végétale	MIC (µg/ml)
Yemoa1	Anarcadiaceae	<i>Lannea kerstingii</i> Engl. et K. Krause	écorce	>250
Yemoa2	Anarcadiaceae	<i>Spondias mombin</i> Linn	feuille	> 250
Yemoa3	Annonaceae	<i>Xylopiæ aethiopica</i> (Dunal) A. Rich	fruit	>250
Yemoa4	Annonaceae	<i>Monodora myristica</i> (Gaertn) Dunal	graine	>250
Yemoa5	Apocynaceae	<i>Strophanthus hispidus</i> DC	racine	>250
Yemoa6	Apocynaceae	<i>Holarrhena floribunda</i> (G.Don) T.Durand et Schinz^(a)	feuille	125
Yemoa7	Araceae	<i>Anchomanes difformis</i> Engl	rhizome	> 250
Yemoa8	Asteraceae	<i>Launaea taraxacifolia</i> (Wild.) Schum	feuille	>250
Yemoa9	Asteraceae	<i>Vernonia amygdalina</i> Del	feuille	>250
Yemoa10	Bignoniaceae	<i>Spathodea campanulata</i> (P.Beauv)	écorce	> 250
Yemoa11	Bignoniaceae	<i>Stereospermum kunthianum</i> (Cham)	racine	>250
Yemoa12	Bignoniaceae	<i>Newbouldia laevis</i> (P.Beauv) Seeman	racine	>250
Yemoa13	Caesalpinaceae	<i>Erythrophleum suaveolens</i> (Guill et Perr.)	écorce	> 250
Yemoa14	Caesalpinaceae	<i>Piliostigma thonningii</i> (K.Schum.) Milne-Redh	feuille	> 250
Yemoa15	Capparaceae	<i>Ritchiea capparoides</i> (Andrews) Britten	racine	> 250
Yemoa16	Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> Linn	feuille	> 250
Yemoa17	Clusiaceae	<i>Garcinia kola</i> Heckel	racine	> 250
Yemoa18	Combretaceae	<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill et Perr	feuille	> 250
Yemoa19	Combretaceae	<i>Terminalia glaucescens</i> Planch	écorce/racine	> 250
Yemoa20	Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Okem	feuille	>250
Yemoa21	Cucurbitaceae	<i>Kedrostis foedissima</i> (jacq.) Cogn.	feuille	>250
Yemoa22	Euphorbiaceae	<i>Euphorbia kamerunica</i> Pax	écorce	>250
Yemoa23	Euphorbiaceae	<i>Hymenocardia acida</i> Tul	écorce	>250
Yemoa24	Euphorbiaceae	<i>Bridellia ferruginea</i> Benth	écorce	>250
Yemoa26	Euphorbiaceae	<i>Jatropha curcas</i> Linn^(a)	feuille	250
Yemoa27	Euphorbiaceae	<i>Jatropha gossypifolia</i> Linn	feuille	>250
Yemoa28	Fabaceae	<i>Lonchocarpus cyanescens</i> (Schumch et Thonn) Benth	racine	>250
Yemoa29	Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i> Linn	feuille	>250
Yemoa30	Lamiaceae	<i>Ocimum canum</i> Sims	feuille	>250
Yemoa31	Liliaceae	<i>Allium cepa</i> Linn	bulbe	>250
Yemoa32	Liliaceae	<i>Aloë buettneri</i> A. Berger	feuille	>250
Yemoa33	Melastomataceae	<i>Dissotis rotundifolia</i> (Sm.) Triana	feuille	>250
Yemoa34	Mimosaceae	<i>Tetrapleura tetraptera</i> (Schum. et Thonn)	fruit	>250
Yemoa35	Moraceae	<i>Ficus exasperata</i> Vahl.	feuille	>250
Yemoa37	Myrtaceae	<i>Eugenia aromatica</i> (Linn.) Baill	fruit	>250
Yemoa38	Nyctagynaceae	<i>Boerhavia erecta</i> Linn	feuille	>250
Yemoa39	Periplocaceae	<i>Parquetina nigrescens</i> (Afzel.) Bullock)	feuille	>250
Yemoa40	Piperaceae	<i>Piper guineense</i> (Schum. Et Thonn.)	graine	>250
Yemoa41	Poaceae	<i>Eleusine indica</i> Linn	plante	>250
Yemoa44	Rutaceae	<i>Clausena anisata</i> (Wild.) Hook.f	racine	>250
Yemoa45	Sapindaceae	<i>Paullinia pinnata</i> Linn	feuille	>250
Yemoa46	Sapotaceae	<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertner	feuille	>250
Yemoa48	Zingiberaceae	<i>Aframomum melegueta</i> K. Schum	fruit	>250
Yemoa49	Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i> L.	feuille	>250

(a) plantes actives

De l'analyse de ce tableau, il ressort que seules deux plantes inhibent la croissance de *M. ulcerans in vitro* à faible concentration: *H. floribunda* (G.Don) T. Durand and Schinz et *Jatropha curcas* Linn avec des CMI respectives de 125 et 250 µg/ml.

4.4. DISCUSSION

Pour des raisons de distribution, de disponibilité, de saison, certaines espèces de plantes n'ont pu être récoltées, donc non testées. De même, certaines espèces n'ont pu être testées parce que les solvants utilisés par les tradipraticiens dans leur usage sont difficiles à reproduire. Il s'agit par exemple de l'usage de l'urine humaine comme solvant pour réaliser des macérations. Au total 44 plantes sur les 49 identifiées ont été testées soit 90%.

Nous avons utilisé le «Resazurin Microtiter Assay: REMA» pour les tests de sensibilité car cette méthode est simple, rapide et permet d'éviter le chauffage des extraits. Ceci présente un intérêt pour les composés thermolabiles. La méthode conventionnelle dite «de proportion» utilisant le milieu de culture LJ n'est pas très adaptée à notre étude, d'une part parce que le délai d'obtention des résultats est long (42 à 56 jours); le long temps d'incubation pourrait être à l'origine de la dégradation de certains produits. De plus, le LJ contient des œufs et il est possible que la quantité de produit à tester disponible soit diminuée suite à une chélation avec les protéines ou autres composés des œufs. D'autre part parce que la mise au point du milieu et l'incorporation des extraits à tester nécessitent un chauffage à 85 °C pendant 45 minutes. De nos jours il n'existe pas de méthode validée pour les tests de sensibilité d'extraits de plantes sur *M. ulcerans* en milieu liquide. Les tests réalisés dans cette étude (Yemoa; 2011) ont donc été développés par analogie avec les tests utilisés avec succès pour évaluer en milieu liquide la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antibiotiques. Ceci nous a permis de réduire à 15 jours le délai d'obtention des résultats.

L'interférence de la couleur des solutions d'extraits sur la couleur du milieu de culture pourraient rendre difficiles l'interprétation visuelle des résultats; d'où la nécessité d'inclure des blancs correspondant aux solutions d'extraits de plante seules lors des tests.

Pour faciliter la solubilisation des extraits, nous avons utilisé du DMSO. Dans le but d'éliminer l'hypothèse d'une activité inhibitrice éventuelle du DMSO sur *M.*

ulcerans dans les conditions de dilution utilisées pour le test de sensibilité de nos extraits, nous avons réalisé des contrôles expérimentaux avec le DMSO seul à différentes concentrations dans le milieu de culture. Il ressort des résultats de cette étude que pour une concentration finale en DMSO inférieure ou égale à 0,625 % dans le milieu de culture, il n'existe aucun effet inhibiteur sur la croissance de la souche de *M. ulcerans* utilisée. Les concentrations du DMSO dans les différents puits des microplaques varient de 0,02 à 0,625%. Cette concentration de DMSO dans le milieu de culture est inférieure au seuil de 1% recommandé par certains auteurs (Cos; 2006) mais en accord avec le seuil d'effet observé dans notre test; ce qui nous permet de conclure que l'activité de nos extraits de plantes n'est pas liée au DMSO mais bien aux composés actifs présents dans ces extraits de plantes.

Des quarante et quatre (44) plantes testées, seules les feuilles de *H. floribunda* et de *Jatropha curcas* se sont révélées actives avec des CMI respectives de 125 et 250µg/ml. Le taux de plantes actives est de 4.5%. Ce taux est faible. Cependant l'activité de ces 44 plantes identifiées est rapportée dans le traitement traditionnel. Ce faible taux pourrait donc s'expliquer par la différence des solvants d'extraction utilisés car nous avons constaté que les décoctions aqueuses sont les préparations les plus utilisées par les tradipraticiens de la commune de Ouinhi pour soigner l'UB. Or dans notre étude, nous avons utilisé principalement l'éthanol comme solvant d'extraction. L'éthanol possédant une polarité intermédiaire (4,3) permet le ratisage d'un grand nombre de composés et s'évapore facilement, ce qui évite de chauffer longtemps et à une température élevée lors de la concentration au Rotavapor.

Les drogues végétales testées dans notre étude pourraient avoir une activité inhibitrice sur d'autres bactéries courantes. Ainsi que des effets antidouleur, anti-inflammatoire et cicatrisant. De telles activités pourraient être mises à profit pour soigner la plaie et prévenir les surinfections.

Addo *et al.* dans une étude menée au Ghana en 2008, ont rapporté que les racines de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae), traditionnellement utilisées au Ghana pour soigner l'UB, ont montré une activité inhibitrice sur *M. ulcerans* à une concentration de 12,5% (volume solution d'extrait/volume de milieu de culture) par la méthode de proportion sur LJ; ce qui correspond à une concentration de 125 mg/ml (Addo P; 2008). Cette CMI est largement supérieure à la limite de concentration de 250 µg/ml fixée dans notre étude. Ce qui ne

concorde pas avec nos résultats. Selon la même étude, cette drogue végétale possède une activité inhibitrice sur d'autres bactéries telles que: *Streptococcus spp*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; *Salmonella thyphimurium*. Les mêmes auteurs ont observé une absence d'activité inhibitrice des écorces de *Bridellia ferruginea* (Euphorbiaceae) sur *M. ulcerans*. Ce résultat est en accord avec celui obtenu dans notre étude avec cette même drogue végétale.

Osoniyi et al ont rapporté également l'usage du latex de *J. curcas* en médecine traditionnelle au Ghana. Au Bénin, ce sont les feuilles qui sont utilisées sous forme de cataplasmes dans le traitement traditionnel de l'UB au stade d'ablation de la nécrose et sous forme de décoction pour nettoyer et soigner la plaie.

Ces résultats montrent que la méthode REMA est simple et rapide et peut être utilisée pour évaluer l'effet des extraits de plantes sur *M. ulcerans*. Vu les résultats obtenus, nous avons choisi de focaliser nos travaux sur l'*Holarrhena floribunda* et de déterminer les grands groupes de composés chimiques ou métabolites secondaires présents cette plante.

v.

*CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET
FRACTIONNEMENT BIO GUIDE
DE *Holarrhena floribunda* (G.Don) T.
Durand et Schinz*

5.1. INTRODUCTION

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative chimique basée sur des réactions de coloration et de précipitation effectuées sur la drogue végétale fraîche ou sèche réduite en poudre. Cette analyse vise à déterminer les grands groupes de composés chimiques ou métabolites secondaires présents dans la plante. Cette information permet de sélectionner les méthodes d'extraction et les techniques chromatographiques à appliquer pour le fractionnement bio guidé.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur *H. floribunda*, plante la plus active parmi les quarante quatre testées.

5.1.1. *Holarrhena floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz)

➤ Genre et famille

Le genre *Holarrhena* appartient à la famille des Apocynaceae. On les rencontre essentiellement en zones soudanaises à guinéennes, galeries forestières et bords de cours d'eau, collines rocheuses, friches et jachères. L'espèce est répartie du Sénégal au Cameroun, jusqu'à la RDC et également en Côte d'Ivoire, au Togo, en Guinée, et au Bénin. Ce sont des arbres ou arbustes à latex de 10 - 15m de haut, à cime plus ou moins étalée et ouverte. L'écorce est lisse ou plus ou moins crevacée, grise, ou brune, à tranche granuleuse brun pâle. Le latex est blanc. Le rameau est violet-noir à brun, plus ou moins lenticellé, glabre ou pubescent. Les feuilles (figure 5.1) sont simples, opposées, souvent distiques ovales ou elliptiques. Le pétiole est glabre, largement inséré sur le rameau, de 3-4(-6) mm de long. La nervation est pennée, peu saillante, à 6-12 (-15) paires de nervures secondaires se raccordant vers le sommet. L'inflorescence est un corymbe axillaire atteignant 10cm de large. Les fleurs sont courtement pédicellées, blanches et parfumées. Le calice est finement pubescent, la corolle est en tube de 5 à 9mm de long, rétrécie vers la base, à 5 lobes oblongs, de 3.5-8(-12) mm de long. Les fruits sont des follicules jumelés et linéaires, plus ou moins parallèles, de 30-60x 0.6-0.7cm, à sommets émoussés. La floraison intervient en début de saison des pluies (Adjanohoun; 1989).

L'espèce *Holarrhena floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz est connue sous quatre synonymes: *Rondeletia floribunda* G. Don, *Holarrhena africana* A. DC, *Holarrhena wulfsbergii* Stapf, *Holarrhena ovata* A. DC.

En république du Bénin, les noms vernaculaires de cette plante sont : en fon : «kpakpatoun» à Ouinhi (Yemoa; 2008); en Yoruba et Nago : «ako ire», «ire ibedji» (Adjanooun; 1989); en Mina : «gaofi» (Adjanooun; 1989). La figure 5.1 montre une photographie d'un rameau feuillé de cette plante et la figure 5.2 montre un schéma de la partie aérienne.



Figure 5.1 : Photographie d'un rameau feuillé de *H. floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz

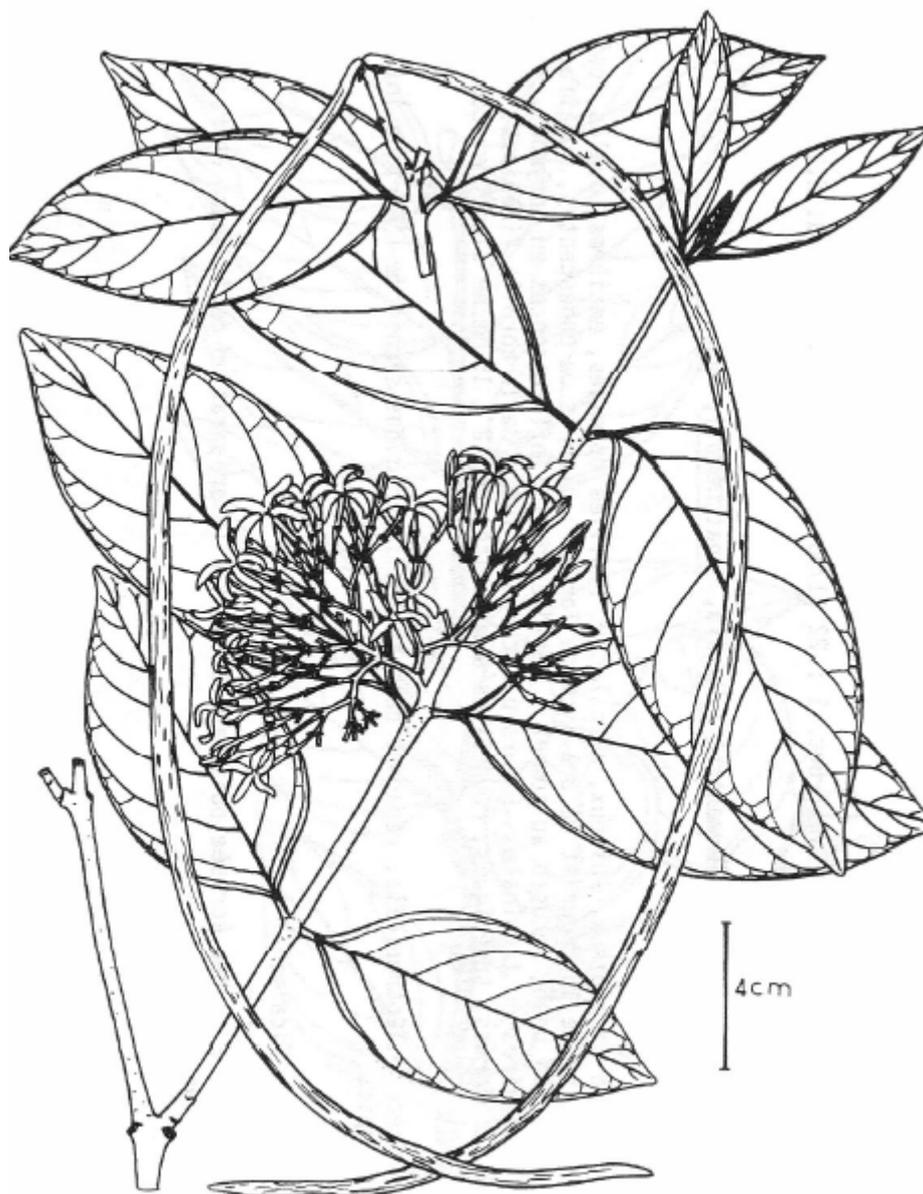


Figure 5.2 : Schéma de la partie aérienne de *H. floribunda*

- Usage de *H. floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz en médecine traditionnelle

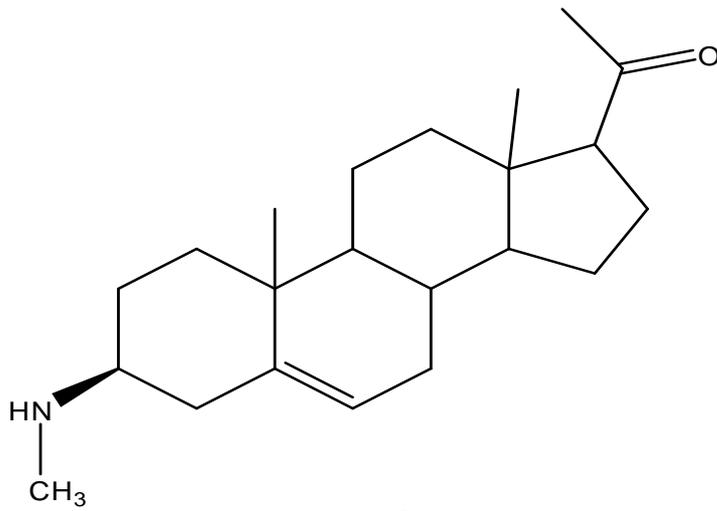
La plante (**écorces de tiges** ou de **racines**) est utilisée dans le traitement de la dysenterie amibienne sous forme de décocté. La conessine, un des principaux constituants chimiques, considérée comme l'alcaloïde actif (amoebicide), a été isolée et utilisée en thérapeutique, puis abandonnée en raison de sa neurotoxicité (Guissou; 1992). Sous forme de décocté les **feuilles** sont hémostatiques, et utilisées pour soigner les plaies et coupures, l'urticaire, le diabète, les maladies infantiles, le paludisme. Les feuilles sont galactagogues pour les bovins. Associées à la **racine**

elles interviennent dans les accouchements. **Les fruits** sont utilisés dans le traitement de la goutte et de l'hydropisie. Le **latex** est un poison de pêche (Michel A; 2002). *H. floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz est une plante ayant de très nombreuses utilisations médico-religieuses. Au Bénin, elle fait partie des espèces d'angiospermes les plus fréquemment vénérées (Adjanooun EA; 1989).

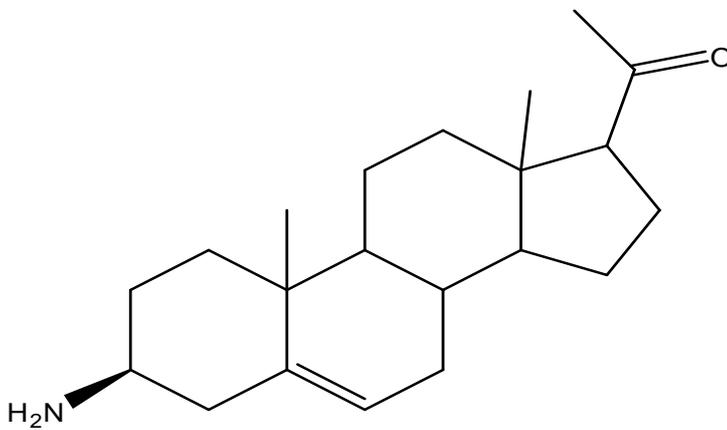
➤ Composition chimique et activités biologiques (travaux antérieurs).

H. floribunda (G.Don) T.Durand et Schinz a fait l'objet de certaines études phytochimiques. Ainsi, Hoyer et al en 1978 ont isolé de l'écorce du tronc et établi la structure d'un alcaloïde stéroïdique appelé holarrhesine. Mais ce composé n'a été testé pour aucune activité biologique. Ils ont également isolé la conessine de l'écorce de la racine (Hoyer; 1978). Lambin et al rapportent l'action des alcaloïdes totaux et de la conessine extraits de la racine de *H. floribunda* sur *M. tuberculosis* (Lambin; 1953). Une étude chimique des feuilles de *H. floribunda* réalisée par l'équipe de Janot en 1959 a permis d'isoler d'autres nouveaux alcaloïdes dont: l'holaphylline et l'holaphyllamine (Janot; 1959, Goutarel; 1962).

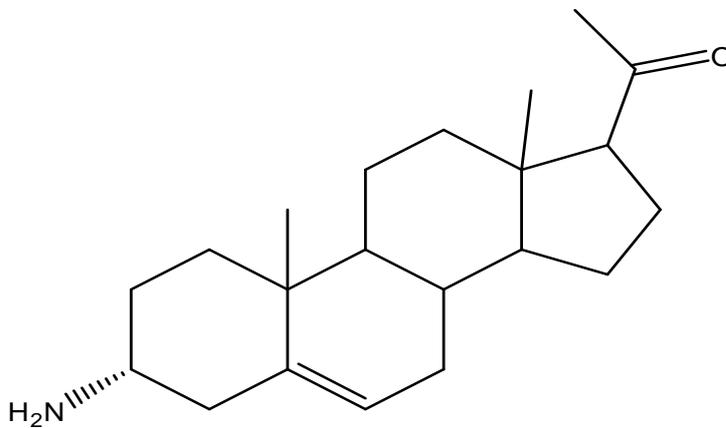
La figure 5.3 montre les structures de 09 composés chimiques isolés de *H. floribunda* (Lebœuf; 1969) : Holaphylline, Holaphyllamine, Holamine, Holaphyllinol, Holaphyllidine, Holadysamine, Holarrhesine, Conessine, Progestérone.



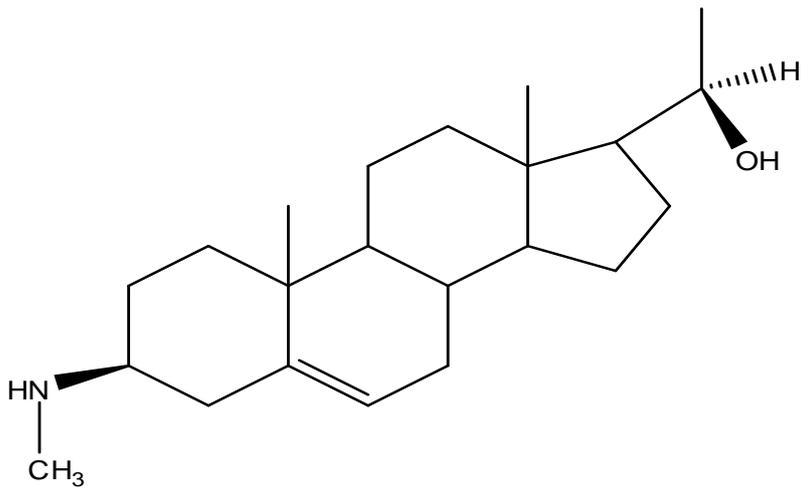
Holaphylline: 3 β -méthylamino prégn-5-èn-20-one



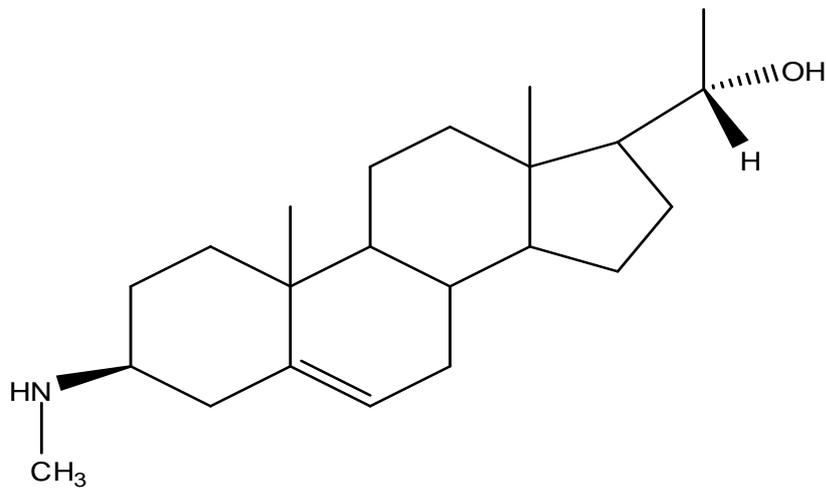
Holaphyllamine: 3 β -amino prégn-5-èn-20-one



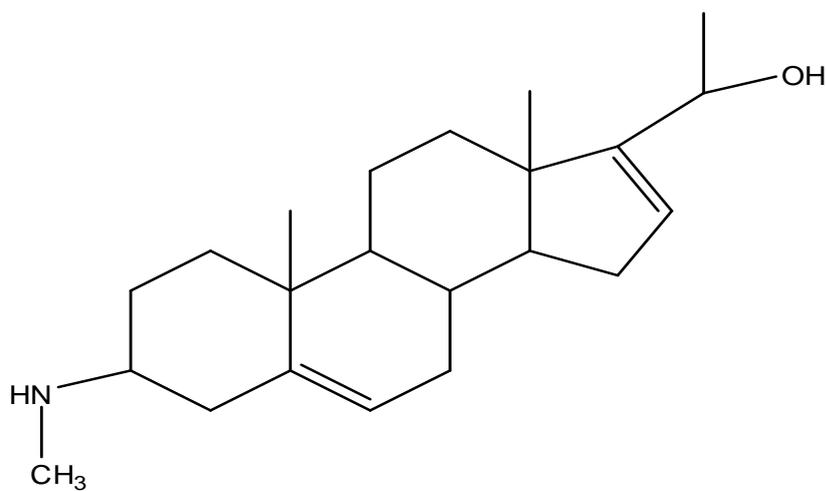
Holamine: 3 α -amino prégn-5-èn-20-one



Holaphyllinol: 3 β -méthylamino prégn-5-èn-20 β -ol



Holaphyllidine: 3 β -méthylamino prégn-5-èn-20 α -ol



Holadysamine: 3-méthylamino préгна-5,16-dièn-20-ol

(stéréochimie non encore élucidée)

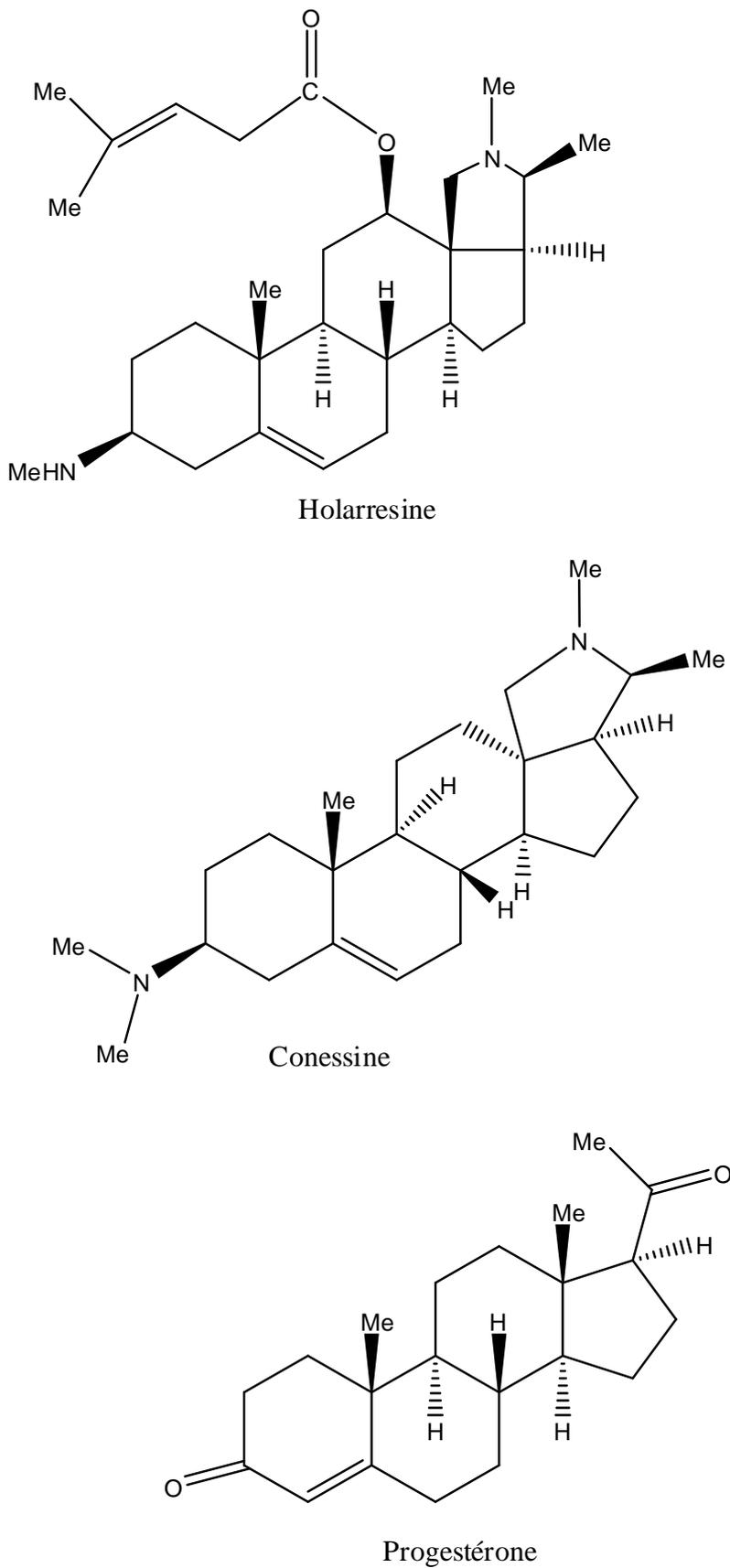


Figure 5.3 : Structure chimique de composés isolés de *H. floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz.

Nous avons effectué le criblage phytochimique des feuilles de cette plante conformément aux techniques décrites dans la littérature (Houghton; 1998, Bruneton; 1999, Wagner; 1996). Nous avons ensuite effectué un fractionnement bio guidé en réalisant différentes fractions avec des solvants de polarité croissante et en testant ces fractions sur *M. ulcerans*. Le fractionnement permettra d'avoir une idée générale sur la polarité des composés actifs de cet extrait car ce dernier est susceptible de contenir plusieurs composés actifs à la fois: alcaloïdes, tanins, terpènes et stéroïdes, saponosides. Ces informations seront utilisées pour déterminer les différents systèmes de solvants pour les différents fractionnements bio guidés de l'extrait éthanolique. Le fractionnement bio-guidé étant une suite de fractionnements à partir de l'extrait brut au cours desquels la ou les fractions actives est ou sont fractionnée(s) jusqu'à l'obtention de composés purs. Ce début de fractionnement a été guidé dans ce travail par l'analyse de l'activité des fractions sur *M. ulcerans*.

5.2. MATERIELS ET METHODE

5.2.1. Matériel végétal

Il s'agit du même matériel végétal que dans les chapitres précédents: feuilles séchées de *H. floribunda* réduites en poudre.

5.2.2. Préparation de l'extrait

La méthode utilisée est la percolation. Ce type d'extraction a pour but d'extraire la majeure partie des principes solubilisables contenus dans une drogue végétale par épuisement progressif de cette drogue végétale au moyen de solvants appropriés. Cette opération consiste à faire passer le solvant lentement et régulièrement à travers la drogue pulvérisée et déposée en couche suffisamment épaisse. Ainsi, 50 g de poudre de *H. floribunda* sont mis en macération pendant 48 heures dans de l'éthanol puis soumis à une percolation jusqu'à épuisement total avec l'éthanol (figure 5.4). Après filtration, le percolat est concentré sous pression réduite à 40°C à l'aide du Rotavapor (Buchi Rotavapor R-200/205, Switzerland). Nous obtenons ainsi un extrait brut concentré. C'est sur cet extrait brut que nous réaliserons le fractionnement liquide liquide.

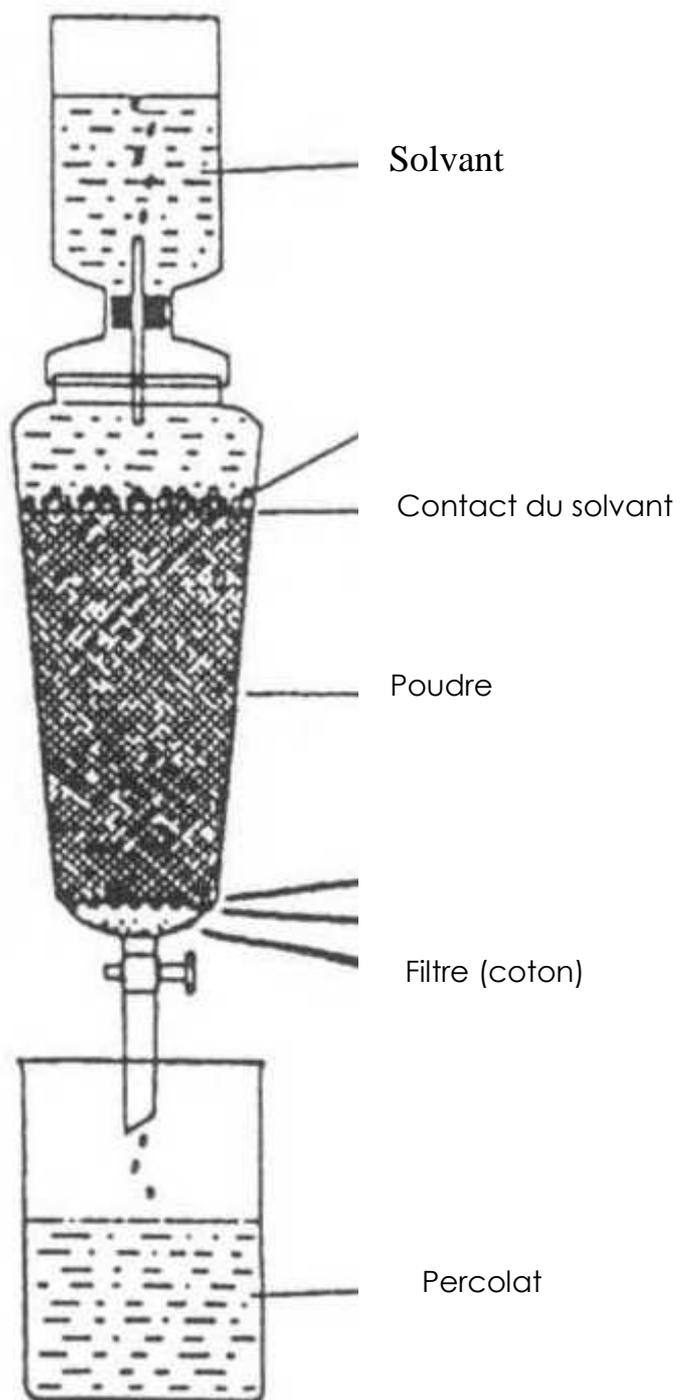


Figure 5.4: Schéma d'un percolateur

5.2.3. Fractionnement liquide-liquide

C'est une méthode de séparation des composés d'un mélange basée sur le coefficient de partage entre liquides non miscibles. A l'extrait brut on ajoute un volume d'eau correspondant à son poids. L'extraction a lieu dans une ampoule à décanter (figure 5.5) avec des solvants organiques de polarité croissante: hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, eau. Les schémas des figures 5.5 et 5.6 résument le mode opératoire de ce fractionnement.

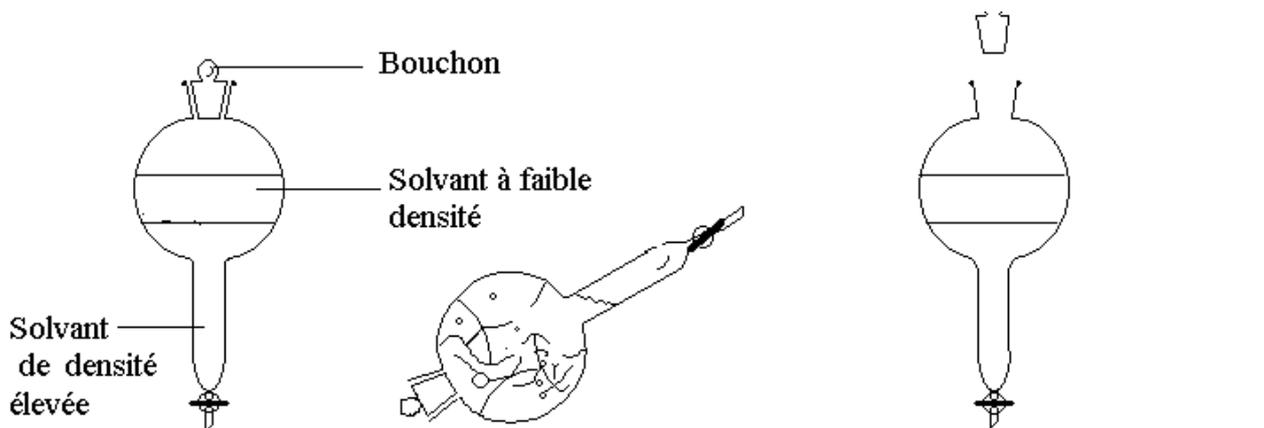


Figure 5.5 : Mode d'utilisation d'une ampoule à décanter

a- Le solvant pur est ajouté à l'extrait brut

b-Agitation et équilibrage des pressions internes et externes

c- Décantation (ballon ouvert)

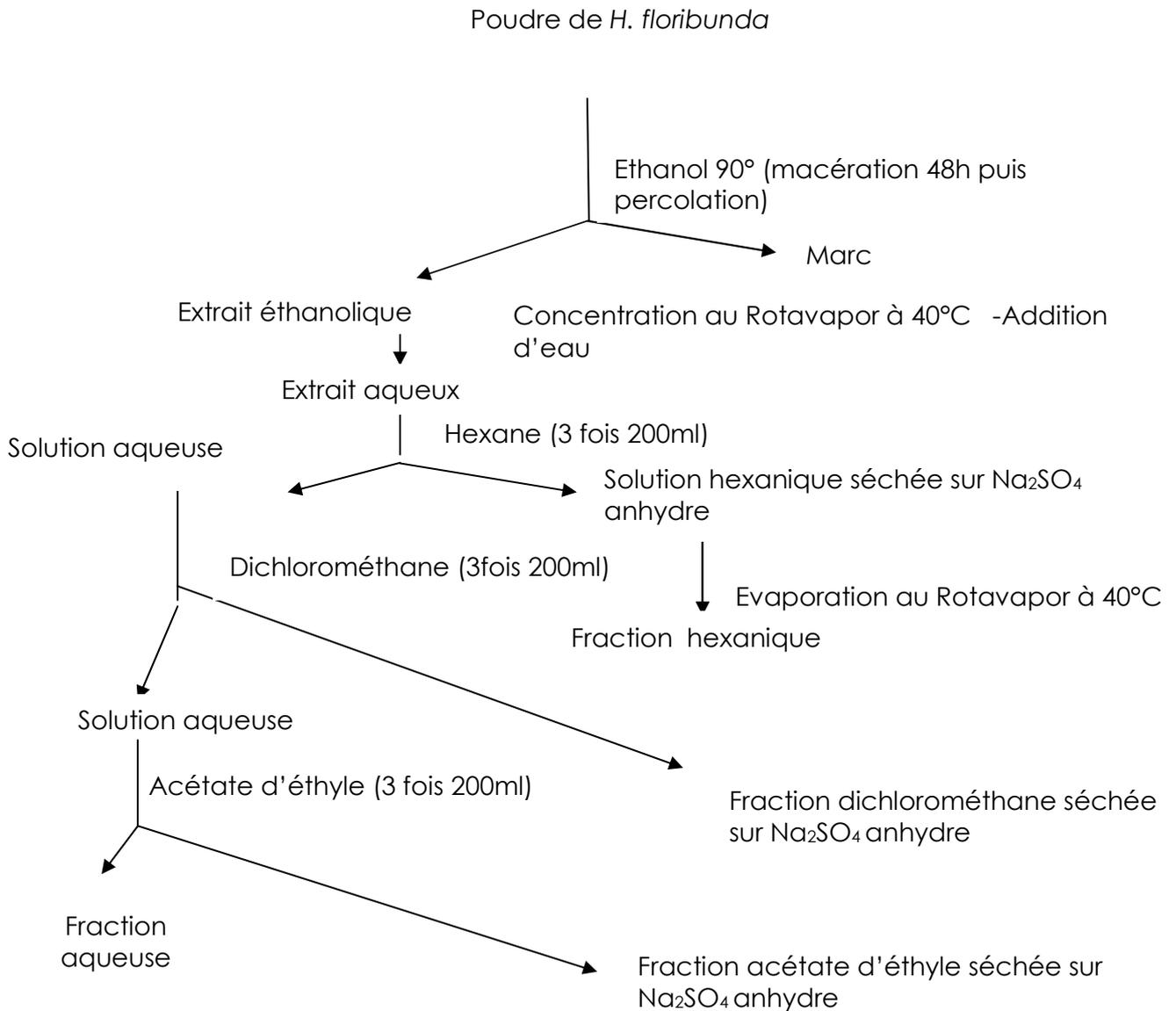


Figure 5.6 : Mode opératoire du fractionnement liquide liquide

5.2.4. Chromatographie sur couche mince (CCM) des différentes fractions

La CCM est une méthode d'analyse simple, rapide pour étudier la composition des extraits et des différentes fractions de la plante. Elle permet une visualisation directe de la séparation des composés après révélation. La figure 5.7 montre le développement d'une CCM.

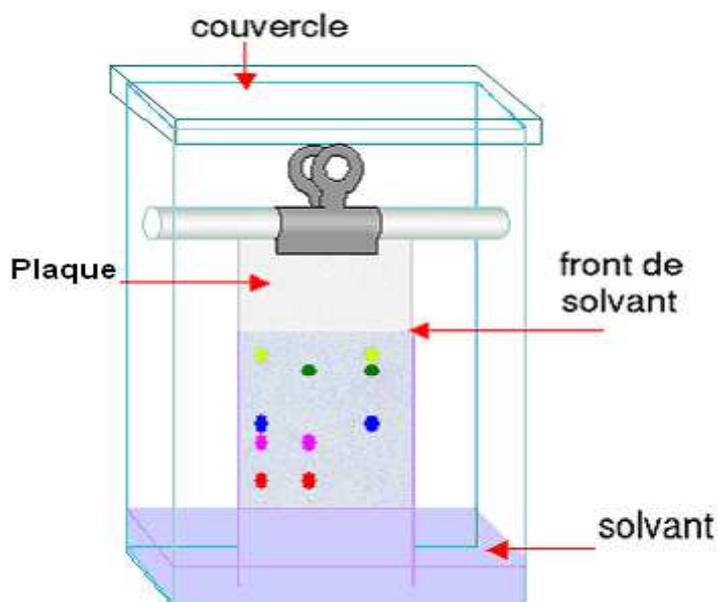


Figure 5.7 : Développement chromatographique d'une plaque

Les différentes fractions analysées sont susceptibles de contenir différents types de composés chimiques: alcaloïdes, saponosides, composés phénoliques, terpènes, dérivés quinoniques.

Pour certains de ces composés chimiques, il existe des révélateurs relativement spécifiques en CCM. Nous avons utilisé des révélateurs plus ou moins spécifiques de certaines classes. Ainsi pour identifier les composés polaires comme les flavonoïdes par exemple, nous avons utilisé le réactif de NEU/PEG et le $FeCl_3$ pour les tanins. Pour révéler les alcaloïdes nous avons utilisé le réactif de Dragendorff, l'anisaldéhyde sulfurique pour les terpènes et stéroïdes et les saponosides (Wagner; 1996).

Les plaques CCM utilisées sont des plaques de silice normale. La détection des bandes s'est faite visuellement puis à l'UV à 254nm puis à 365 nm et enfin avec les révélateurs spécifiques.

Pour chaque fraction analysée nous déposons 10µl de la solution à 1mg/ml d'extrait diluée dans son solvant d'extraction ou dans le dichlorométhane sur la plaque puis nous séchons avec le sèche-cheveux. La liste des différents éléments utilisés est reprise ci-dessous.

Plaque : TLC silica gel 60F₂₅₄Merck®.

Phase mobile

- Alcaloïdes: toluène-acétate d'éthyle-diéthylamine (70:20:10)
- Flavonoïdes, tanins: acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique-eau (100:11:11:26)
- Terpènes: toluène-acétate d'éthyle-méthanol (80:18:2)
- Dérivés anthracéniques: acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:13.5:10)
- Saponosides, stéroïdes et terpènes: chloroforme-acide acétique glacial-méthanol-eau (64:32:12:8)

Révélateurs

- Réactif de Dragendorff:
Préparation: solution a: 0.85g de nitrate de bismuth dans 10ml d'acide acétique et 40 ml d'eau. Solution b: 8g d'iodure de potassium dans 30 ml d'eau; solution stock: solution a-solution b (1:1).
Solution de pulvérisation: 1ml de solution stock + 2ml d'acide acétique+ 10ml d'eau.
Détection: Spots orangés
Classe de molécules mises en évidence: alcaloïdes
- Réactif de NEU/PEG
Préparation: mélange de 5% polyéthylène glycol 600 dans de l'éthanol et de réactif de NEU (dissoudre 1g de diphénylborate de 2-aminoéthyl) dans 100ml de méthanol à 50:50
Détection: spot jaune à orange ou bleu
Classes de molécules en évidence: flavonoïdes et acides phénols
- Réactif au FeCl₃
Préparation: 5% d'une solution aqueuse de FeCl₃
Détection: Spot jaune à orange ou violet à vert dans le visible, UV 365nm.
Classes de molécules mises en évidence: tanins.

- Anisaldéhyde sulfurique:

Préparation: EtOH -p-Anisaldéhyde-Acide acétique (90-5-1) + 5% H₂SO₄ (à ajouter extemporanément). Pulvériser la plaque avec le mélange puis chauffer pendant 5 minutes à 105 °C.

Détection: Spots colorés mauve, violet ou bleu.

Classes de molécules mises en évidence: terpènes, stéroïdes, saponosides.

5.2.5. Préparation d'un extrait enrichi en alcaloïdes

Comme *H. floribunda* était connue pour la présence d'alcaloïdes et que l'extrait alcaloïdique total de cette plante est actif in vitro sur *M. tuberculosis* (Lambin; 1953), nous avons réalisé une extraction dirigée pour obtenir un extrait enrichi en alcaloïdes. Cette extraction a été réalisée suivant le schéma (Figure 5.8) ci-dessous.

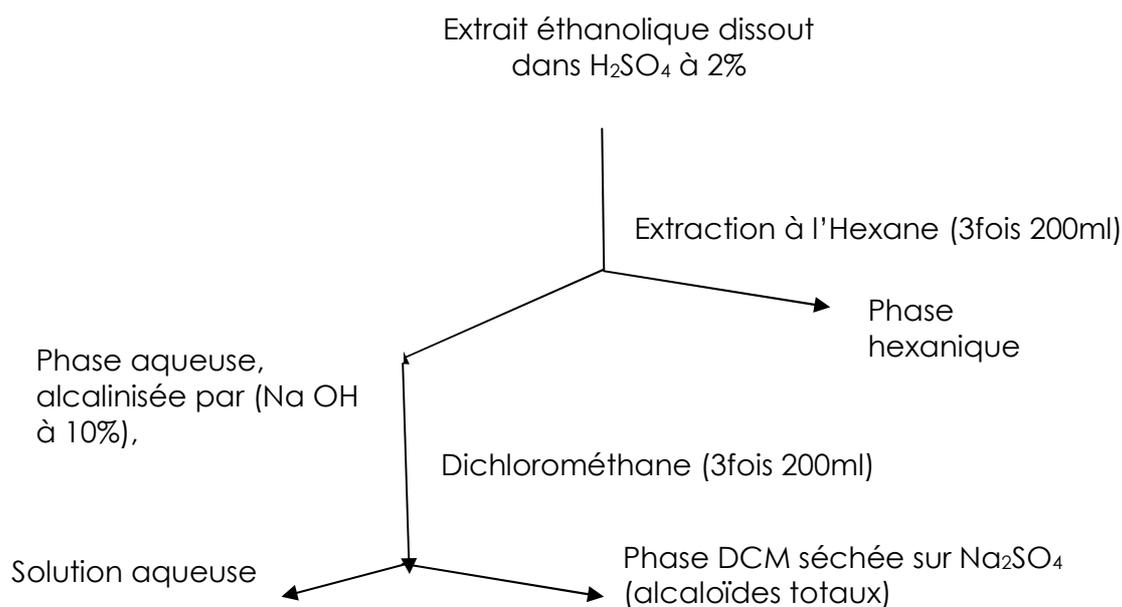


Figure 5.8: Schéma d'extraction d'alcaloïdes totaux

5.2.6. Test d'activité sur *M. ulcerans*

Les différentes concentrations que nous avons testées (suivant la méthode décrite au chapitre IV) sont: 250µg/ml; 125µg/ml; 62.5µg/ml; 31.25µg/ml; 15.62µg/ml; 7.81µg/ml.

5.3. RESULTATS

Nous obtenons 4 fractions différentes à l'issue du fractionnement liquide liquide: hexane (HEX), dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle (ACE) et aqueuse (AQ).

Les résultats du criblage phytochimique sont consignés dans le tableau I et les résultats du test *in vitro* sur *M. ulcerans* des fractions obtenues à l'issue du fractionnement bio guidé sont présentés sur le tableau II.

Tableau 5.1 : Résultats du criblage phytochimique des feuilles de *H. floribunda*

Al	He	Classes chimiques					
		dq	Ta	Fl	dcy	T/St	Sap
+	-	-	+	-	-	+	+

Légende

Al: alcaloïdes

He: huile essentielle

dq: dérivés quinoniques

Ta: tanins;

Fl: flavonoïdes, dcy: dérivés cyanogénétiques

T/St: terpènes et stéroïdes

Sap: saponosides

De l'analyse du tableau 5.1, nous notons que les feuilles de *H. floribunda* contiendraient les classes chimiques suivantes: alcaloïdes, tanins, stéroïdes et terpénoïdes, saponosides.

Tableau 5.2 : Résultats du test *in vitro* des fractions sur *M. ulcerans*

Fraction	HEX	DCM	ACE	AQ
CMI (µg/ml)	> 250	125	> 250	> 250

L'analyse du tableau 5.2 nous rapporte que de toutes les fractions testées, seule la fraction DCM est active sur *M. ulcerans* à une faible concentration. La CMI de cette fraction DCM est de 125 µg/ml. Cela est illustré à la figure 5.9 après révélation de la plaque REMA.

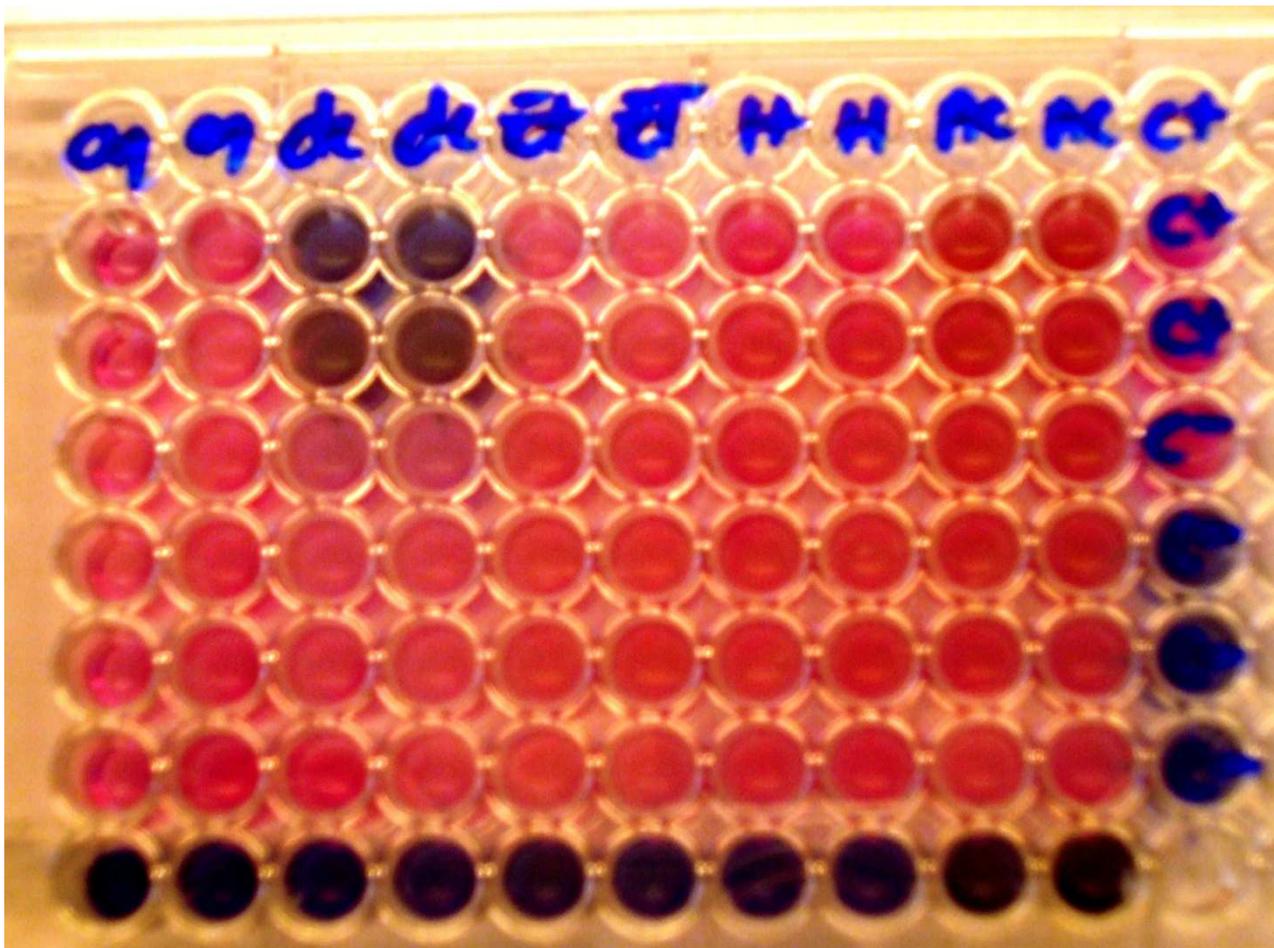


Figure 5.9 : Plaque REMA après révélation avec la resazurine

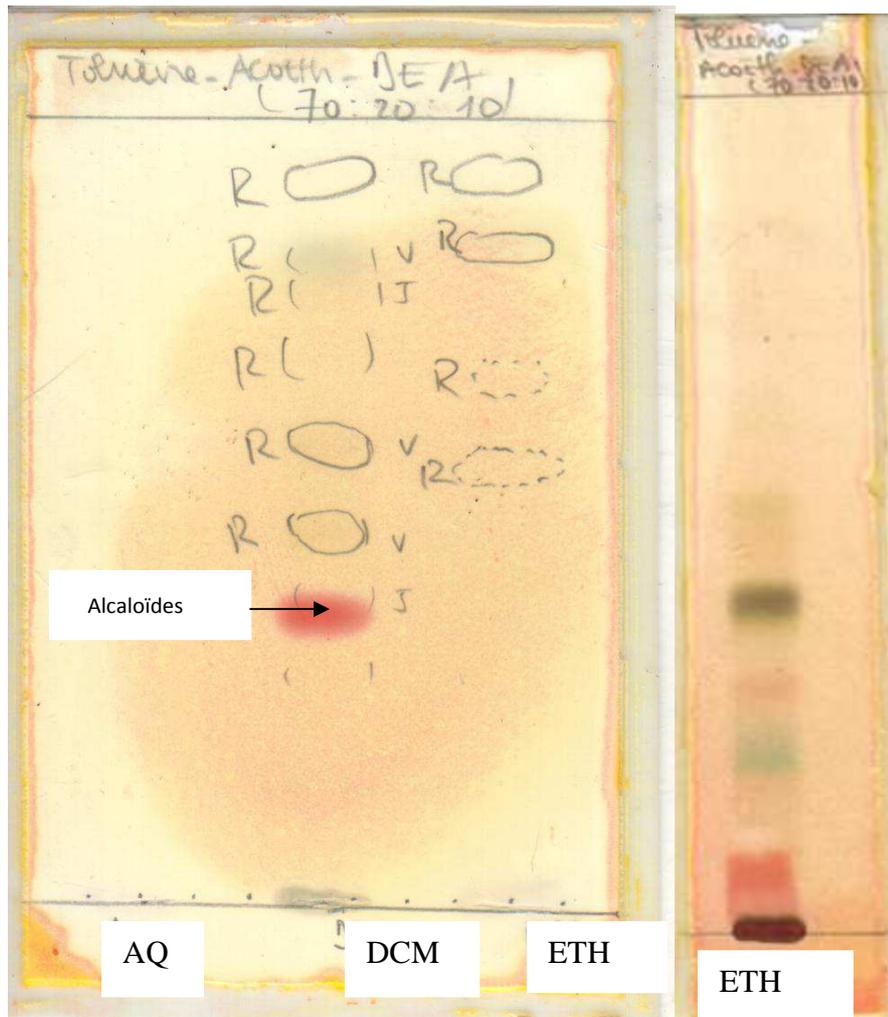
Légende: Aq: AQ, dc: DCM, Et: extrait éthanolique (ETH), H: HEX, Ac: ACE

C+: contrôle positif,

C-: contrôle négatif.

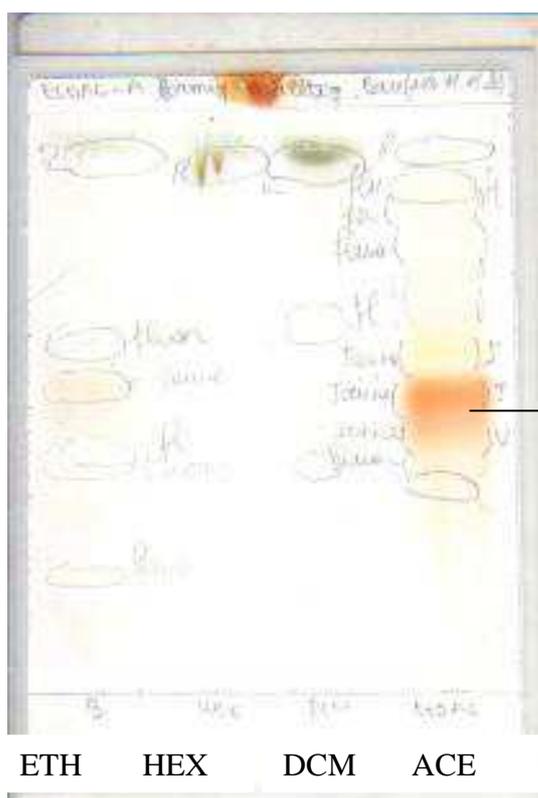
Les puits bleus marqués «dc» indiquent l'absence de croissance de *M. ulcerans* donc l'activité de l'extrait DCM à cette concentration, contrairement aux puits roses qui indiquent la croissance de *M. ulcerans* donc l'inactivité des fractions à ces concentrations testées.

Les figures 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 donnent les résultats de l'analyse CCM des différentes fractions à travers des photographies de quelques plaques révélées.



Phase Mobile:
Toluène-acétate
d'éthyle-diéthylamine
(70:20:10)

Figure 5.10 : Plaqué CCM après révélation par le réactif de Dragendorff



Phase Mobile :

Acétate d'éthyle- acide
formique- acide acétique- eau
(100 :11 :11 :26)

Flavonoïdes / tanins

Figure 5.11 : Plaque CCM après révélation avec le réactif de NEU/PEG

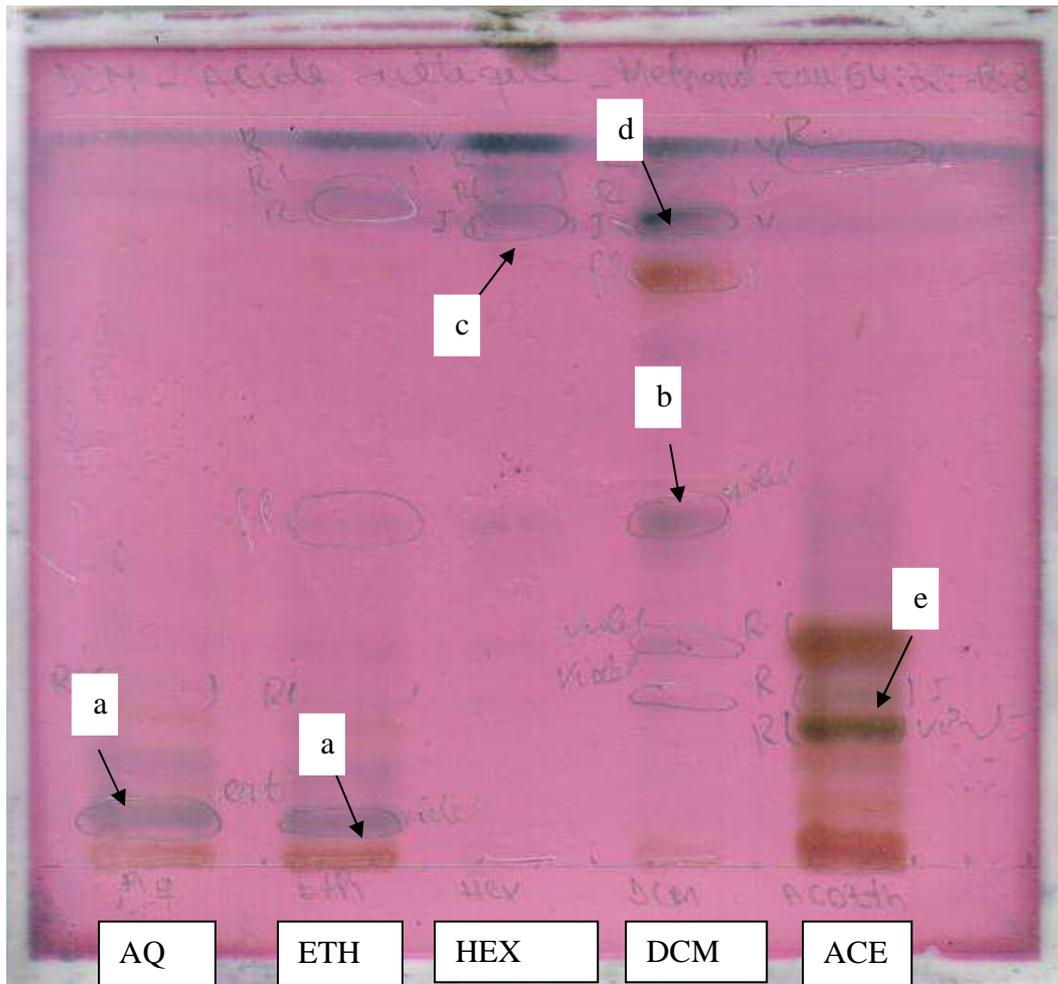


Figure 5.12 : Plaque CCM après révélation avec l'anysaldéhyde sulfurique

Classe de molécules éventuelles mises en évidence par les taches indiquées par les lettres a, b, c, d, e: saponosides, stéroïdes et terpènes

Phase Mobile:

Chloroforme-acide acétique glacial-méthanol-eau (64:32:12:8)

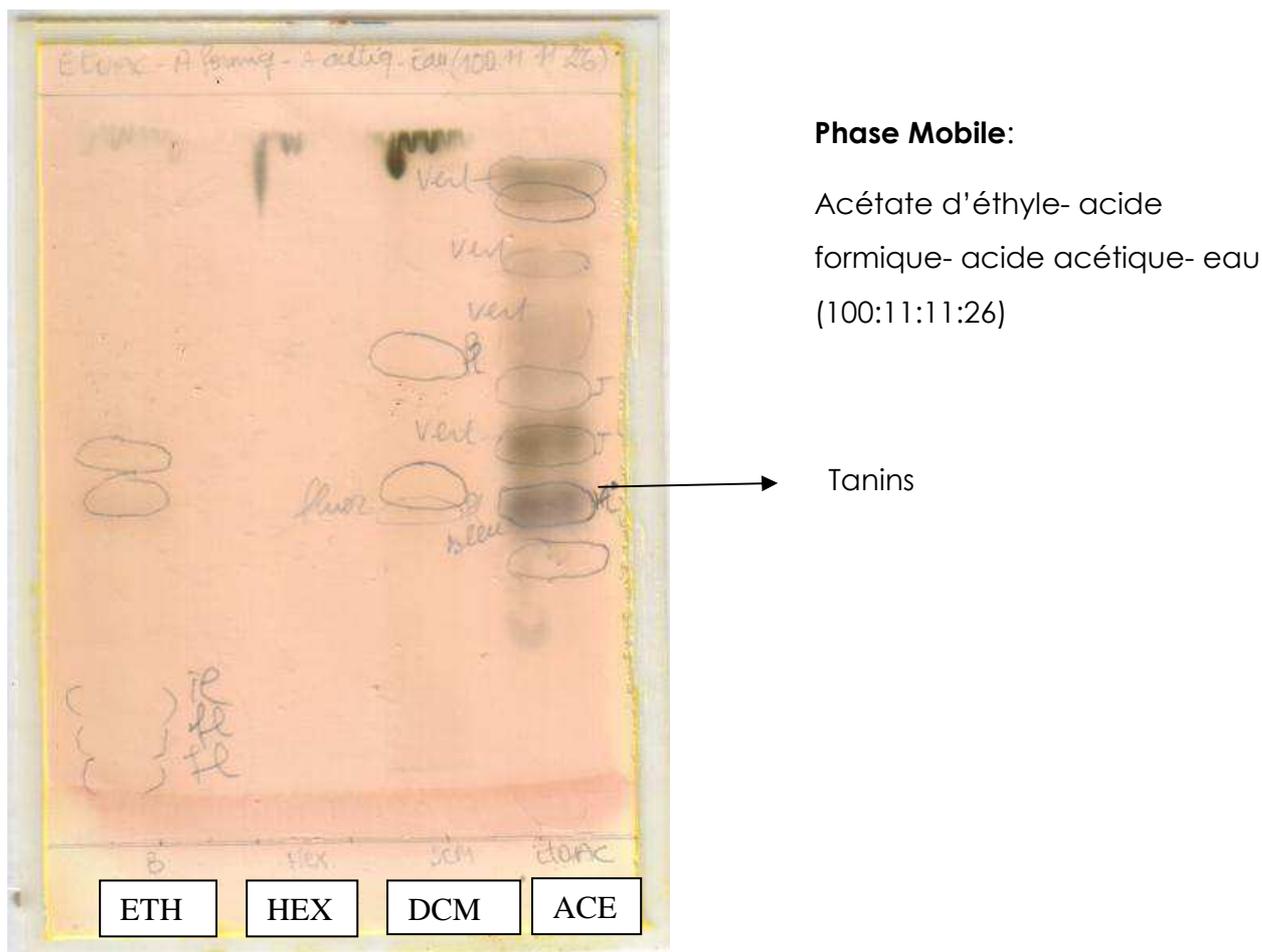


Figure 5.13 : Plaque CCM après révélation avec le réactif de $FeCl_3$

Le tableau 5.3 ci-dessous fait un récapitulatif des résultats de l'analyse CCM des fractions.

Tableau 5.3 : Récapitulatifs des résultats de l'analyse CCM

Fractions	Al	dg	Ta	Sap	T/St
DCM	+				+
HEX					+
AQ			+	+	+
ETH	+			+	+
ACE			+	+	

La CCM de la fraction DCM, seule fraction active, nous a permis de caractériser des alcaloïdes, des stéroïdes et terpénoïdes. Les stéroïdes et terpénoïdes sont aussi présents dans la fraction HEX, AQ, ETH ; cependant ces fractions n'ont pas été actives aux concentrations testées. Les CCM montrent que les spots présents dans la fraction DCM ont des R_f différents. Par ailleurs les

données bibliographiques rapportent que l'extrait alcaloïdique total de *H. floribunda* est actif in vitro sur *M. tuberculosis* (Lambin; 1953). Eu égard à tout ce qui précède, nous pourrions penser que ce sont les alcaloïdes présents dans la fraction DCM qui seraient responsables de l'activité observée. Les résultats illustrés ci-dessous (figure 5.14) ayant porté sur le test de la fraction alcaloïdique enrichie confirme notre hypothèse précédente.

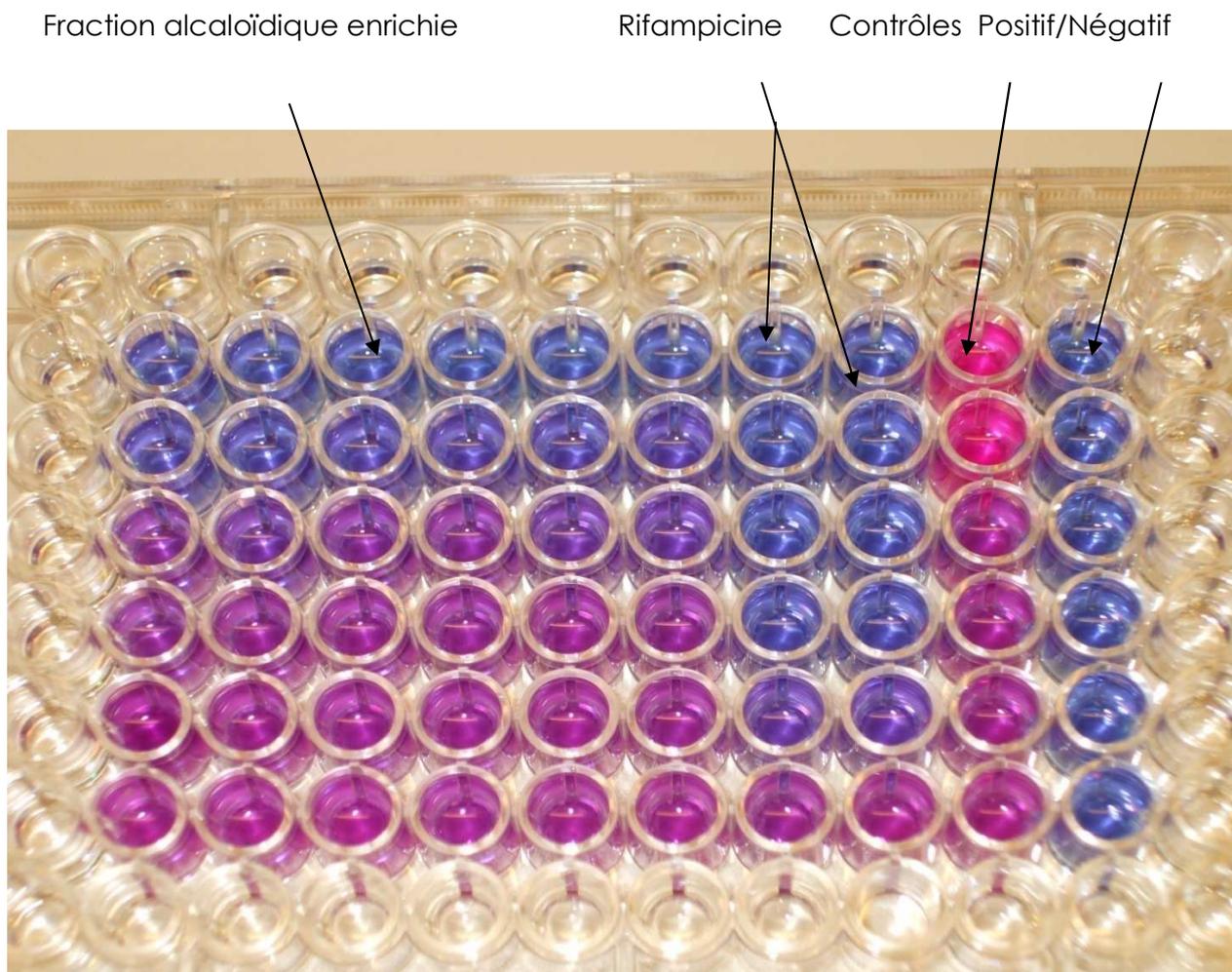


Figure 5.14 : Plaque REMA après révélation avec la resazurine

Les résultats montrent que la fraction alcaloïdique enrichie a montré une très bonne activité sur *M. ulcerans* avec une CMI de 62,5µg/ml. Nous allons donc poursuivre notre fractionnement bio guidé et entreprendre une purification de cette fraction afin d'isoler le ou les composés actifs.

VI.

*IDENTIFICATION, ISOLEMENT,
DETERMINATION STRUCTURALE
D'ALCALOÏDES DE H.
FLORIBUNDA, ET EVALUATION
DE LEUR EFFET SUR M. ulcerans.*

6.1. ISOLEMENT DES COMPOSES DE LA FRACTION DICHLOROMETHANE.

A la lecture des différentes CMI des différentes fractions obtenues par fractionnement liquide liquide et en tenant compte des différents groupes de molécules identifiées préliminairement par CCM (Chapitre 5.3) et des données bibliographiques, il semblerait que les composés les plus actifs sur *M. ulcerans* soient les alcaloïdes. Cela est confirmé par l'activité de l'extrait enrichi en alcaloïdes. Nous avons donc procédé à un fractionnement par chromatographie liquide à pression atmosphérique (CLPA) et par chromatographie liquide à pression moyenne (MPLC) suivie d'une filtration sur gel de SEPHADEX LH20 pour purifier ces alcaloïdes de la fraction alcaloïdique enrichie.

6.1.1. Matériels et Méthodes

6.1.1.1. Extraction des alcaloïdes totaux

Nous avons utilisé le même schéma d'extraction que dans le chapitre précédent (figure 5.8).

6.1.1.2. Purification de la fraction alcaloïdique

6.1.1.2. 1. Méthodes chromatographiques

a) CCM

Les conditions opératoires sont les mêmes que celle décrites au chapitre 5.2.4 concernant les alcaloïdes.

b) CLPA

Phase stationnaire: gel de silice 60 de diamètre 0,063- 0,200 mm (Merck; Germany).

Phase Mobile: Dichlorométhane: méthanol en mode gradient:

- 1) Dichlorométhane: méthanol (50-50),
- 2) Dichlorométhane: méthanol (25-75),
- 3) Dichlorométhane: méthanol (20-80),
- 4) Dichlorométhane: méthanol (15-85),
- 5) Dichlorométhane: méthanol (10-90),
- 6) Dichlorométhane: méthanol (5-95),
- 7) Méthanol (100%).
- 8) Méthanol: eau (90:10),
- 9) Méthanol: acide acétique (90:10)

c) MPLC

Les fractions pré purifiées obtenues par CLPA ont été rechromatographiées en MPLC. Les conditions opératoires sont les suivantes :

Phase stationnaire: Lichroprep® Si 60 de diamètre 15- 25µm (Merck; Germany).

Phase Mobile: Dichlorométhane: méthanol en mode gradient:

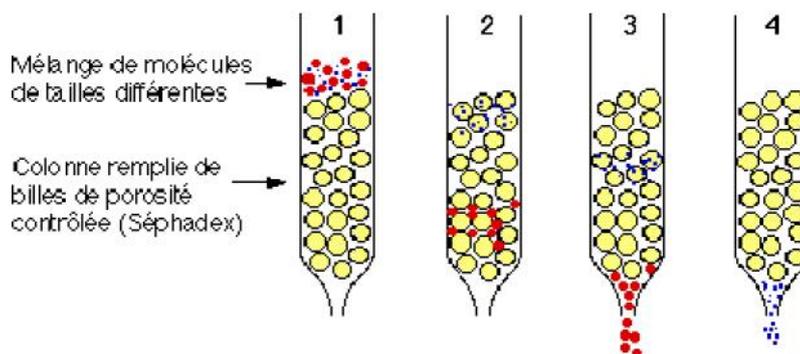
- 1) Dichlorométhane: méthanol (50-50),
- 2) Dichlorométhane: méthanol (25-75),
- 3) Dichlorométhane: méthanol (20-80),
- 4) Dichlorométhane: méthanol (15-85),
- 5) Dichlorométhane: méthanol (10-90),
- 6) Dichlorométhane: méthanol (5-95),
- 7) Méthanol (100%).

200ml de chaque système de solvant ont servit à éluer les différents composés.

d) Filtration sur gel de SEPHADEX LH20

Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion et les composés sont séparés en fonction de leur taille. Elle est encore appelée tamisage moléculaire.

Principe de la chromatographie d'exclusion :



1 : Dépôt d'un mélange de molécules (des plus grosses et des plus petites) sur une colonne remplie d'un gel de Sephadex.

2 : Les petites molécules peuvent pénétrer dans les billes de Sephadex car leur diamètre est inférieur à celui des pores du gel. Les grosses molécules ne le peuvent pas en raison de leur grande taille; elles sont donc exclues du gel (d'où le nom de chromatographie d'exclusion).

3 : Les grosses molécules ont donc un trajet plus court à parcourir pour arriver en bas de la colonne; elles sont donc éluées les premières.

4 : Les petites molécules sont éluées ensuite car elles ont une plus grande distance à parcourir pour arriver en bas de la colonne.

6.1.2. Résultats

6.1.2.1. CCM préliminaires d'identification.

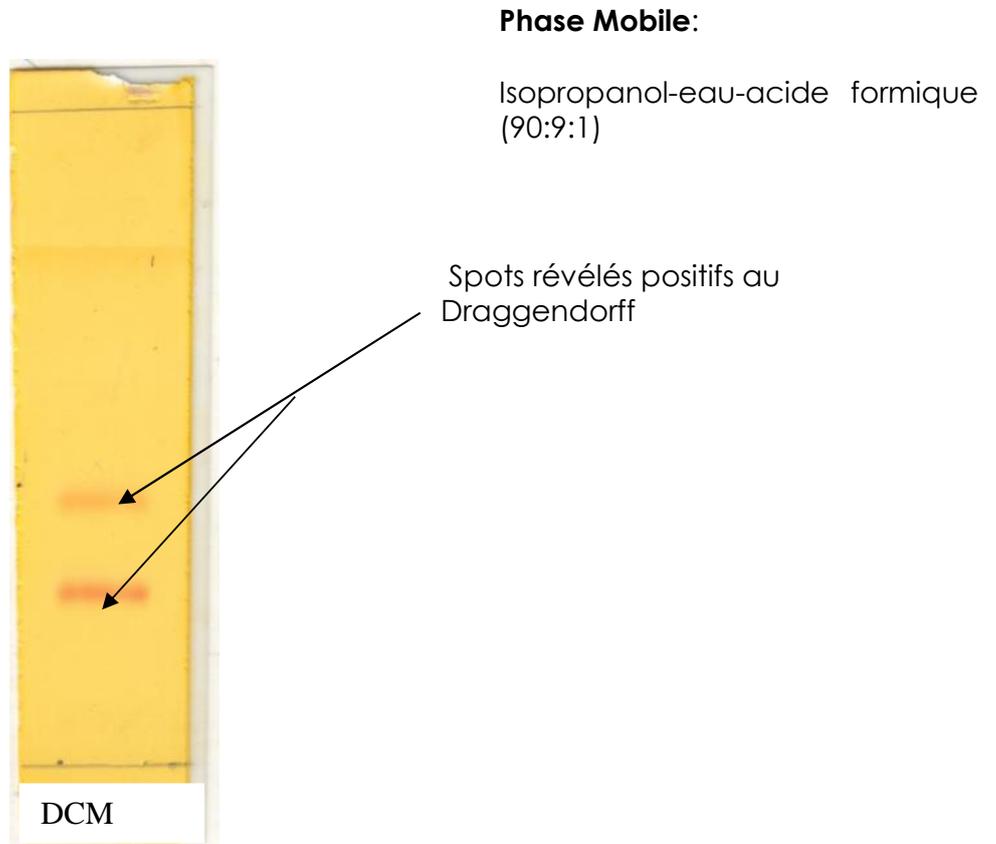
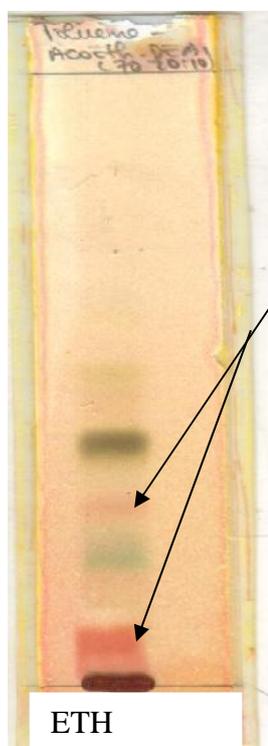


Figure 6.1 : CCM de la fraction alcaloïdique totale



Phase Mobile:

toluène-acétate
d'éthyle-
diéthylamine
(70:20:10)

Spots révélés
positifs au
Dragendorff

Figure 6.2 : CCM de l'extrait brut

Nous voyons à la lecture des plaques de CCM analytique ci-dessus plusieurs spots très intenses indiquant la présence de plusieurs alcaloïdes différents.

6.1.2.2. Chromatographie liquide et filtration sur gel de SEPHADEX LH20

A la suite de la série de chromatographies, un composé majoritaire nommé (D) a été purifié de la fraction alcaloïdique. Le composé D sort de la colonne à partir du système solvant dichlorométhane: méthanol (10-90). Nous avons obtenu 2,4mg de ce produit (D) et avons repris l'opération plusieurs fois pour augmenter la quantité pour déterminer sa structure et pour le test biologique. L'analyse des plaques CCM analytiques ci-dessous (figure 6.3) nous permet de distinguer la présence en outre de trois alcaloïdes différents A1, A2, A3 qui migrent à des Rf différents. En comparant les différentes plaques CCM, nous avons rassemblé les

tubes en cinq fractions différentes (I à V). Ces fractions seront analysées par LC-MS (Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse).

Phase Mobile : toluène-acétate d'éthyl-diéthylamine (70:20:10).

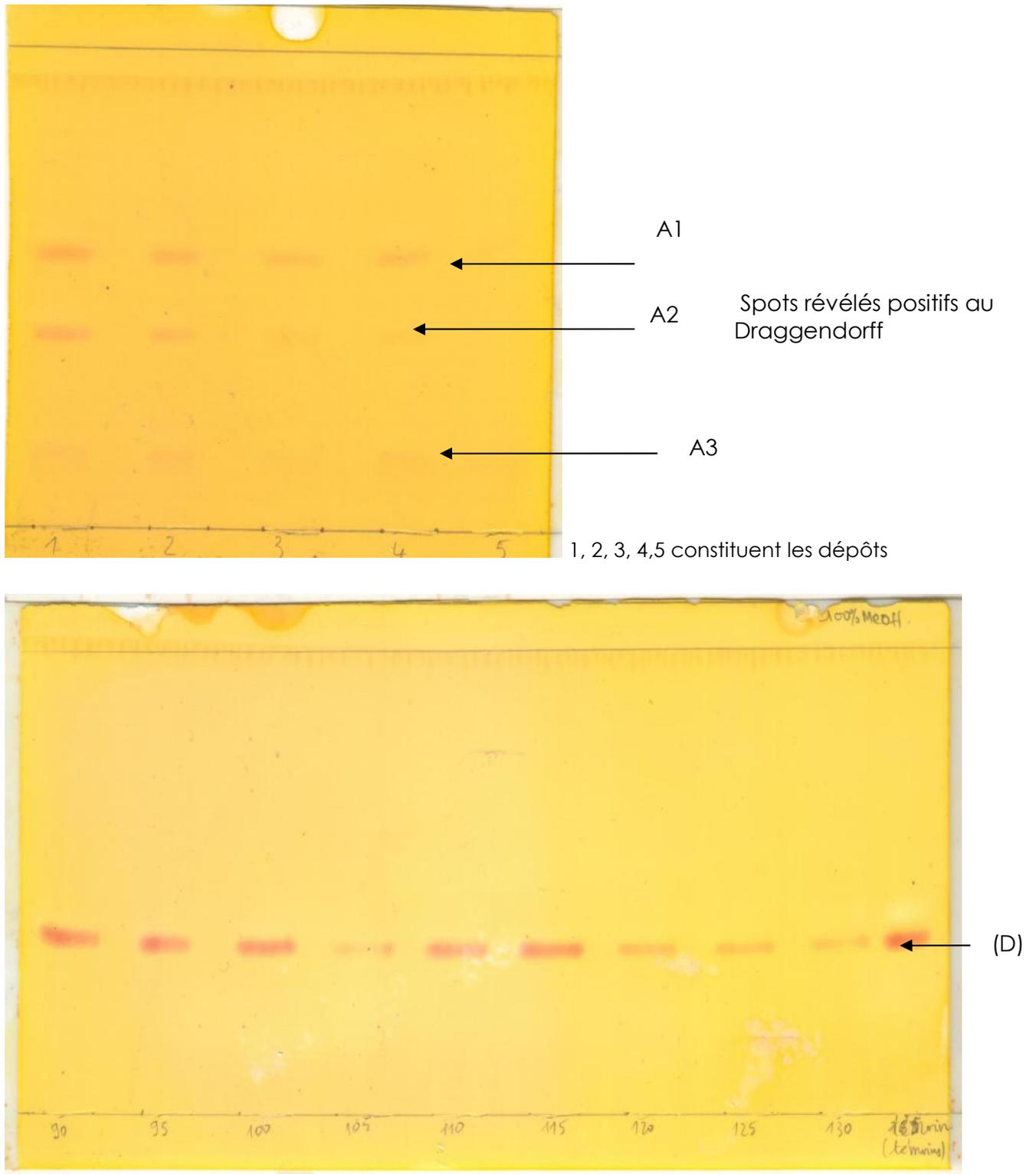


Figure 6.3 : CCM de quelques sous fractions alcaloïdiques issues de la MPLC

6.2. DETERMINATION DE STRUCTURE

6.2.1. Matériels et Méthodes

6.2.1.1. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC- MS ou LC-MS)

Le but de ce couplage est de séparer les composés présents dans la fraction analysée et de déterminer la masse et la composition chimique de chacun de ces composés. Les composés sont séparés suivant leur polarité. L'avantage de ce système est qu'il permet de séparer les différents composés présents dans le mélange, dont les produits d'intérêts et ainsi de vérifier la pureté des fractions obtenues à la suite des chromatographies liquides (ou étapes de purification) réalisées précédemment: MPLC, CLPA, filtration sur gel de sephadex. Au total cinq (5) fractions différentes ont été analysées par LC-MS.

6.2.1.1.1. L'HPLC

Il s'agit d'un appareil HPLC de type Accela (Thermofisher) que nous avons utilisé. Le système comprend:

- une pompe quaternaire, équipée d'un dégazeur
- Un injecteur automatique équipé d'une boucle de 25µl ainsi que d'un four de colonne.
- Un détecteur de type PDA (photodiode array)
- Cet appareil est également couplé au LTQ-orbitrap XL

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Phase mobile: acétonitrile (AcCN) eau (H₂O) et 0,05% d'acide trifluoro-acétique (TFA) en mode gradient

Temps (min)	B: H ₂ O-AcCN (90:10), 0.05% TFA	C: AcCN 100%, 0.05%TFA	Debit (µl/min)
0	90	10	400
25	00	100	400
40	00	100	400
41	90	10	400
50	90	10	

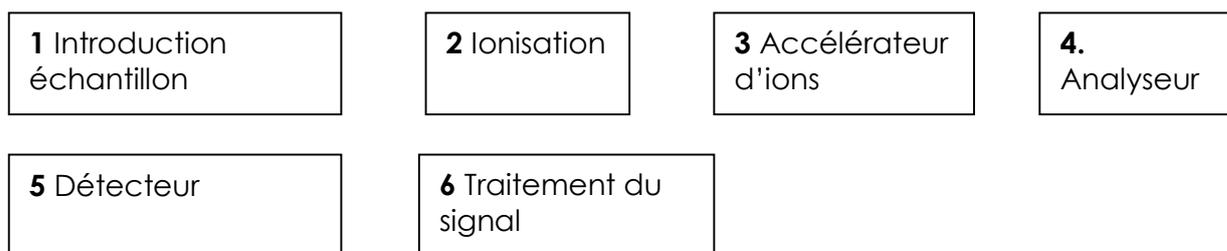
Nous avons réalisé un blanc fait d'isopropanol- AcCN (1:5) dans lequel sont dilués les échantillons à analyser pour des raisons de solubilité. Ce mélange

permet de déterminer les pics parasites (dus aux différents contaminants présents dans les solvants) et d'assurer un équilibrage de la colonne.

- Phase stationnaire: Colonne RP-C18 Lichrospher®-100, 5 µm, 250x4 mm
- Débit: 400 µl/min.
- Volume injecté: 10µl de solution à 1mg/ml pour les standards et pour les extraits
- Temps d'analyse: 40 minutes d'analyse et 10min d'équilibrage
- Longueur d'onde UV: 200 à 600nm
- Température du four de colonne: 30°C.

6.2. 1.1.2. Spectrométrie de Masse (SM)

La SM est basée sur l'analyse des masses des molécules présentes dans l'échantillon étudié (Rouassec; 2009). Pour en arriver à ce résultat, on commence par transformer le composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons, ou adduits ioniques). Ces ions sont alors soumis sous un vide poussé, à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique suivant les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse/charge (m/z), donc éventuellement leur composition chimique. Le concept de la technique apparaît dans la succession d'étapes auxquelles l'échantillon est soumis :



➤ Introduction de l'échantillon

Deux possibilités pour introduire l'échantillon:

- Introduction directe

Nous introduisons 400µl de notre échantillon mis en solution avec une microsiringue de 500µl dans un tube en peek qui communique avec la chambre d'ionisation à un débit de 10µl/min.

- LC-MS

L'intérêt de cette technique est de faire précéder l'analyse spectrométrique d'une méthode de séparation. Ceci permet d'obtenir des informations et de séparer les composés d'intérêt, et les éventuels contaminants. C'est cette dernière technique que nous avons retenue et utilisée pour notre étude.

Le spectromètre de masse utilisé (figure 7.1 et 7.2) est un LTQ-orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Il est équipé du logiciel X calibur version 2.0.7 de l'année 2007 et couplé au système hybride HPLC et UPLC.



Figure 6.4 : Photographie du spectromètre de masse couplé à l'HPLC

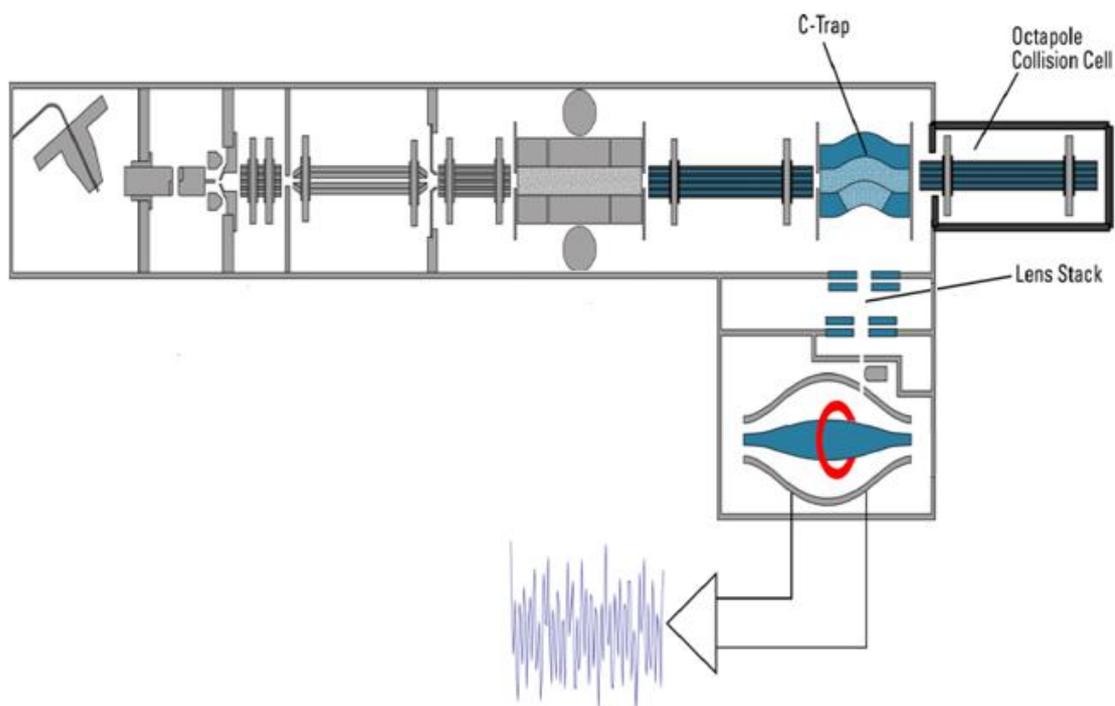


Figure 6.5 : Schéma de l'analyseur LTQ orbitrap XL

L'orbitrap XL est un robuste analyseur de masse qui peut fournir régulièrement à haute résolution la masse du composé analysé avec une grande précision. Il dispose d'une cellule de collision linéaire octopole dans lesquelles l'activation collisionnelle et la fragmentation peuvent être réalisées. Aussi utilise-t-il uniquement les champs électrostatiques pour confiner et analyser les populations d'ions injectés. De plus, son coût est relativement faible, de conception simple. Son intérêt réside dans les analyses pointues où une haute performance est requise. Les caractéristiques de l'orbitrap XL utilisé sont les suivantes :

Précision: 5ppm

Résolution ($m/z=1000$): 100000

Détecteur PDA

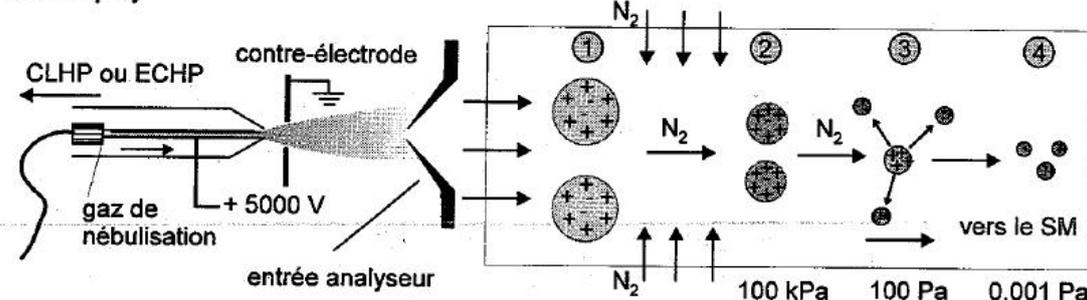
Sources: APCI, ESI et nanospray

➤ Ionisation

Nous avons utilisé la méthode d'ionisation par électrospray (ESI). Il s'agit de la dispersion d'un liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement (Rouassec ; 2009). Les gouttelettes sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice métallisé en surface et porté à un potentiel élevé positif (si l'on a choisi d'étudier les ions positifs). Le champ électrique intense leur confère une densité de charge (m/z) importante (figure 6.6). Par effet d'un gaz sec, elles s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. Leur densité de charge devenant trop grande, elles explosent en libérant des ions non fragmentés et protonés ou cationnés de l'analyte, porteurs d'un nombre de charges variables (environ 1 charge pour 1000 Da en masse). L'ionisation se fait à pression atmosphérique. L'électrospray est mis en œuvre pour des classes particulières de molécules, offrant des sites polaires ou ionisables. Ce mode d'ionisation a pour particularité de former des ions pseudo moléculaires polychargés qui peuvent être obtenus de plusieurs façons:

- En mode positif, ces ions sont souvent du type $(M + nH)^{n+}$ où les charges sont données par les protons. Des ions de cationisation (ou adduits) sont également observés. L'ionisation peut également être obtenue par perte de contre-anion.
- En mode négatif, la formation d'espèces ionisées s'obtient par déprotonation, anionisation ou perte de contre-cation.

électrospray



Ionisation à pression atmosphérique par électrospray (« ionspray »). Le capillaire de sortie porté à un potentiel élevé, conduit à un brouillard chargé (1). Les gouttelettes, en s'évaporant, provoquent une augmentation de la densité de charges électriques (2) au point qu'elles explosent en expulsant des molécules de l'analyte porteuses de plusieurs charges (3). Le diazote améliore le processus de concentration (4).

Figure 6.6 : Schéma de l'ionisation à pression atmosphérique par électrospray

Nous avons travaillé en mode positif. Nous avons choisi cette méthode car les conditions d'ionisation et la fragmentation sont décrites dans la littérature pour la conessine, alcaloïde stéroïdique isolé de l'écorce de la racine de *H. floribunda* (Shivali; 2007).

6.2. 1.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).

La RMN est une technique d'analyse qui tire ses informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon étudié quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant. Le document de base, fourni par tous les appareils est le spectre de RMN. Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité) conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur (Rouessac, 2009). Chaque spectre nous donne des informations spécifiques sur le squelette, sur les fonctions et leurs positions, sur la stéréochimie, sur le nombre d'hydrogène ou de carbone. La comparaison de ces informations avec d'autres données spectrales de molécules proches nous permet de déterminer la structure de la molécule (Silverstein; 1991).

Afin d'obtenir des informations concernant la structure des molécules complexes, on est amené à réaliser des expériences dites bi-dimensionnelles (RMN 2D). Il existe ainsi de nombreuses séquences impulsionsnelles qui permettent par exemple de corrélérer les signaux des noyaux couplés entre eux. Les séquences les plus classiques sont :

- La corrélation homonucléaire ^1H - ^1H COSY qui permet de détecter l'existence de couplages existant entre certains protons et d'identifier les signaux qui leur correspondent.
- La corrélation homonucléaire ^1H - ^1H NOESY qui vise à faire apparaître les effets entre les protons séparés par plusieurs liaisons mais spatialement proches.
- La corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HETCOR et HSQC qui permettent de corrélérer les signaux RMN ^1H à des signaux ^{13}C .

➤ RMN à 1-D

Spectre du proton (^1H)

- L'intégration des pics permet de déterminer le nombre total de protons et le nombre de protons correspondant à un pic donné
- La multiplicité des raies fournit des informations sur le nombre de protons portés par les carbones voisins (singulet, doublet, triplet).
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule grâce à la comparaison de leur déplacement chimique à ceux des tables de référence ou de la littérature.
- La constance de couplage entre les pics (J en Hz) permet de déterminer la position des protons les uns par rapport aux autres.

Spectre du carbone découplé (^{13}C)

- Le nombre de pics détermine le nombre de carbones (sauf si la molécule présente une symétrie)
- Le déplacement chimique des pics (δ en ppm) permet l'identification des groupements et fonctions de la molécule en le comparant à ceux des tables de référence ou de la littérature.

6.2.1.2.1. Matériels utilisés

- Spectromètre Bruker® 300, 300 MHz (^1H) et 75 MHz (^{13}C)
- Standard interne: TMS (tétraméthylsilane)
- Solvant: chloroforme deutéré (Aldrich Sigma®, Germany) et méthanol deutéré (Aldrich Sigma®, Germany)
- Logiciel de traitement de données: Spinworks 3

Préparation de l'échantillon: Nous avons dissout 3mg de composé dans 400 μl d'un mélange CDCl_3 -MeOD (2:1).

Type d'analyse effectué: RMN ^1H , RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC.

Nombre de scans: 1000 pour le ^1H , 16000 pour le ^{13}C , 64 pour COSY et 20 pour HSQC.

6.2.2. Résultats

6.2.2.1. LC-MS

L'analyse de nos fractions (I à V) par LC-MS nous a permis d'identifier quatre (4) composés différents (tableau 6.1).

Tableau 6.1 : Composés identifiés dans les fractions après la spectrométrie de masse

Fractions	Nature des composés élués	<i>m/z</i>
I	A, B	A: 332,26 B: 316,26
II	A, B, C,	C: 344,29
III	B, C, D	D: 330,28
IV	C, D	
V	D	

La figure 6.7 représente un chromatogramme de la fraction V après injection en LC-MS.

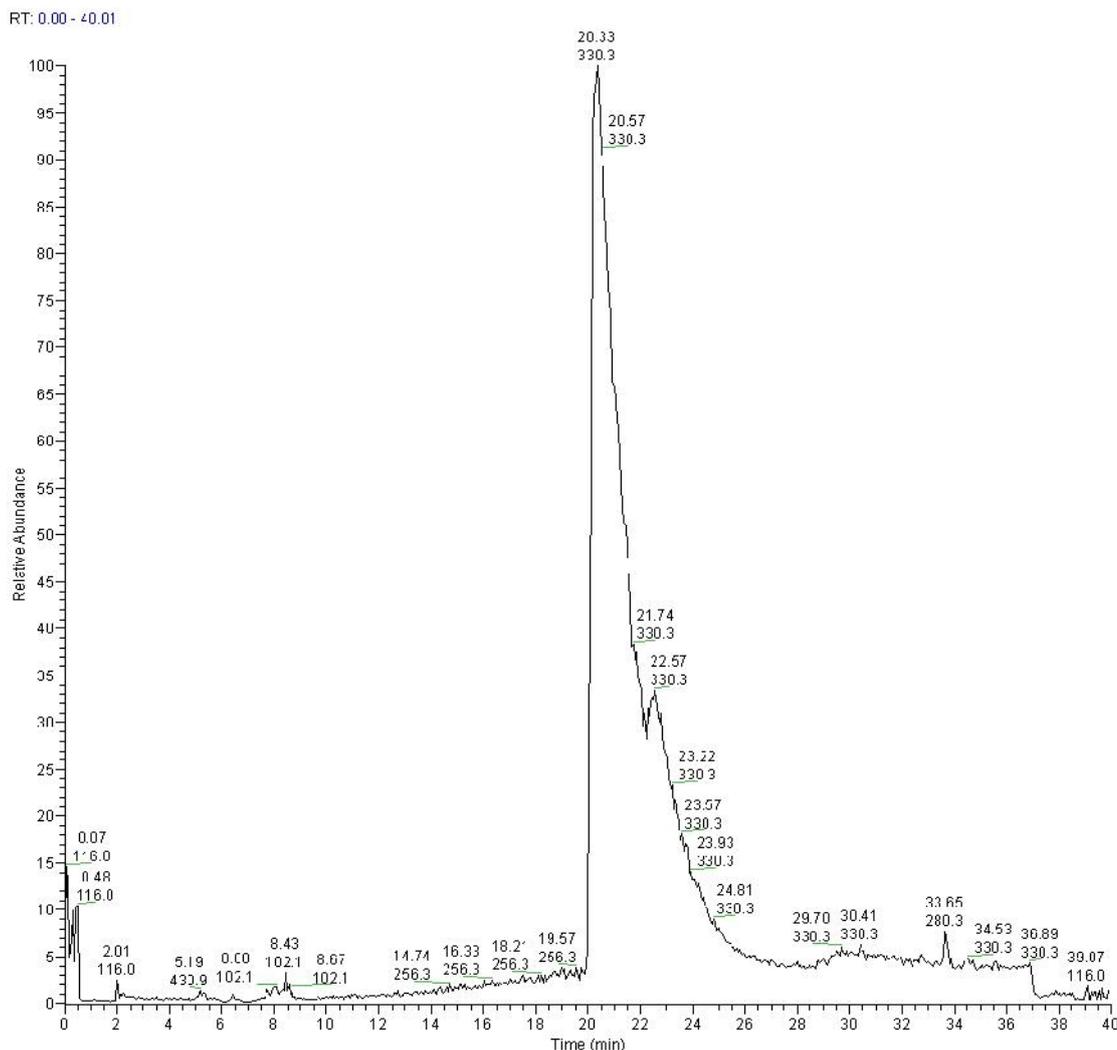


Figure 6.7 : Chromatogramme de la fraction V obtenu en mode positif avec appel d'ion, montrant le composé D (m/z : 330,3) ainsi que son TR.

- A l'issue des différentes séries de chromatographies, le composé D (m/z : 330,3) a été obtenu avec une pureté suffisante. Il est majoritaire. Nous déterminerons sa structure à partir des données de la RMN et de la spectrométrie de masse.
- Une autre étape de purification sera nécessaire pour séparer les composés A et B. Le composé C sort toujours de la colonne en présence du majoritaire D et de B. Nous n'avons pas pu les séparer.
- La fraction contenant les composés A et B a été rechromatographiée sur Séphadex LH20, mais nous n'avons pas pu les séparer.
- Vu que A et B se séparent bien en LC-MS, nous avons mis au point un gradient pour affiner leur séparation. Nous les avons ensuite séparés par HPLC-UV.

Nos composés n'absorbant pas en UV, nous avons identifié dans l'une des sous fractions un composé qui avait les mêmes temps de rétention qu'A et B et qui absorbait en UV à une longueur d'onde de 247 nm. Ce composé nous a servi de marqueur. Cela nous a permis de déterminer les temps de rétention de A et B et nous les avons collectés à la sortie du détecteur de la chaîne HPLC. Mais les quantités obtenues n'ont pas permis de poursuivre les autres analyses.

6.2.2.2. Spectrométrie de Masse

Les spectres de masse obtenus, nous ont fournis de nombreux renseignements sur les molécules analysées :

- Leur masse exacte ainsi que des propositions de formule brute ($C_cH_hO_nN_nX_x$). Nous avons travaillé en effet à haute résolution: $R= 30000$. Nous avons pu déterminer à partir de la formule brute, le nombre d'insaturation suivant la formule: $I= C-H/2 + N/2-X/2 +1$. C, H, N, X désignent respectivement le nombre d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'halogène.
- Des informations sur la structure de la molécule grâce à l'analyse des fragments (MS/MS)

Le tableau 6.2 ci-dessous récapitule les composés identifiés et présente les composés de même composition chimique retrouvés dans la littérature et identifiés dans des espèces de plantes de même genre, de même famille ou de *H. floribunda* comme mentionnés au chapitre V (figure 5.3).

Tableau 6.2 : Récapitulatif des composés identifiés par spectrométrie de masse.

m/z	Composition chimique retenue	Delta (ppm)	Alcaloïde stéroïdique de même m/z dans la littérature	Identifié dans
332,29 (A)	C ₂₂ H ₃₇ ON	0,93	Holaphyllinol Hollaphyllidine Funtumafrine	<i>H. floribunda</i> <i>Funtumia africana</i>
316,26 (B)	C ₂₁ H ₃₃ ON	1,04	Holamine Holaphyllamine	<i>H. floribunda</i>
344,29 (C)	C ₂₃ H ₃₇ ON	1.02	N, N- Diméthyl Holamine Méthyl Holaphylline	<i>H. antidysen-terica</i> <i>H. floribunda</i>
330,28 (D)	C ₂₂ H ₃₅ ON	1.39	Holadysamine Holaphylline	<i>H. floribunda</i>

D'après les données bibliographiques, des composés à m/z 316,26; 330,28; 332,29, 344,29 ont été déjà isolés de notre plante (Lebœuf; 1969, Goutarel; 1961) (tableau 6.2). Leur structure a déjà été établie (figure 5.3) et nous disposons d'informations sur les fonctions chimiques présentes dans ces molécules. Ces substances n'existent pas cependant en substances pures dans le commerce.

Seule l'analyse des fragments obtenus par MS/MS et des spectres RMN pourra nous permettre de confirmer ou d'infirmer l'identité de nos composés avec ceux déjà isolés.

6.2.2.2.1. Analyse des spectres et des fragments obtenus par MS/MS

- **Composé D** (m/z 330,28)

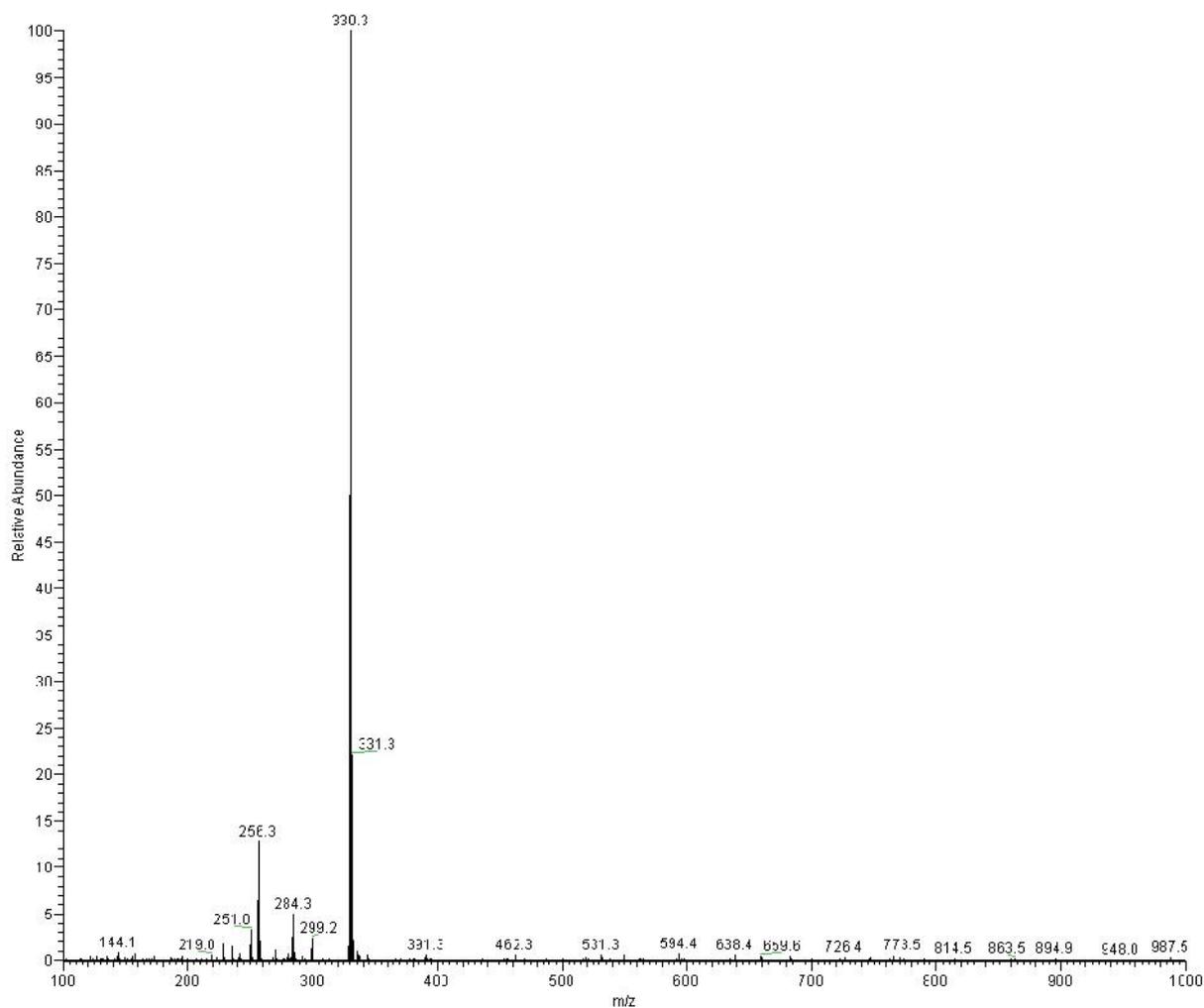
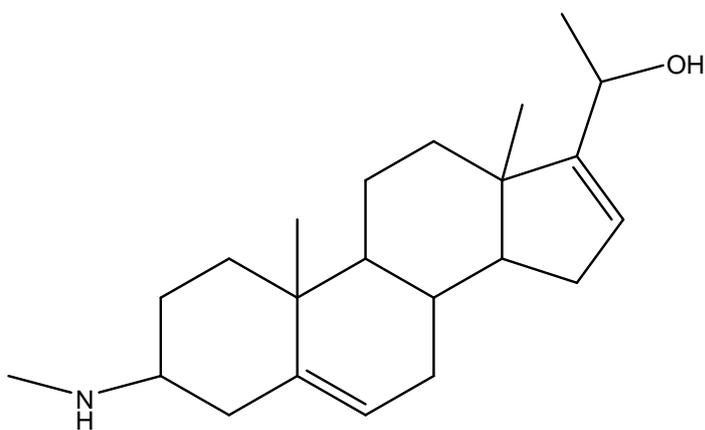


Figure 6.8 : Spectre de masse du composé D.



Chemical Formula: C₂₂H₃₅NO
Exact Mass: 329.27186

Figure 6.9 : Structure proposée pour le composé D

Composé D (m/z 330,28)

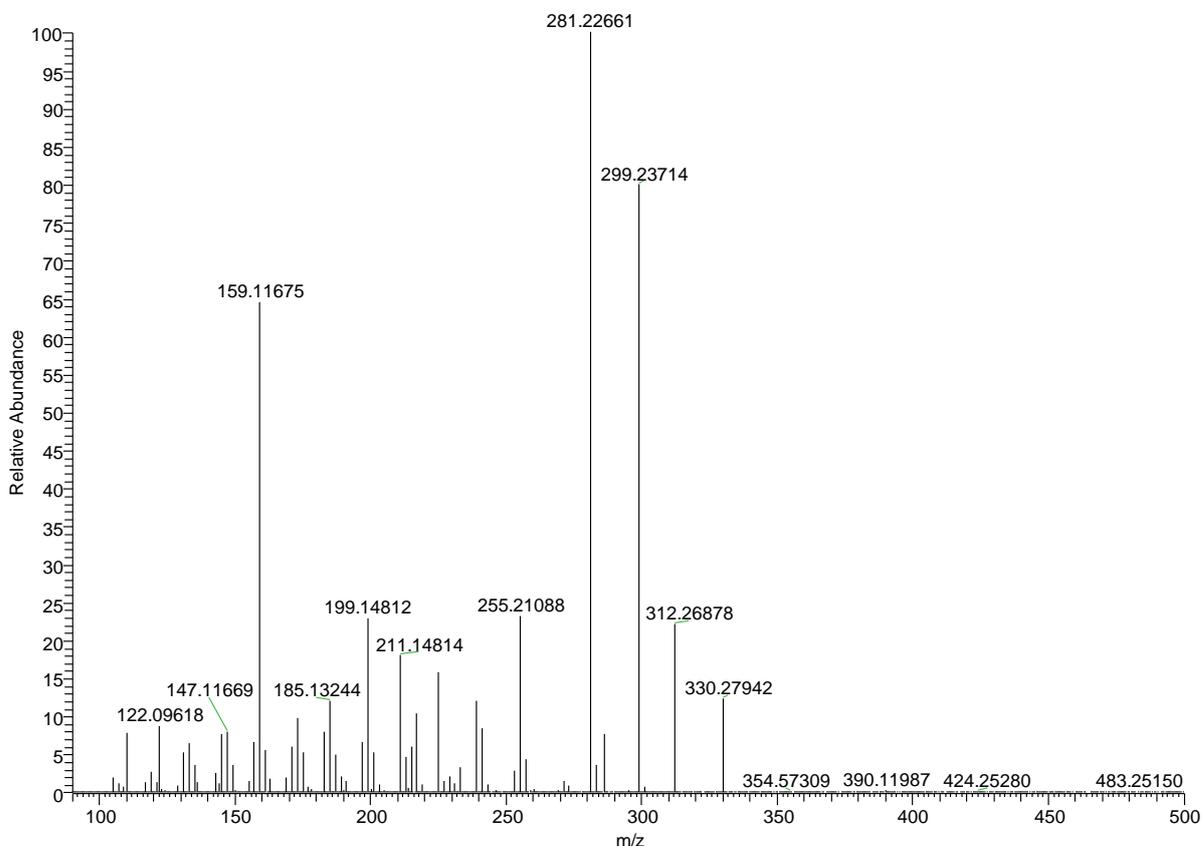


Figure 6.10 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé (D) à m/z 330,28 (mode positif).

De l'analyse de la figure 6.10 nous tirons les informations suivantes:

- Le fragment à m/z 312: correspond au fragment obtenu par perte de H_2O $[M - H_2O + H]^+$
- Le fragment à m/z 299 correspond au fragment obtenu après perte de NH_2CH_3 $[M - NH_2CH_3 + H]^+$
- Le fragment à m/z 281 correspond au fragment obtenu après perte de (NH_2CH_3, H_2O) $[M - NH_2CH_3 + H]^+$
- Le fragment à m/z 159 correspond au fragment obtenu après perte de $C_{10}H_{21}ON$ $[M - C_{10}H_{21}ON + H]^+$.

- **Composé C** (m/z 344,29)

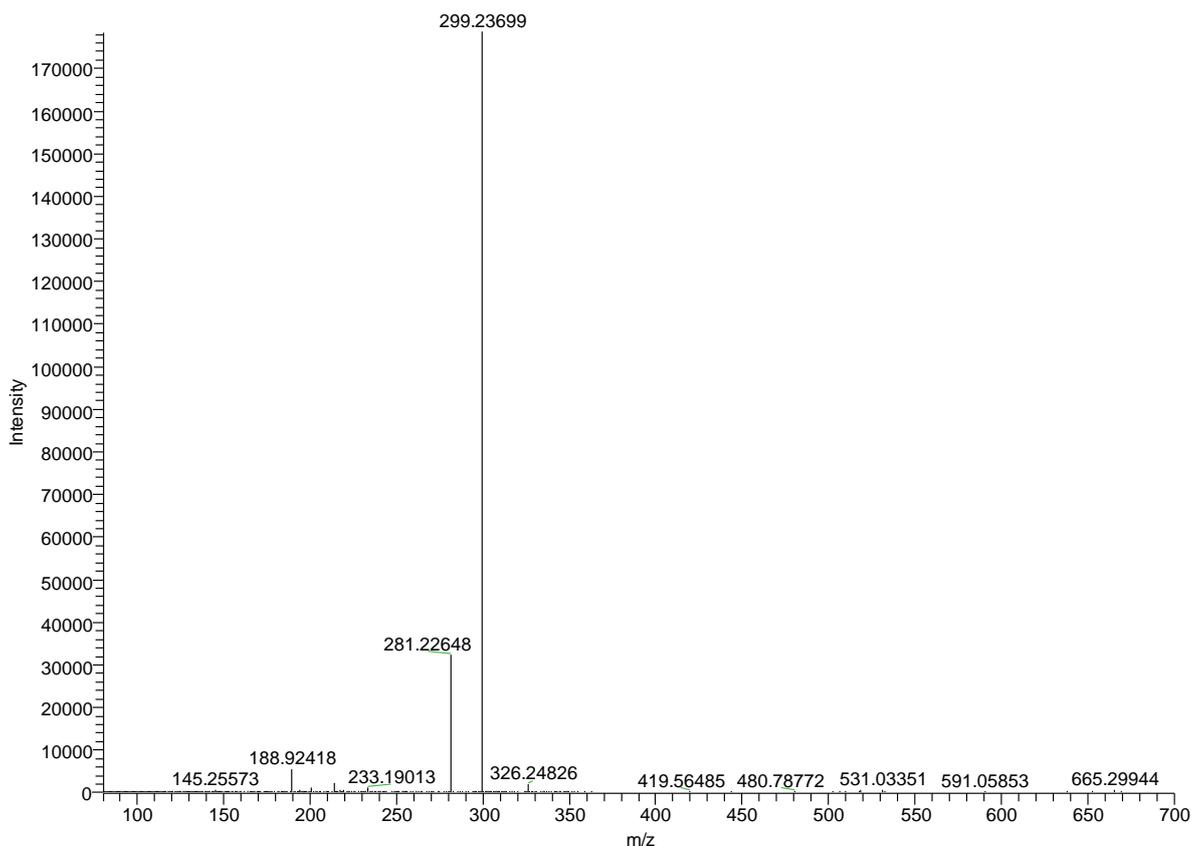
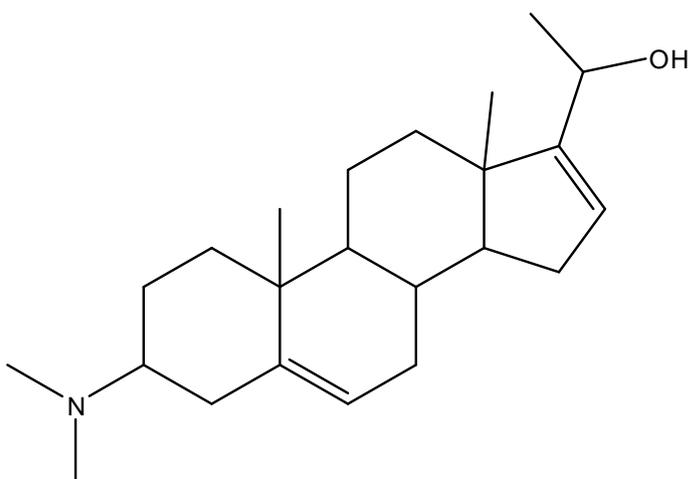


Figure 6.11 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à m/z 344,29.



Chemical Formula: C₂₃H₃₇NO
Exact Mass: 343.28751

Figure 6.12 : Structure proposée pour le composé C

L'analyse de la figure 6.11 nous montre quelques fragments spécifiques obtenus avec la MS² du composé C: m/z 299, m/z 281. Ainsi :

- le fragment à m/z 299 pourrait correspondre à $[M- NH(CH_3)_2+H]^+$
- Le fragment à m/z 281 pourrait correspondre à $[M- (NH(CH_3)_2, H_2O) +H]^+$
- Le fragment à m/z 326 pourrait correspondre à $[M- H_2O +H]^+$ La fragmentation de ce composé concorde bien avec la structure proposée ci-dessus. L'analyse des spectres RMN nous fixera d'avantage.

Composé B (m/z 316,26)

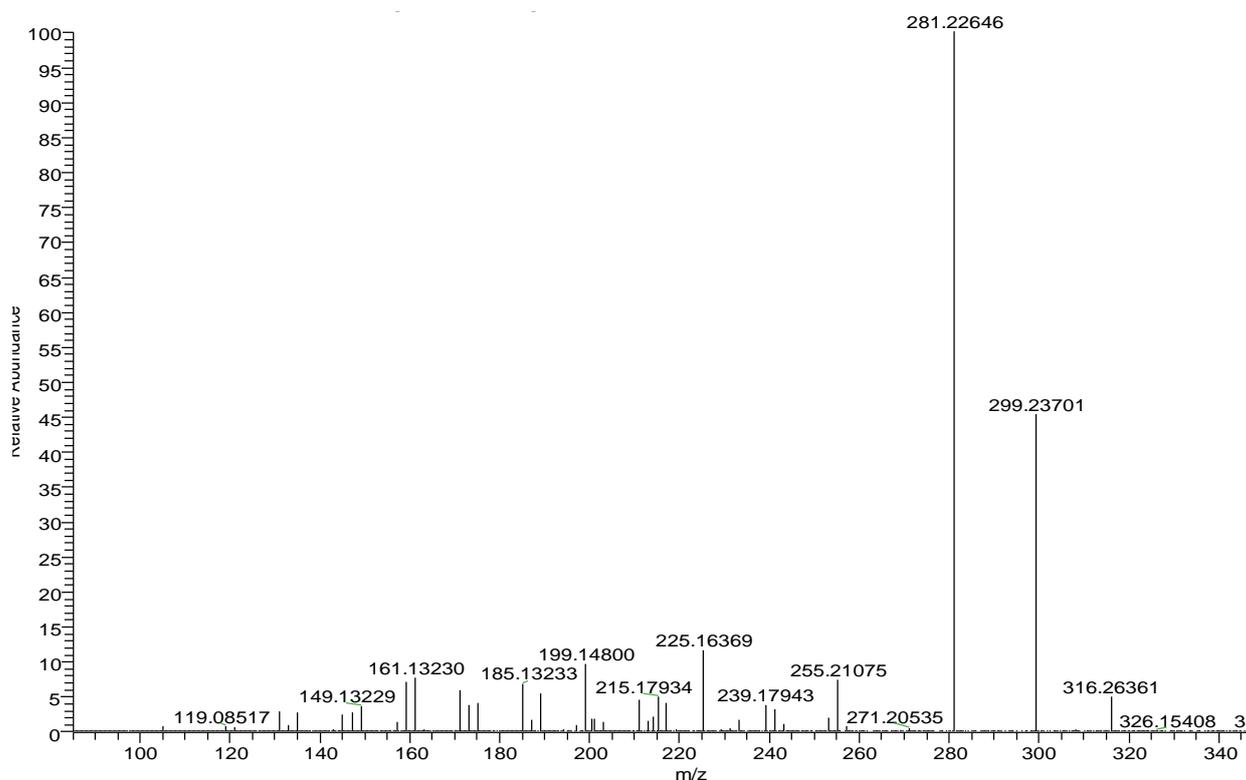
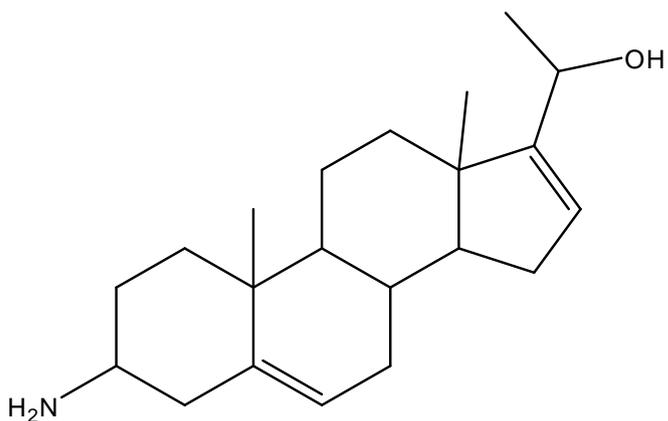


Figure 6.13. Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à m/z 316,26



Chemical Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}$
Exact Mass: 315.25621

Figure 6.14 : Structure proposée pour le composé B

L'analyse de la figure 6.13 nous montre quelques fragments spécifiques obtenus avec la MS^2 du composé B: m/z 299, m/z 281. Ainsi

- le fragment à m/z 299 pourrait correspondre $[\text{M} - \text{NH}_3 + \text{H}]^+$
- Le fragment à m/z 281 pourrait correspondre à $[\text{M} - (\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$

La fragmentation de ce composé concorde bien avec la structure du composé proposé ci-dessus.

- **Composé A** (m/z 332,26)

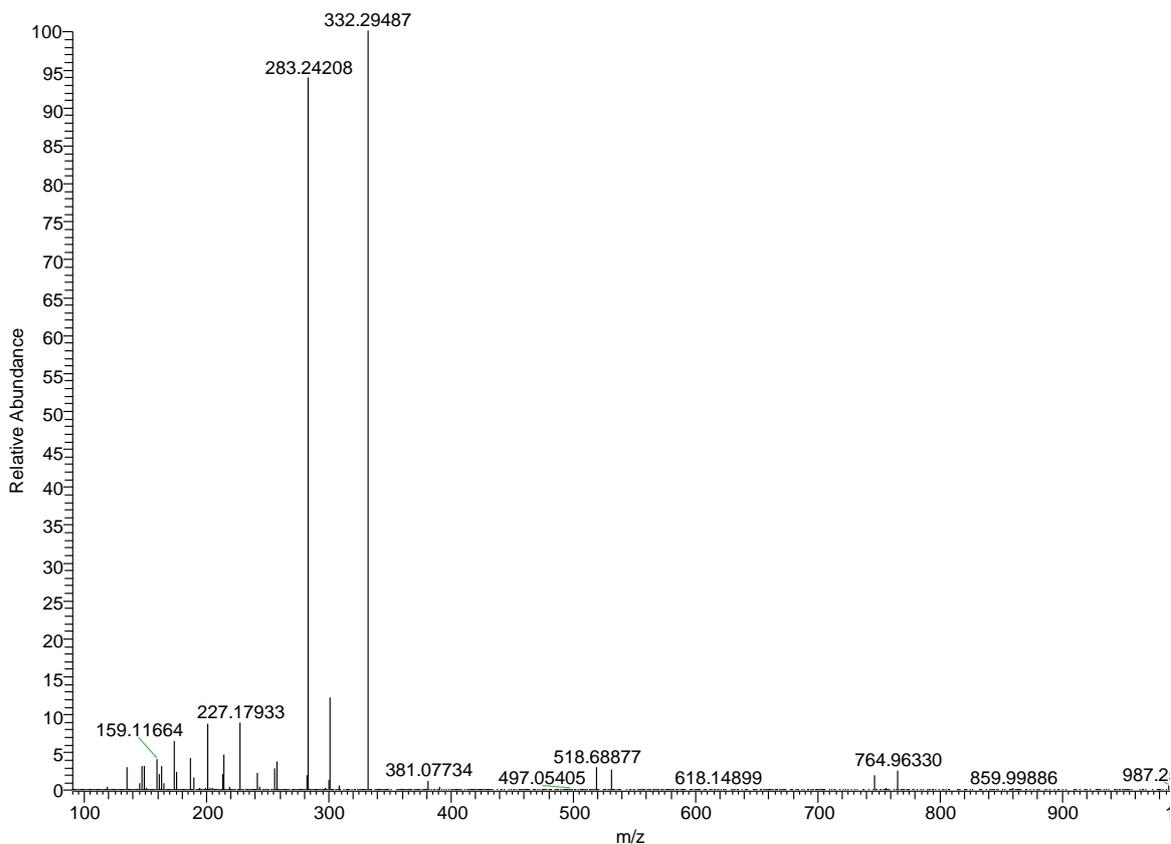
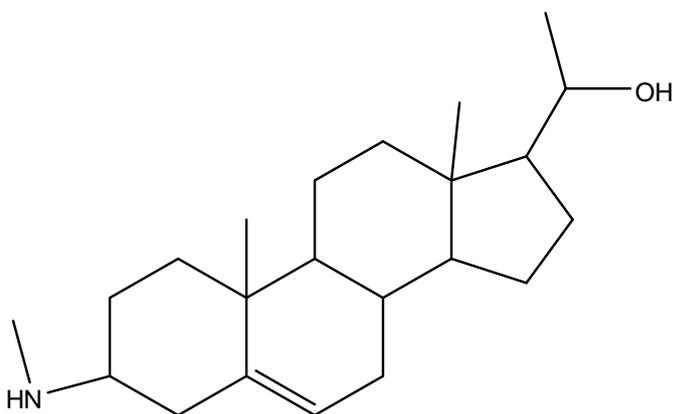


Figure 6.15 : Spectre de masse montrant les fragments spécifiques obtenus par MS/MS du composé à m/z : 332



Chemical Formula: $C_{22}H_{37}NO$
Exact Mass: 331.28751

Figure 6.16 : Structure proposée pour le composé A

L'analyse de la figure 6.15 nous montre des fragments spécifiques à m/z 283 et m/z 159. Ainsi :

- le fragment à m/z 283 pourrait correspondre à $[M-(NH_2CH_3, H_2O) +H]^+$
- Le fragment à m/z 161 correspond au fragment obtenu après perte de $C_{10}H_{21}ON$ $[M- C_{10}H_{21}ON +H]^+$

6.2.2.3. Résonance magnétique nucléaire.

Vu les faibles quantités de produits obtenus, seul le produit **(D)** a été analysé par RMN. Le tableau 6.3 nous donne les valeurs des déplacements chimiques des protons comparés à celles de la littérature.

Tableau 6.3 : Données spectrométriques 1H RMN du composé D dans $CDCl_3$ -MeOD (2:1) comparées à celles de la base de données et de la littérature.

N° de Carbone caractéristiques	Déplacement chimique (δ ppm) 1H (mesuré)	
	(Yemoa A; 2011)	(Lebœuf M; 1968)
18 (CH ₃)	0.67	0.68
19 (CH ₃)	1.04	1.01
21 (CH ₃)	1.21	1.23
3 β NH-(CH ₃)	2.41	2.46
6 (H oléfinique)	5.41	5.31
20 (H)	4.5	-

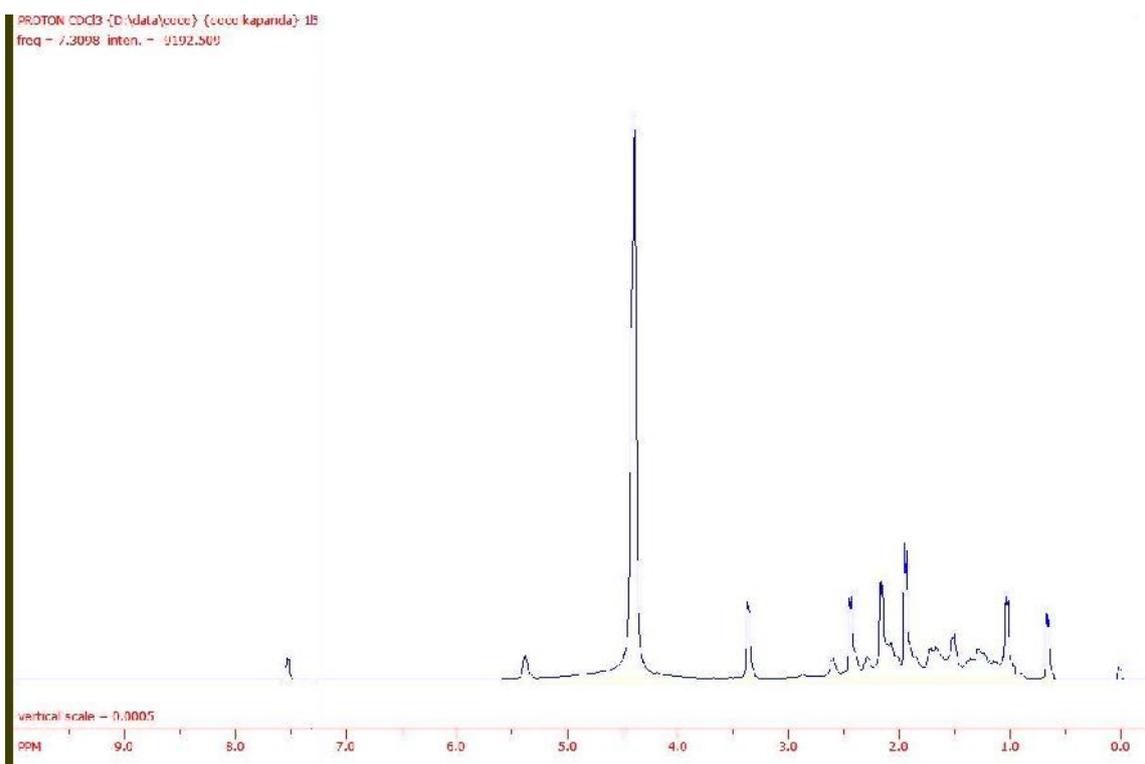


Figure 6.17 : Spectre RMN du ¹H.

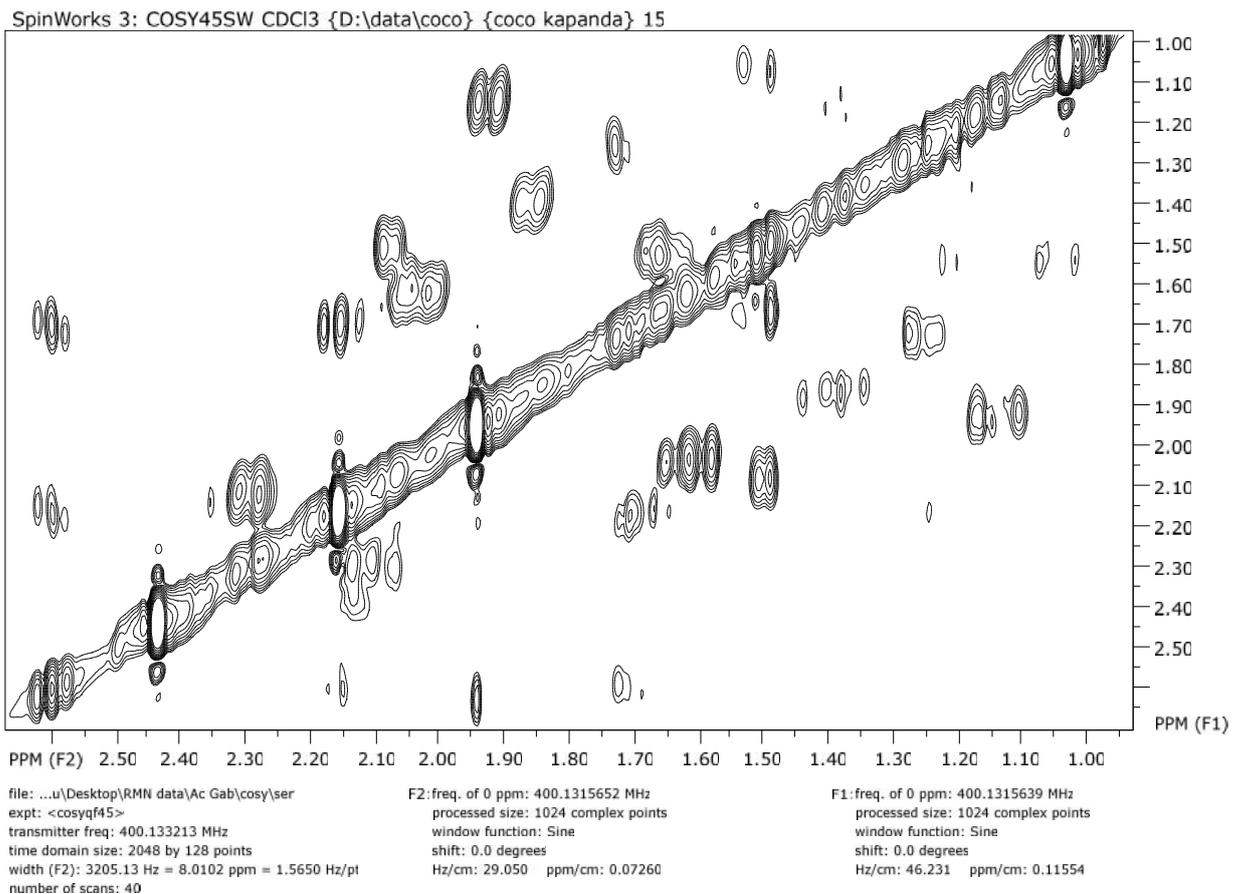


Figure 6.19 : Spectre RMN montrant la corrélation homonucléaire ^1H - ^1H COSY.

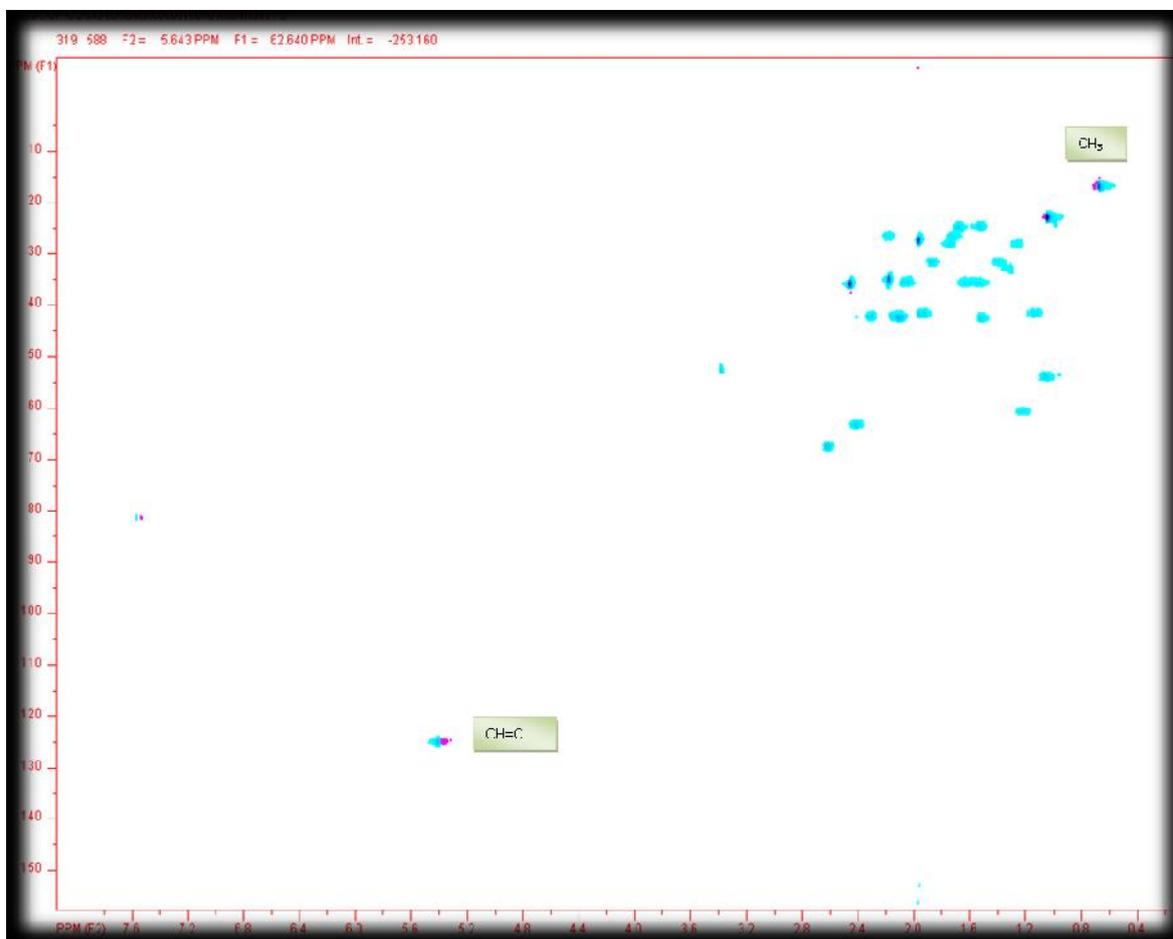


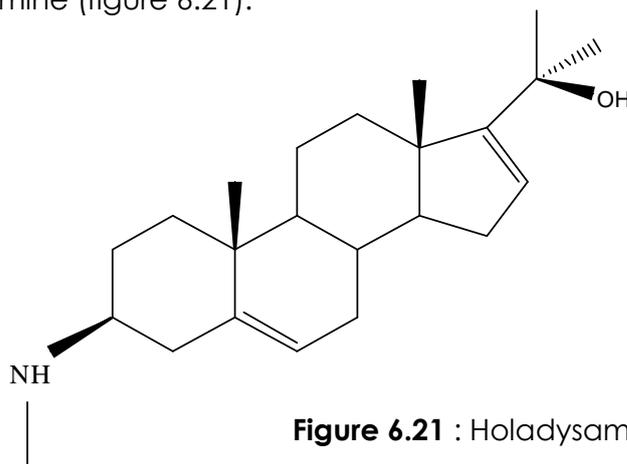
Figure 6.20 : Spectre RMN montrant la corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HSQC

Tableau 6.4 : Données spectrométriques ^1H , ^{13}C RMN du composé D dans CDCl_3 -MeOD

N° de Carbone	Déplacement chimique composé D (Spectre observé)	
	δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C
1	0,673	27
2	1,3	28,24
3	2,61	67
4	2,17	36
5	—	—
6	5,41	125,10
7	1,79	29
8	1,50	35,04
9	1,52	42,654
10	—	—
11	1,54	25
12	1,79	38
13	—	42,54
14	1,06	54,10
15	2,1	35,08
16	5,42	125
17	—	153,074
18	0,67	18,3
19	1,042	22
20	4,5	67,66
21	1,231	22
3 β NH-(CH ₃)	2,41	62

A l'issue de la spectrométrie de masse et d'après l'analyse des spectres RMN ci-dessus, nous tirons les conclusions suivantes:

- Quatre (4) composés différents sont présents dans les fractions analysées.
- L'analyse des spectres obtenus, la comparaison des déplacements chimiques des protons mesurés (Tableaux 6.3 et 6.4) avec ceux disponibles dans la littérature nous permet de confirmer la structure du composé **D**. Il s'agit bien d'holadysamine (figure 6.21).


Figure 6.21 : Holadysamine.

Les (3) autres composés ont les mêmes masses moléculaires que les composés suivants déjà isolés de *H. floribunda* et rapportés dans la littérature (Leboeuf; 1969, Goutarel; 1961, Goutarel; 1962): holaphyllinol, holaphyllidine (M: 331,29), holamine, holaphyllamine (M : 315,26) ; méthyl holaphylline, N,N-diméthylholamine (M : 343,29). En tenant compte des spectres de masse, nous faisons les propositions structurales ci-dessous (figure 6.22). Ainsi, le composé **A** (M: 331,29) pourrait être l'holaphyllinol ou l'holaphyllidine (figure 5.3). Mais les composés B (M: 315,26) et C (M : 343,28) ne pourraient être ni l'holamine ou l'holaphyllamine ni le méthyl holaphylline, ou le N,N-diméthylholamine car nous notons la perte d'une molécule d'eau lors des fragmentations en masse; ce qui nous oriente vers la fonction alcool et non vers la fonction cétone présente dans ces derniers.

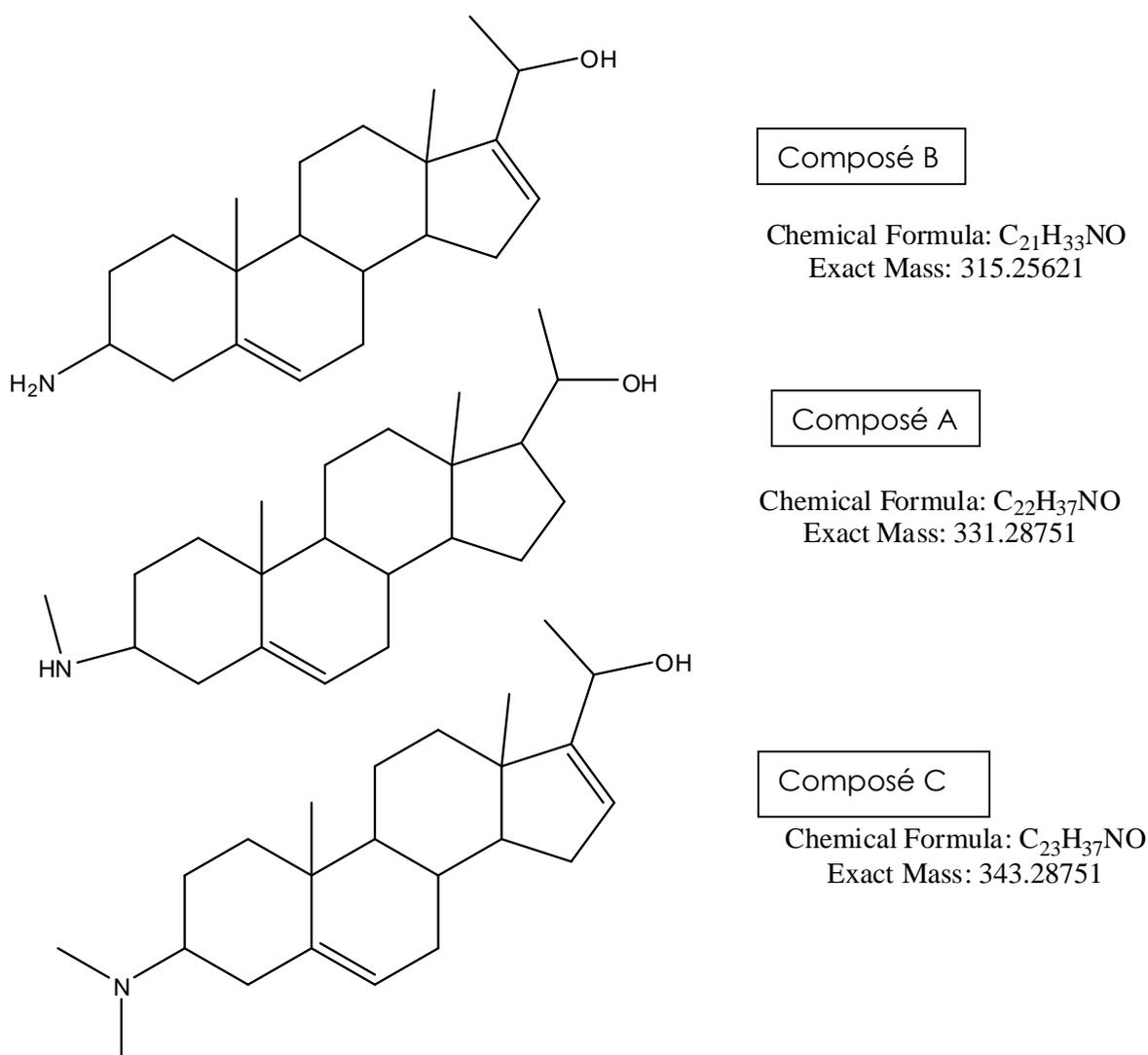


Figure 6.22 : Propositions de structures des composés A, B, C

6.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FRACTIONS I A IV ET DE L'HOLADYSAMINE (COMPOSE D) SUR M. ULCERANS

Pour définir si les alcaloïdes identifiés étaient responsables de l'effet inhibiteur de la croissance de *M. ulcerans* nous avons testé le composé D et les fractions contenant A, B, C, D sur la même souche que celle utilisée lors du screening mycobactériologique: la souche de *M. ulcerans* ATCC 19423. Le test a été effectué au laboratoire de mycobactériologie de l'IMT d'Anvers. L'activité *in vitro* sur *M. ulcerans* est exprimée en CMI. La CMI est déterminée par la technique REMA (Resazurin Microtiter Assay) que nous avons décrite précédemment (chapitre IV). Le tableau 6.5 présente les différentes CMI obtenues.

Tableau 6.5 : Résultats des tests d'activité biologique.

Fractions/composé/Témoin	CMI
DCM (enrichie en alcaloïdes)	62,5 µg/ml
I	>50µg/ml
II	>50µg/ml
III	>50µg/ml
IV	>50µg/ml
Composé D(Holadysamine)	50 µg/ml
Rifampicine	2 µg/ml

L'holadysamine est actif *in vitro* sur *M. ulcerans* à 50 µg/ml. Cette CMI est largement supérieure à celle de la rifampicine qui représente le témoin (2 µg/ml) mais inférieure à celle de l'extrait brut.

6.4. CONCLUSION

Le traitement traditionnel de l'UB est le premier recours des malades atteints de cette maladie pour des raisons économiques et socio-culturelles (Johnson; 2004). A Ouinhi, les praticiens de cette médecine nous ont permis de constituer un répertoire de 49 plantes différentes qu'ils utilisent sous diverses associations et diverses préparations. *Erythrophleum suaveolens* (Guill. et Perr.) et *Strophanthus hispidus* DC sont les plantes les plus utilisées mais elles n'ont pas été les plus actives *in vitro* sur *M. ulcerans*. Ainsi nous avons choisi *H. floribunda* qui est la plante dont l'extrait hydro éthanolique a été le plus actif *in vitro* sur *M. ulcerans* avec une CMI de 125 µg/ml.

La première étape de ce travail consistait à rechercher les grands groupes de composés chimiques responsables de cette activité. Ainsi nous avons montré que les feuilles (parties utilisées) renferment des alcaloïdes, des terpènes et stéroïdes, des saponosides et des tanins. Ces résultats sont en concordance avec les données bibliographiques qui rapportent que plusieurs alcaloïdes ont été isolés des feuilles de cette espèce végétale (Lebœuf; 1969).

Nous avons ensuite décidé de procéder à un fractionnement bio guidé. Ainsi, des quatre différentes fractions obtenues (HEX, DCM, ACE et AQ), c'est la fraction DCM qui s'est montrée active. Une analyse par chromatographie sur couche mince analytique de cette fraction a révélé sa richesse en alcaloïdes, en stéroïdes et terpénoïdes. La littérature nous rapporte que des alcaloïdes de cette plante sont actifs *in vitro* sur *M. tuberculosis* avec une CMI de 0.075 g/l (Lambin; 1953).

L'extraction spécifique des alcaloïdes en milieu organique à pH=11-12, nous a permis d'avoir une fraction alcaloïdique totale active sur *M. ulcerans* et une fraction hexanique riche en stéroïdes et terpénoïdes non active sur *M. ulcerans* à faible concentration.

L'extrait alcaloïdique total a été purifié après une série de chromatographies liquides: à pression atmosphérique (CLPA) et à pression moyenne (MPLC). La structure du composé majoritaire isolé a été confirmée par plusieurs analyses spectrales: spectrométrie de masse (LC-MS), résonance magnétique nucléaire (RMN): il s'agit de l'holadysamine.

De ces fractionnements MPLC, nous avons identifié trois autres alcaloïdes dont les formules chimiques et les masses exactes sont : (C₂₂H₃₇ON; 331.28),

(C₂₃H₃₇NO; 343.28), (C₂₁H₃₃NO; 315.25). Les fractions contenant ces alcaloïdes n'ont pas été actives sur *M. ulcerans* à 50µg/ml. Des propositions de structure ont été faites pour ces molécules par étude de la fragmentation en spectrométrie de masse. Mais comme nous n'avons pas pu en isoler en quantité suffisante, ces structures doivent être confirmées, principalement pour celles identifiées pour la première fois dans cette plante.

L'holadysamine, seul alcaloïde isolé à l'issue de nos travaux sur *H. floribunda* présente *in vitro* sur *M. ulcerans* une meilleure activité que l'extrait brut. Comme il s'agissait du composé majoritaire et qu'il présente une activité antimycobactérienne, nous avons décidé de mettre au point une méthode de quantification de ce composé.

VII.

*ESSAIS PRELIMINAIRES DE
DEVELOPPEMENT ET DE VALIDATION
D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION*

Le but de cette partie était de quantifier l'holadysamine, composé actif sur *M. ulcerans* isolé de *H. floribunda*. Pour ce faire, il est indispensable de développer et de valider une méthode fiable, rapide, et peu coûteuse. Nous avons choisi de développer une méthode de chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) car elle répond bien d'une part aux critères énumérés ci-dessus mais d'autre part elle a été utilisée avec succès pour la conessine, alcaloïde stéroïdique isolé de l'écorce du tronc et de la racine de *H. floribunda* (Duez, 1986). De plus, l'équipement est moins coûteux que l'HPLC et permet le dosage de plusieurs échantillons en même temps.

La chromatographie sur couche mince à haute performance est une méthode de séparation dans laquelle les constituants migrent sur une phase stationnaire entraînés par une phase mobile ou éluant en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire utilisée ici est du gel de silice 60F254 (Merck®; Germany). L'intérêt de l'HPTLC réside aussi dans le fait que la granulométrie des particules est inférieure à la TLC. Le pouvoir de séparation est donc nettement amélioré.

A. GENERALITES SUR LA VALIDATION

7.1. OBJECTIF DE LA VALIDATION

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. En d'autres termes, la validation a pour objectif de démontrer les performances de la technique de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont fiables et ce, dans les limites bien définies.

7.2. DIFFERENTES PHASES DE LA VALIDATION

Il est communément admis que la mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer en quatre (4) phases successives:

- Une phase de développement
- Une phase de prévalidation
- Une phase de validation
- Une phase d'application en routine

7.2.1. Phase de Prévalidation

L'objectif de la prévalidation est de préparer tous les éléments qui sont nécessaires à la validation de la méthode. Elle doit permettre d'identifier la fonction de réponse comme courbe de calibration, de définir le seuil de détection, d'estimer les seuils de quantification, d'évaluer l'intervalle de dosage ainsi que le nombre de points de la gamme de calibration, de déterminer le rendement d'extraction (absolu de préférence) et de vérifier la sélectivité.

7.2.2. Phase de validation

Son objectif est de valider le modèle de calibration qui sera utilisé lors de l'analyse en routine, de vérifier la linéarité, d'estimer l'exactitude, d'estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) et de valider le seuil de quantification.

7.3. DEFINITION DES CRITERES DE VALIDATION

7.3.1. Spécificité-Sélectivité

La sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon. Dans le cadre des méthodes chromatographiques, il est préférable de parler de sélectivité (Vessman; 1996).

7.3.2. Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

Une procédure est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la réponse.

7.3.3. Fonction de réponse: Courbe de calibration

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée courbe de calibration.

7.3.4. Limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites dans la procédure.

7.3.5. Récupération ou rendement d'extraction

Le rendement d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue et d'autre part après l'injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner.

Le rendement d'extraction absolu est un critère important pour les procédures nécessitant une extraction préalable du principe actif.

7.3.6. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux: la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire).

7.3.6.1. Répétabilité

Ce sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

7.3.6.2. Fidélité intermédiaire

Ce sont les conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs, utilisant des équipements différents et/ou pendant un intervalle de temps donné.

7.3.6.3. Reproductibilité

Ce sont les conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

7.3.6.4. Justesse (Biais)

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnelle vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (exemple: standard international, standard d'une pharmacopée).

La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais ou de pourcentage de recouvrement (erreur systématique).

7.3.6.5. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

7.3.6.6. Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

7.3.6.7. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à sa fidélité, son exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

B- STRATEGIE UTILISEE

Nous avons choisi de valider notre technique selon la stratégie proposée par la Société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) (Commission SFSTP ; 2003). Ce protocole a été initialement développé pour l'analyse des échantillons biologiques mais peut aisément s'appliquer aux méthodes utilisées dans l'industrie agroalimentaire ou celles utilisées dans l'environnement.

7.4. PHASE DE PREVALIDATION.

7.4.1. La sélectivité

Nous avons pris en compte ce critère lors du choix du réactif de révélation car notre composé n'absorbe pas en UV. Ainsi le composé à quantifier (holadysamine) étant un alcaloïde, nous avons choisi le réactif de Dragendorff pour la révélation de nos plaques TLC. Cependant ce réactif va révéler différents alcaloïdes, qu'il faudra donc séparer par HPTLC.

7.4.2. Etablissement de la fonction de réponse

Etablir la fonction réponse consiste à déterminer la proportionnalité existant entre la réponse chromatographique (y) exprimée en unités arbitraires de surface sous courbe ou de hauteur de pic et la teneur en analyte. Cette fonction peut être linéaire ou non (Pharmacopée Européenne ; 2011). La fonction de réponse est établie à partir de trois (3) gammes de calibration. Chaque point de gamme étant répété 3 fois. Compte tenu du coût élevé des produits de référence, une

seule solution mère est préparée par série, à partir de laquelle les solutions filles sont préparées de façon indépendante. Dans ce travail nous utiliserons comme produit de référence la conessine, alcaloïde isolé de l'écorce du tronc de *H. floribunda* et disponible en substance pure dans le commerce (Extrasynthèse®, France). Le volume déposé est constant (5µl). Les trois séries ou «gammes de calibration» sont analysées de façon indépendante.

L'ensemble des réponses obtenues pour les trois séries sera représenté graphiquement, c'est-à-dire en reportant l'absorbance obtenue en fonction de la quantité de composé déposé. La relation entre l'absorbance et la quantité déposée est également recherchée pour chaque série.

7.4.3. Limite de détection

Une façon de déterminer la limite de détection (LOD) est de considérer qu'elle correspond à la concentration dont la réponse équivaut à l'amplitude du bruit de fond multipliée par trois (3). En d'autre terme, La **LOD** correspond à la quantité d'analyte déposée pour laquelle le rapport signal / bruit (S/N) est égal à 3 (Pharmacopée Européenne; 2011). Cette approche s'applique bien aux techniques chromatographiques que nous avons utilisées.

7.4.4. Détermination de la limite de Quantification (LOQ)

La **LOQ** correspond à la quantité d'analyte déposée pour laquelle le rapport signal / bruit (S/N) est égal à 10 (Pharmacopée Européenne; 2011). C'est la petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions décrites avec une exactitude définie.

7.4.5. Mise au point de la technique de dosage :

7.4.5.1. Essais préliminaires

Les analyses ont été effectuées sur des plaques 10x10 de Silicagel 60 F254 (Merck®, Germany).

Dépôt : La largeur des bandes du dépôt est de 6mm et l'espace entre les bandes est de 11,7mm. Les premiers et derniers dépôts sont à 15mm de chaque bord.

Essai déposé: 5µl, 6µl d'extrait dissout dans le méthanol à 2mg/ml ont été déposés à l'aide du déposeur automatique (ATS CAMAG®:Switzerland).

Développement: les plaques sont séchées à l'air libre pendant 5 minutes puis développées dans des cuves horizontales (Chamber, 10x10cm, DESAGA ®; Switzerland) saturées avec 3ml de phase mobile: toluène-acétate d'éthyle-diéthylamine (60:30:10) pendant environ 45 minutes. Deux (2) ml supplémentaires de phase mobile sont utilisés pour faire éluer les composés.

Révélation: Après le développement, les plaques sont séchées pendant 5 minutes, révélées par le réactif de Dragendorff à l'aide du Camag Immersion Devise III (CAMAG® Switzerland) et lues au scanner (Camag ® TLC Scanner III; Switzerland) à 570 nm. Les données sont acquises et traitées par le logiciel Wincats® 1.3.0 version (CAMAG® Switzerland). Le mode de lecture utilisé est le mode absorption-résorption et la gamme de longueur d'onde varie de 200 à 700 nm.

Nous avons testé différentes distances de migration afin de voir à laquelle nous aurons une meilleure séparation: 7cm, 7,5cm et 8 cm. Les figures ci-dessous illustrent les séparations obtenues à ces différentes distances de migration.

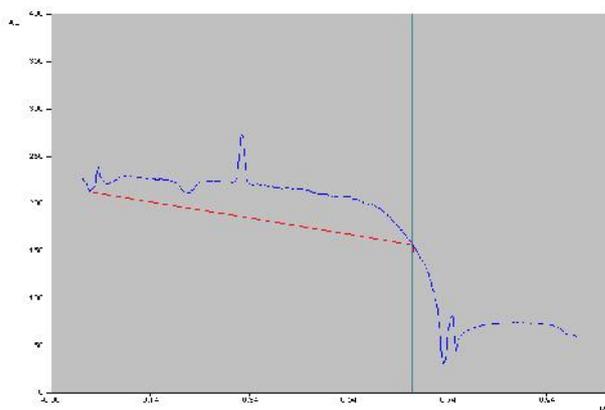


Figure 7.1 : Chromatogramme obtenu avec une distance de migration de 7 cm

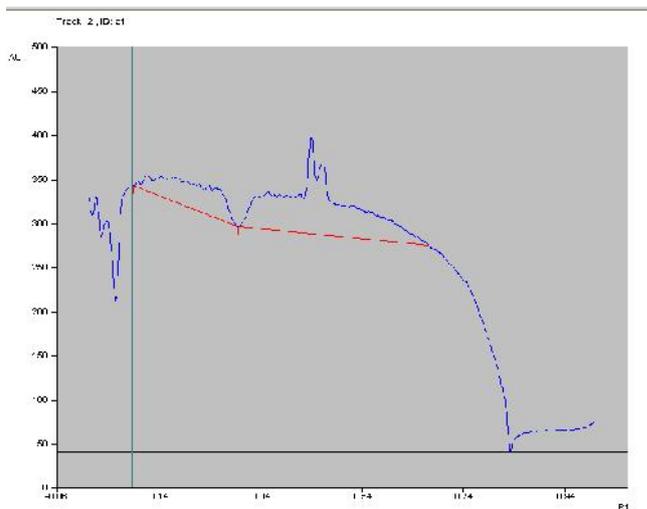


Figure 7.2 : Chromatogramme obtenu à une distance de migration de 8 cm

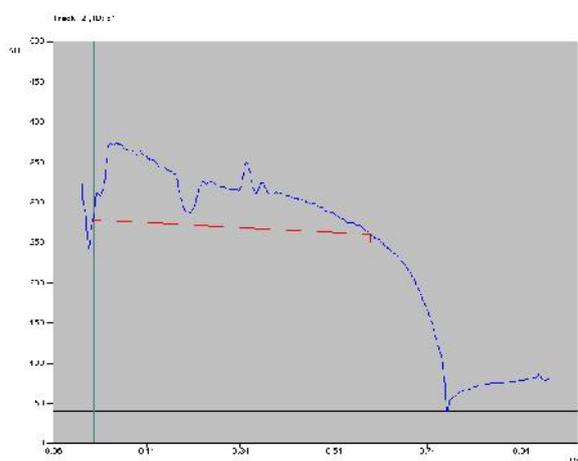


Figure 7.3 : Chromatogramme obtenu à une distance de migration de 7,5 cm

De l'analyse de ces chromatogrammes, nous trouvons que sur les distances de migration de 7,5 cm et de 8 cm, il y a un début de séparation des composés de l'extrait. Par contre nous ne notons pas de séparation à une distance de migration de 7 cm.

Nous avons décidé de vérifier la répétabilité de la séparation. Ainsi nous avons repris l'opération pendant plusieurs jours successifs et plusieurs fois de suite. Les résultats sont présentés sur les chromatogrammes ci-dessous.

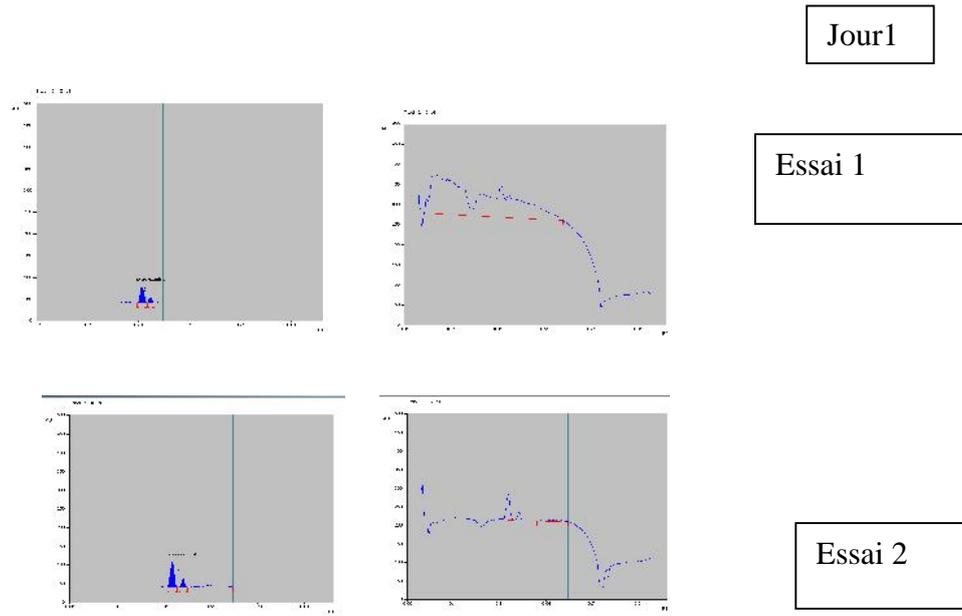


Figure 7.4 : Essai à J1

Nous notons une légère séparation à J_1 mais nous n'observons pas tous les pics représentant les quatre différents alcaloïdes.

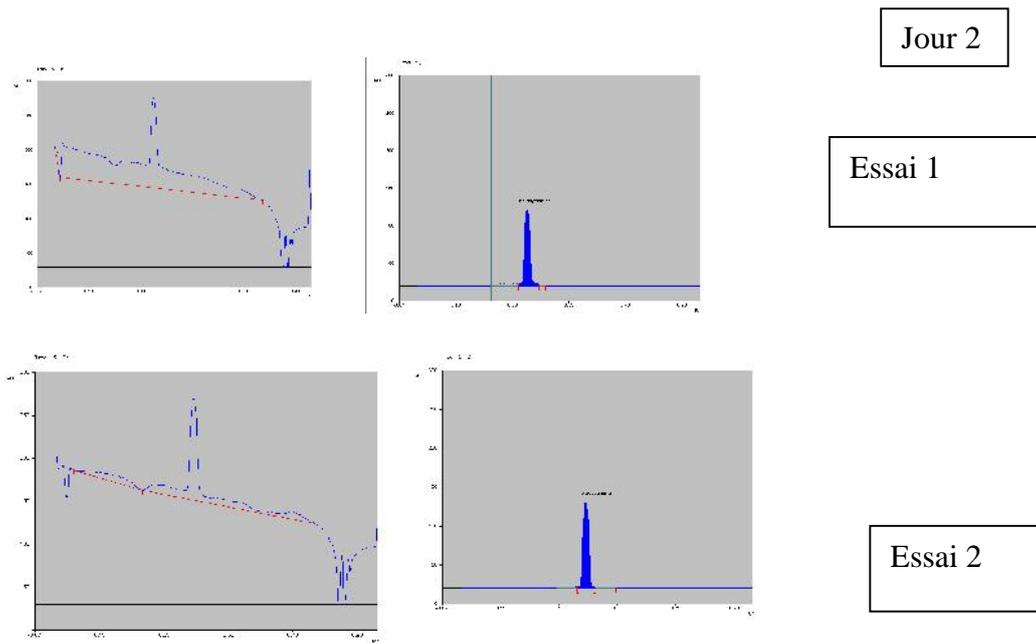


Figure 7.5 : Essai à J_2

Nous ne notons pas de séparation à J_2 .

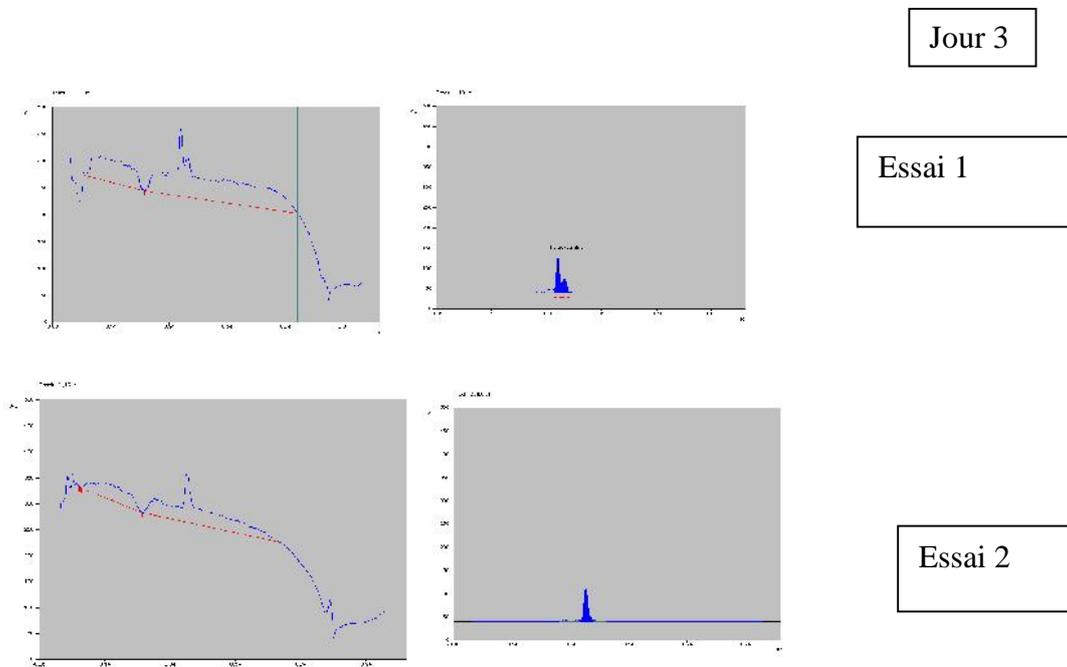


Figure 7.6 : Séparation à J_3

Nous avons une légère séparation à J₃ sur un des deux essais effectués à J₃. Au regard de ces différents essais préliminaires, nous pensons que la séparation n'est pas encore bonne sur nos plaques HPTLC utilisées. Nous devons donc revoir une série de paramètres pour affiner la séparation notamment : le système solvant, le pH.

7.5. CONCLUSION

L'objectif de la prévalidation est de préparer tous les éléments qui sont nécessaires à la validation de la méthode. Nous notons un problème de séparation de l'holadysamine sur les plaques HPTLC dans les conditions opératoires que nous avons développées. Il sera donc nécessaire de travailler sur certains paramètres afin d'affiner la séparation, car cette étape est capitale avant tout développement de méthode de dosage. Nous avons donc en perspective de revoir notre système chromatographique afin de préparer tous les éléments nécessaires à la validation de notre méthode de quantification de l'holadysamine par HPTLC. Au cours de la phase de validation, nous aurons à étudier :

- La fonction de réponse
- La fidélité de la technique
- La répétabilité de la procédure
- La justesse de la technique
- La justesse de la procédure
- La détermination de la limite de quantification.

Par manque de temps, cela n'a pu être réalisé dans le cadre de cette thèse.

VIII.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif général de cette thèse est d'identifier et d'isoler des composés naturels extraits de plantes entrant dans le traitement traditionnel de l'UB et actifs sur l'agent étiologique: *M. ulcerans*. Dans ce chapitre, nous discutons les résultats obtenus lors des différents travaux dans les détails, les analysons à la lumière de résultats publiés et d'études complémentaires ou semblables réalisées par d'autres auteurs et aussi présentons-nous les forces et limites de ces travaux, suivis de recommandations, ouvrant ainsi la voie à d'autres recherches futures.

8.1. IDENTIFICATION DES PLANTES

L'identification des plantes était l'un de nos objectifs spécifiques. Cela a nécessité une enquête ethnobotanique auprès de 17 tradipraticiens parmi ceux supposés recevoir et traiter des malades atteints d'UB. Ainsi les résultats attendus de notre enquête étaient de recenser les différents composants entrant dans ce traitement, de répertorier les plantes utilisées, ainsi que de préciser les modes de préparation et d'administration des remèdes à base de ces plantes.

Les résultats obtenus sont repris dans la publication suivante: Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin (Yemoa; 2008).

8.1.1. Limites de notre étude

L'enquête a été limitée à une seule commune endémique d'UB. Elle aurait pu s'étendre à d'autres communes endémiques comme Lalo (dans le département du Mono-Couffo), Zê (Département de l'Atlantique) et Adjohoun, Bonou, et Dangbo (département Ouémé) qui connaissent des taux d'endémicité croissants d'année en année (Sopoh; 2011) et où les populations ont aussi recours en premier à la médecine traditionnelle (Johnson; 2004).

La récolte des plantes a été effectuée par une équipe comprenant l'investigateur principal (nous même), un botaniste de l'herbier national du Bénin et un guide. Le tradipraticien n'était donc pas dans l'équipe de récolte. Toutefois, on partait de chez lui avec de nombreux échantillons de plantes de son jardin pour la reconnaissance sur le terrain et la constitution de l'herbier puis la récolte à grande échelle. Mais pour les plantes dont des échantillons n'étaient pas disponibles dans le jardin du tradipraticien ou dans ses environs immédiats, c'est le guide qui nous amenait sur le terrain auprès des plantes que lui a indiquées le praticien dans la

langue vernaculaire. A ce niveau le risque de récolter une plante à la place d'une autre n'est pas nul bien que le guide soit une personne expérimentée et vivant dans le milieu. Toutefois le nombre de plantes récoltées sans le tradipraticien n'est pas élevé et nous revenons toujours chez lui pour confirmer que la récolte a été bien faite.

8.1.2. Forces de l'étude

La population cible (les tradipraticiens) a une bonne connaissance de la maladie (UB) pour laquelle nous recherchons les plantes utilisées lors du traitement. En effet, ces tradipraticiens font partie d'un groupe qui travaillait ensemble avec le PNLUB, notamment lors des campagnes de sensibilisation sur l'UB. Aussi, au début de l'interrogatoire, lors de l'enquête, nous procédons à un petit exposé sur l'UB illustré avec des boîtes à images mises à notre disposition par le PNLUB. Les termes utilisés en milieu «fon» et «mahi» (Ouinhi) au Bénin pour désigner l'UB sont: «ouévikpa» ce qui signifie «la plaie causée par les vers», «djomakou» qui signifie «la plaie qui ne guérit pas» (Aujoulat; 2003). En milieu «Holli» (Ouinhi), l'UB est désigné par le terme «tefoun-Tefoun» qui signifie « plaie comme du coton ». Ces différentes appellations montrent que l'UB et ses symptômes sont bien connus des tradipraticiens de Ouinhi. Ceci rejoint la conclusion de Kibadi et al dans leur étude sur les appellations et les représentations attachées à l'infection à *M. ulcerans* dans différents pays endémiques d'Afrique (Kibadi; 2007). Nous pensons toutefois que cette connaissance de l'UB par les tradipraticiens n'exclut pas qu'ils nous citent aussi les plantes qu'ils utilisent pour d'autres plaies au lieu de l'UB, car le diagnostic de l'UB n'est pas aisé même pour les professionnels de santé de la médecine conventionnelle (Kibadi; 2009, Phanzu; 2010, Kibadi ; 2010).

Le fait d'associer un botaniste de l'herbier national du Bénin, habitué à la flore de Ouinhi et qui reconnaissait les espèces sur le terrain, a permis une bonne identification car des pièces clés des plantes étaient récoltées pour constituer un herbier représentatif et de qualité.

Toutes les espèces ont été identifiées à l'herbier national du Bénin par une équipe de deux botanistes qui ont travaillé séparément. L'un ne savait pas les résultats de l'autre. Les plantes pour lesquelles il y avait une discordance ont été identifiées en ayant recours à des ouvrages écrits sur d'autres flores, et à d'autres herbiers.

8.1.3. Recommandations et perspectives

- Etendre l'enquête ethnobotanique aux autres régions endémiques d'UB.
- Réaliser des études toxicologiques et pharmacologiques sur les remèdes à base de plantes utilisés.
- Favoriser la collaboration entre les tradipraticiens, les médecins et les autres professionnels de la santé afin d'améliorer la prise en charge de l'UB (Johnson; 2004, Renzaho; 2007).

8.2. ETUDE DE L'ACTIVITE *IN VITRO* DES EXTRAITS SUR *M. ULCERANS*

L'objectif visé ici était d'évaluer l'activité antimycobactérienne de nos extraits de plantes *in vitro* sur *M. ulcerans*. Pour ce faire, nous avons dû mettre au point un test rapide d'évaluation *in vitro* d'activité d'extraits végétaux sur *M. ulcerans*.

Les résultats obtenus sont repris dans la publication suivante: Buruli ulcer: A review of *in vitro* tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans* (Yemoa; 2011).

Nous n'avons relevé sur pubmed aucune publication en rapport avec les tests *in vitro* d'évaluation d'activité d'extraits de produits naturels sur *M. ulcerans*. Dès lors nous nous sommes focalisés sur ceux utilisés avec succès pour évaluer la sensibilité de mycobactéries (*M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. marinum*) aux antibiotiques comme aux extraits de produits naturels (Cos; 2006, Portaels; 1998, Bueno-Sanchez; 2010, Palomino; 2002, Martin; 2007, Pavan FR ; 2010).

Les méthodes utilisées *in vitro* pour le screening antibactérien sont classifiées en trois groupes: méthodes de diffusion, dilution, et radiorespirométrie. Puisque *M. ulcerans* a une croissance lente, ces méthodes générales doivent être adaptées à ses conditions de culture (temps d'incubation long, température d'incubation de 30-32°C, présence de CO₂ pour les milieux gélosés) afin d'avoir une méthode sensible, spécifique avec des résultats interprétables.

La méthode de diffusion, première méthode développée pour les tests antibactériens (Bueno-Sánchez; 2010) utilise en général des disques de diffusion sur le milieu gélosé fait à base d'agar. Cette méthode est qualitative et ne permettra pas de dire à quelle concentration il y a inhibition de la croissance de *M. ulcerans*. De même les composés non polaires diffusent plus lentement que les composés polaires dans le milieu gélosé et, par conséquent, donnent une plus faible activité pour ces

derniers. Donc, la méthode de diffusion n'est pas appropriée pour tester des extraits contenant des composés non-polaires ou des composés qui ne diffusent pas facilement dans la gélose. Cela a aussi pour conséquence que les activités des composés antimicrobiens des différents échantillons ne peuvent pas toujours être comparées, principalement en raison de différences de propriétés physiques, telles que la solubilité, la volatilité et les caractéristiques de diffusion dans l'agar. En outre, la méthode d'agar-diffusion n'est pas utilisable pour un screening à grande échelle. Pour toutes ces raisons nous n'avons pas utilisé la méthode de diffusion pour notre test.

Bien que la méthode radiorespirométrique (BACTEC®) soit quantitative et permette de déterminer des CMI et même de comparer l'activité des extraits entre eux, la principale limite est son coût élevé et la difficulté de gestion des déchets radioactifs. C'est pour ces raisons que nous ne l'avons pas retenue pour notre travail.

Au nombre des méthodes de dilution, une méthode conventionnelle dite «des proportions» utilisant le milieu de culture LJ a aussi été décrite. Elle n'est pas très adaptée à notre étude, d'une part parce que le délai d'obtention des résultats est long (42 à 56 jours); le long temps d'incubation pourrait être à l'origine de la dégradation de certains produits. De plus, le LJ contient des œufs et il est possible que la quantité de produit à tester disponible soit diminuée suite à une chélation avec l'albumine des œufs. D'autre part, le LJ nécessite un chauffage à 85 °C pendant 45 minutes après incorporation des extraits à tester, ce qui pourrait dégrader les extraits. Lorsqu'on utilise le milieu de culture 7H11 à la place du LJ, on n'a pas besoin d'un chauffage à 85°C, ni d'œufs, mais on a besoin de CO₂ et d'un délai d'incubation d'au moins 28 jours. Aussi, *M. ulcerans* ne pousse pas bien lorsqu'on utilise le MGIT (mycobacteria growth indicator tube). Nous avons alors retenu et utilisé la «Resazurin Microtiter Assay: REMA» pour les tests de sensibilité dans notre étude car elle est simple, rapide (15 jours), financièrement accessible et permet d'éviter le chauffage des extraits. Ceci présente un intérêt pour les composés thermolabiles.

8.2.1. Commentaires

- Dans cette étude, nous avons considéré comme inactifs les extraits de plantes dont la CMI est $> 250\mu\text{g/ml}$. Cette limite se rapproche de celle fixée par Tosun et al qui est de $200\mu\text{g/ml}$ pour les extraits bruts (Tosun; 2004). Cette limite de concentration paraît élevée. En effet, Il s'agit ici de produits bruts, donc de mélanges complexes avec des propriétés physico chimiques pouvant agir sur leur solubilité (faible solubilité) ainsi que sur leur interaction avec la paroi de *M. ulcerans* et son milieu de culture. A titre d'exemple, *M. ulcerans*, comme toutes les mycobactéries, est moins sensible aux composés polaires du fait de la richesse de sa paroi en lipides (Connell; 1994). C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi une limite de concentration élevée pour les extraits bruts par rapport aux antibiotiques actifs sur *M. ulcerans*.

- Le taux de plantes actives à faible concentration est de 4.5% (2 plantes sur les 44 testées). Ce taux est faible. Dans cette étude nous avons testé les plantes individuellement; or les tradipraticiens utilisent des remèdes constitués de mélanges de ces plantes. De plus, les conditions de préparation des remèdes ne sont pas superposables aux conditions d'extraction au laboratoire. Pour des raisons de distribution, de disponibilité, de saison, certaines espèces de plantes n'ont pas été récoltées donc non testées. Certaines espèces n'ont pu être testées parce que les solvants utilisés par les tradipraticiens dans leur usage est difficile à reproduire. C'est le cas par exemple de l'usage de l'urine humaine comme solvant de macération de plante.

Pour faciliter la solubilisation des extraits, nous avons utilisé le diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui n'est pas volatil contrairement aux autres solvants utilisés couramment comme le méthanol et l'éthanol. De plus le DMSO permet une meilleure solubilisation. La REMA a été développée pour la première fois pour *M. tuberculosis* (Palomino ; 2002) et nous venons de montrer qu'elle est applicable pour tester avec succès les extraits de plantes et de produits naturels sur *M. ulcerans*. Les drogues végétales testées dans notre étude pourraient avoir en plus une activité inhibitrice sur d'autres bactéries courantes en considérant les propriétés pharmacologiques des grands groupes de composés chimiques qu'elles contiennent. Une telle activité au cas où elle s'avérait, pourrait être mise à profit pour soigner la plaie et prévenir les surinfections. Cela rejoint Addo et al qui dans une étude menée au Ghana en 2008,

ont rapporté que les racines de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae), traditionnellement utilisées au Ghana pour soigner l'UB, possède une activité inhibitrice sur d'autres bactéries telles que: *Streptococcus spp*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; *Salmonella thyphimurium*. Par ailleurs nous retrouvons parmi les classes de composés chimiques caractérisés dans les plantes utilisées pour le traitement traditionnel de l'UB, des composés ayant des propriétés anti-oedémateuses, anti-inflammatoires, antiseptiques, sédatives, analgésiques, anesthésiques ou cicatrisantes (Bruneton, 1999). Ceci pourrait avoir un effet bénéfique dans le traitement de l'UB. Ainsi, les autres plantes non actives à faible concentration pourraient être utilisées pour leur effet anti-inflammatoire, antidouleur, cicatrisant.

8.3. PLACE RELATIVE DES PLANTES (PHYTOTHERAPIE) DANS LE TRAITEMENT DE L'UB.

La majorité des patients atteints d'UB consultent en premier lieu un tradipraticien (Johnson; 2004, Kibadi; 2009, Renzaho; 2007) et reçoivent un traitement principalement à base de plantes. Ces plantes sont utilisées au stade d'ablation de la nécrose, et des soins de la plaie. Si on considère les classes des composés chimiques caractérisés dans nos plantes, il est très probable que l'on y retrouve des substances justifiant l'utilisation traditionnelle qui est faite. De même, deux de nos extraits de plantes ont montré *in vitro* une activité sur *M. ulcerans* mais ont été moins actifs que la rifampicine, antibiotique majeur dans le traitement de l'UB, utilisé ici comme référence en comparant les CMI obtenues. Au cas où des études ultérieures nous permettraient de démontrer l'innocuité, l'efficacité, la tolérance des extraits de ces plantes actives, alors nous pourrions recommander par exemple l'usage de ces plantes en préopératoire et ou en post opératoire en usage externe et ou par voie orale en association avec les antibiotiques actifs sur *M. ulcerans* (comme par exemple la rifampicine, la streptomycine, la clarithromycine), pour le lavage et les soins des plaies ou pour éviter les surinfections.

Ainsi une collaboration entre médecine traditionnelle et médecine conventionnelle pourrait être envisagée. Nous proposons le cas de figure présent: «le tradipraticien participe à la détection active des cas d'UB, les réfère au CDTUB où on l'associera éventuellement pour le lavage et les soins des plaies avec des préparations à base de ses extraits de plantes actives, contre une petite rémunération ou un intéressement quelconque payé par le malade».

Les populations affectées par l'UB, en général ont un faible revenu et sont confrontées à un problème d'accessibilité aux produits synthétiques (rifampicine, streptomycine, amikacine, clarithromycine) en raison de leur coût élevé associé au coût de l'hospitalisation et du forfait payé pour l'intervention chirurgicale. Asiedu et al, dans une étude sur les implications socio économiques de l'UB au Ghana, évaluent le coût moyen du traitement par patient à 966,85 \$ (682,70 euros soit 447850FCFA) en 1994, 706,08 \$ (498,57 euros soit 327040FCFA) en 1995, et 658,74 (465,14 euros soit 305111FCFA) en 1996 (Asiedu; 1998). Cette évaluation du coût ne tient néanmoins pas compte de tous les frais.

Drummond et al ont révélé quant à eux que le coût moyen du traitement de l'UB, tout frais compris depuis le diagnostic jusqu'à la guérison, est de 14.608 \$ (10729,71 euros soit 7038228,3 FCFA). Ce chiffre représente environ sept (7) fois les dépenses de santé moyennes par personne en Australie entre 1997-1998 qui est de 2557 \$ (1878,14 soit 1231979FCFA) (Drummond; 2004). Au Bénin, les dépenses de santé moyenne par personne en 2008 étaient de 38 \$ (26,91 euros soit 17655 FCFA). Nous convenons tous, eu égard à ces différentes études, que le traitement de l'UB est cher. Remarquons cependant que, le traitement traditionnel n'est pas gratuit mais il est difficile d'évaluer son coût car il faut prendre en considération le coût en numéraire (varie entre 18,3 euros soit 12000 FCFA et 91 Euros soit 60 000 FCFA) et les investissements en nature (poulets, cabris, pigeons) offerts au thérapeute (Johnson; 2004).

Eu égard à tout ce qui précède, à l'étape actuelle de nos recherches, nous pensons que le traitement traditionnel de l'UB par les plantes ne peut pas remplacer le traitement conventionnel à base d'antibiotiques spécifiques associés ou non à la chirurgie selon les recommandations de l'OMS ; il peut lui être complémentaire avec les plantes qui auront fait preuve d'innocuité, d'efficacité et de tolérance. Au vu de ce qui précède nous recommandons donc ce qui suit :

- La poursuite de la recherche d'extraits de plantes actifs sur *M. ulcerans* devrait être encouragée car les plantes font partie du patrimoine naturel de ces populations et leur sont accessibles financièrement.
- L'organisation des séances de sensibilisation des tradipraticiens sur les conditions générales d'asepsie, afin de mieux prendre en charge les plaies d'UB en collaboration avec le personnel de soins de santé.

- La formation des tradipraticiens sur l'UB en insistant sur la cause, les manifestations et les complications afin de changer leur perception sur la maladie (maladie due à un envoûtement, un mauvais sort, la sorcellerie). Ceci permettra de ramener l'UB à son stade de maladie sans aucun lien avec les mauvais sorts ou la sorcellerie (Kibadi; 2007).
- La sensibilisation des tradipraticiens sur les risques majeurs de surinfection, de tétanos lors des pratiques d'ablation mécanique des nécroses avec des objets tranchants non stériles
- La demande auprès des tradipraticiens de signaler les différentes plantes qu'ils utilisent afin que les critères d'innocuité, d'efficacité et de transformation de ces plantes soient bien encadrés et documentés conformément à la recommandation de l'OMS (OMS, 2002).

8.4. IDENTIFICATION, ISOLEMENT DE PRINCIPES ACTIFS ET EVALUATION DE LEUR EFFET SUR *M. ULCERANS*

Comme rapporté au chapitre V, *H. floribunda* contient des alcaloïdes. Ces alcaloïdes sont de types stéroïdiques (Lebœuf; 1969). Parmi les nombreuses activités rapportées pour ces alcaloïdiques, l'activité *in vitro* sur *M. tuberculosis* (CMI= 0.075g/l) a retenu notre attention: *M. tuberculosis* appartient au même genre (*Mycobacterium*) que *M. ulcerans*. Ainsi nous avons évalué *in vitro* l'activité de l'extrait alcaloïdique total en comparaison avec l'extrait éthanolique, dichlorométhane, aqueux, acétate d'éthyle, hexanique. Les résultats montrent que l'extrait alcaloïdique total obtenu en milieu organique à pH 11-12 était plus actif que l'extrait dichlorométhane. Les CMI respectives sont: 62,5 µg/ml ; 125 µg/ml. Nous avons donc gagné en activité en faisant une extraction sélective d'alcaloïdes.

Au chapitre VI, nous avons noté que plusieurs alcaloïdes étaient présents. Dans le but de les séparer, d'isoler et d'identifier ceux ou celui responsable de l'activité *in vitro* sur *M. ulcerans* nous avons développé plusieurs méthodes chromatographiques (CLPA, MPLC, chromatographie d'exclusion), ce qui nous a permis d'avoir plusieurs fractions. Nous avons joué ici sur la polarité de nos composés (en utilisant des systèmes de solvants de polarité croissante), la pression appliquée sur la colonne (en passant de la pression atmosphérique (CLPA) à une pression moyenne à l'aide d'une pompe dans la MPLC) et sur la taille des composés avec la chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel de SEPHADEX. Ce fractionnement

bio guidé nous a permis d'identifier quatre composés différents présents dans cinq fractions différentes et d'isoler l'un d'entre eux avec une pureté suffisante. La structure du composé majoritaire a été élucidée grâce à la spectrométrie de masse et à la résonance magnétique nucléaire. La LC-MS a été utilisée pour identifier les autres alcaloïdes dans les fractions. Elle offre l'avantage de nous renseigner sur la pureté de nos fractions. Ceci nous a permis de gagner du temps lors de la dernière étape du fractionnement bio guidé. Elle offre aussi l'avantage d'utiliser de très petites quantités de matériels (solvants, produits sous purification).

La LC-MS nous a permis d'identifier quatre molécules dont les masses exactes et les formules brutes sont les suivantes: ($C_{22}H_{37}ON$; 331.28), ($C_{23}H_{37}NO$; 343.28), ($C_{21}H_{33}NO$; 315.25), ($C_{22}H_{35}NO$; 329.27). Des composés de même masse exacte et formule brute ont déjà été identifiés dans *H. floribunda* et dans des espèces végétales voisines (Goutarel R; 1961, Leboeuf M; 1969). Leur structure est établie dans la littérature. Il s'agit d'alcaloïdes stéroïdiques cétoniques (holaphylline, holaphyllamine, holamine) ou alcooliques (holaphyllinol, holaphyllidine, holadysamine) avec une fonction amine en dehors du cycle. L'holadysamine, alcaloïde majeur isolé s'est montré moins actif *in vitro* que la rifampicine. Cette faible activité ne pourrait traduire en réalité l'inefficacité du traitement traditionnel car dans ce traitement, ce sont plusieurs plantes qui sont utilisées à la fois. Les différents composés présents dans ces extraits de plantes pourraient agir en synergie Comme c'est le cas pour les antibiotiques éthambutol, clarithromycine et rifampicine (Rastogi ; 1991). Rastogi et al montrent dans leur étude que l'utilisation de ces trois antibiotiques en association entraîne une augmentation des effets bactéricides qui sont plus importants que lorsque ces médicaments sont utilisés seuls ou en combinaison de deux d'entre eux. L'effet bactéricide a été mesuré sur *M. avium*. En considérant les résultats de cette étude, il urge donc de tester *in vitro* les associations de nos plantes, ce qui constitue les remèdes du tradipraticien. Les remèdes qui se montreraient efficaces feront l'objet d'études toxicologiques, pharmacologiques et de standardisation aux doses utilisées en médecine traditionnelle.

Au cas où la collaboration entre médecine traditionnelle et médecine conventionnelle arrivait à se faire pour la prise en charge de l'UB, nous proposerons l'algorithme suivant pour la prise en charge de l'UB en zone endémique d'UB où 80%

de la population, pour des raisons culturelles et économiques, choisissent le traitement traditionnel. Nous nous inspirons de l'algorithme de (Kibadi ; 2010).

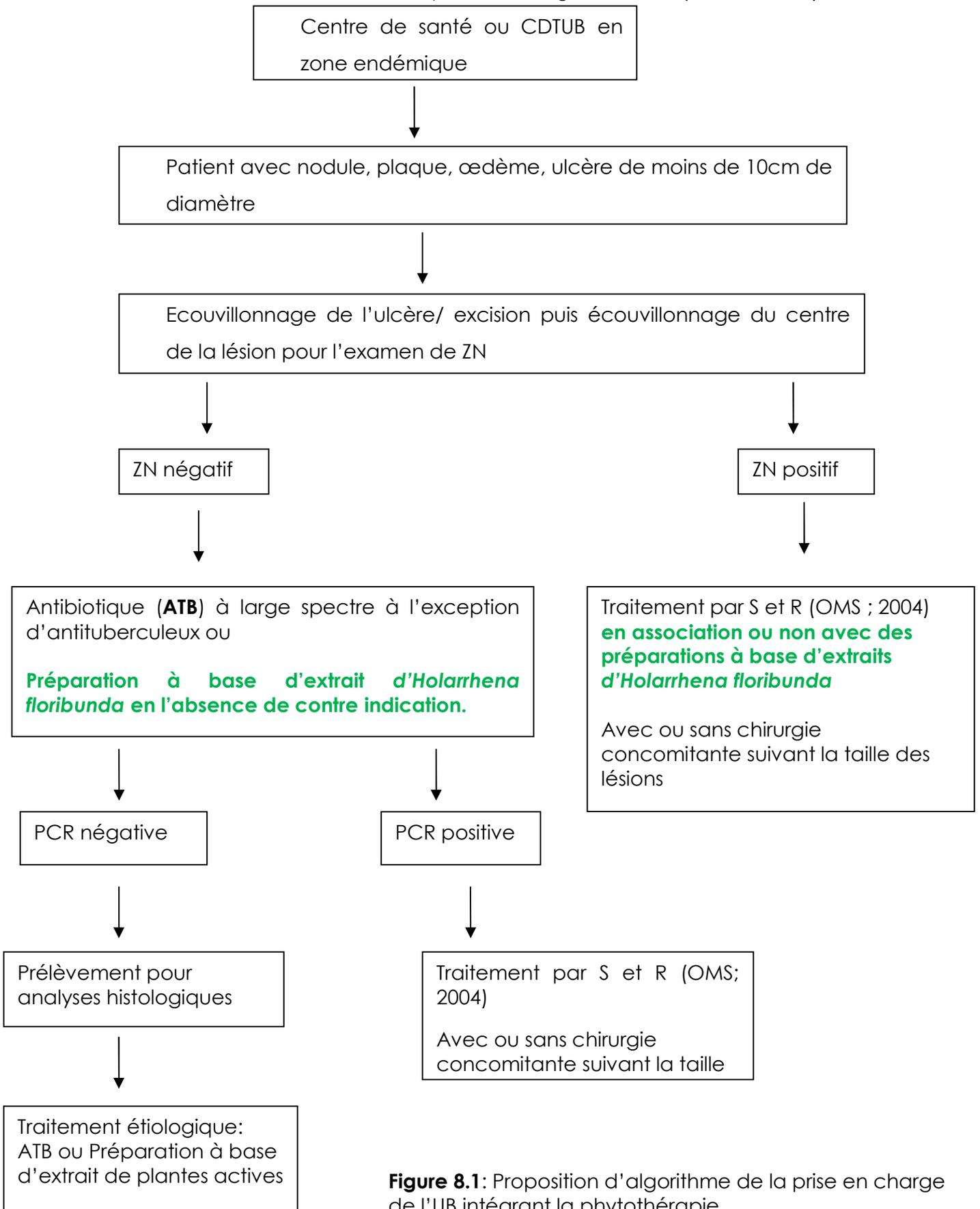


Figure 8.1: Proposition d'algorithme de la prise en charge de l'UB intégrant la phytothérapie

IX.

CONCLUSIONS GENERALES

ET PERSPECTIVES

9.1. CONCLUSIONS GENERALES

L'UB constitue un problème de santé publique au Bénin et sévit dans certaines localités des départements du Mono, du Couffo, de l'Atlantique, du Littoral, de l'Ouémé, du Plateau, du Zou et des Collines (Johnson; 2005, Sopoh; 2011). Le traitement antibiotique spécifique associant 10mg/kg/jour de rifampicine et 15mg/kg/jour de streptomycine pendant 08 semaines a donné de bons résultats sur toutes les formes cliniques de la maladie jusqu'aux ulcères. Dans certains cas, la chirurgie est nécessaire (ulcère de plus de 15cm de diamètre) et dans d'autres cas elle est contre indiquée (lésions situées à des endroits critiques du corps tels que: visage; organes génitaux). Avec ou sans traitement chirurgical, il existe des cas de rechute. D'autres part, les patients atteints de cette maladie sont en général pauvres, vivent dans des zones reculées et choisissent en premier le traitement traditionnel qui est fait de préparations à base de plantes. A travers une enquête ethnobotanique préliminaire à Ouinhi, nous avons répertorié les différentes plantes utilisées. Elles sont au nombre de quarante neuf. Parmi les extraits hydroéthanoliques de quarante quatre d'entre elles, c'est l'extrait de *H. floribunda* qui s'est montré le plus actif sur *M. ulcerans*. *H. floribunda* (G.Don) T.Durand et Schinz est une plante ayant de très nombreuses utilisations médico-religieuses. Sous forme de décocté les feuilles sont utilisées pour soigner les plaies (Michel; 2002, Adjanooun; 1989). Toutes ces raisons, ainsi que l'activité antimycobactérienne prometteuse de l'extrait hydroéthanolique de *H. floribunda*, nous ont conduits à retenir cette plante, à entreprendre des études phytochimiques, des fractionnements bio guidés, à tenter d'identifier et isoler les composés actifs sur *M. ulcerans*. Cette plante appartient à la famille des Apocynacées, famille de plantes connues pour leur richesse en alcaloïdes. Lambin et al ont rapporté l'action des alcaloïdes totaux extraits de la racine de cette plante sur *M. tuberculosis* (Lambin; 1953). Par CCM préliminaires, nous avons confirmé la présence d'alcaloïdes dans les feuilles; par fractionnement liquide liquide à l'aide de solvants de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyl, eau), nous avons obtenu une fraction dichlorométhane riche en alcaloïdes et active in vitro sur *M. ulcerans*. Nous avons alors décidé d'identifier et d'isoler les composés actifs de cette fraction alcaloïdique. A l'issue d'une série de chromatographies liquides: dans des colonnes de verre à pression atmosphérique (CLPA), à pression moyenne (MPLC) et de filtration sur gel de SEPHADEX LH20, nous avons obtenu quatre sous fractions dont une est active sur *M. ulcerans*. L'analyse par

LC-MS de cette sous fraction active nous a permis d'identifier un composé majoritaire pur, l' holodysamine identifié par SM et RMN. Les autres sous fractions non actives aux concentrations testées contiennent les composés A, B, C, D. Nous avons fait des propositions de structure des composés A, B, C grâce à l'interprétation des données fournies par la spectrométrie de masse en LC-MS. Le composé **A** (M: 331,29) pourrait être l'holaphyllinol ou l'holaphyllidine. Les composés **B** et **C** pourraient être des composés nouveaux identifiés pour la première fois dans la plante.

Puisque l'holadysamine est le composé majoritaire et qu'il présente une activité antimycobactérienne, nous avons décidé de mettre au point une méthode de quantification de ce composé dans l'extrait brut de *H. floribunda* mais nous avons noté un problème de séparation de l'holadysamine sur les plaques HPTLC dans les conditions opératoires que nous avons développées. Il est donc important de poursuivre les travaux sur certains paramètres afin d'affiner la séparation et avoir une meilleure répétabilité, obtenir une reproductibilité des résultats.

9.2. PERSPECTIVES

Au vu de nos résultats, les perspectives sont les suivantes :

Poursuivre le développement de la méthode de dosage de l'holadysamine afin de mettre standardiser les traitements.

Analyser d'autres échantillons de *H. floribunda* pour déterminer d'éventuelles variations de teneurs comme rapporté par (Lebœuf; 1969).

Tester le composé D (holadysamine) sur d'autres germes comme ceux responsables de surinfection des plaies d'UB.

Tester des associations de plantes comme utilisées par les tradipraticiens.

Etudier la toxicité de l'holadysamine et son mode d'action sur *M. ulcerans*.

Etudier la possibilité de synthèse de l'holadysamine.

Réaliser des formulations galéniques à partir de l'holadysamine ou des extraits bruts enrichis.

Identifier les autres principes actifs de *H. floribunda* et élucider leur stéréochimie.

X.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

X- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Addo P, Quartey M, Abbas M, Adu-Addai B, Owusu E, Okang I, Dodoo A, De Souza D, Ankrah NA, Ofori-Adjei D **(2008)** *in vitro* susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to herbal preparations. The Internet Journal of Tropical Medicine™ ISSN: 1540-2681, (http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_tropical_medicine/volume_4_number_2_47/article/in_vitro_susceptibility_of_mycobacterium_ulcerans_to_herbal_preparations.html) (Consulté le 12-05-2011).
2. Adjanooun E J, Adjakidjè V, Ahyi MR, Aké AL, Akoegninou A, d'Almeida J et al **(1989)** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Edition de l'Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris; 895p.
3. Aguiar J, Domingo MC, Guédénon A, Meyers WM, Steunou C, Portaels F **(1997)** L'ulcère de Buruli, une maladie mycobactérienne importante et en recrudescence au Bénin. Bull séances Acad R Sci Outre-Mer, 3: 325-356.
4. Almeida D, Converse PJ, Ahmad Z, Dooley KE, Nuermberger EL, Grosset JH **(2011)** Activities of rifampin, Rifapentine and clarithromycin alone and in combination against *Mycobacterium ulcerans* disease in mice. PLoS Negl Trop Dis, 5: e933.
5. Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoah K, Asiedu K, Addy J **(2002)** Buruli ulcer in Ghana: results of a national case search. Emerg Infect Dis, 8: 167-170.
6. Asiedu K, Etuafu S **(1998)** Socioeconomic implications of Buruli ulcer in Ghana: a three-year review. Am J Trop Med Hyg, 59: 1015–1022.
7. Asiedu K, Scherprier R, Raviglione M **(2000)** *L'ulcère de Buruli: infection à Mycobacterium ulcerans*, Genève, eds WHO/CDS/CPE/GBUI; p.117.
8. Aujoulat I, Johnson RC, Zinsou C, Guédénon A, Portaels F **(2003)** Psychosocial aspects of health seeking behaviours of patients with Buruli ulcer in Southern Benin. Trop Med Int Health, 8: 750-759.

9. Bär W, Rüh-Gerdes S, Richter E, Marquez de Bär G, Dittmer C, Papsdorf H, Stosiek P, de Rijk P, Meyers WM, Portaels F **(1998)** *Mycobacterium ulcerans* infection in a child from Angola: Diagnosis by direct detection and culture. *Trop Med Int Health*, 316: 1423-1425.
10. Barker LP, Lien BA, Brun OS, Schaak DD, McDonough KA, Chang LC **(2007)** A *Mycobacterium marinum* zone of inhibition assay as a method for screening potential antimycobacterial compounds from marine extracts. *Planta Med*, 73: 559-563.
11. Bayley AC **(1971)** Buruli ulcer in Ghana. *Br Med J*, 2: 401-402.
12. Bentoucha A, Robert J, Dega H, Lounis N, Jarlier V, Grosset J **(2001)** Activities of new macrolides and fluoroquinolones against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 3109-3112.
13. Bruchard GD, Bierther M **(1985)** Buruli ulcer: clinical pathological study of 23 patients in Lambaréné, Gabon *Trop Med Parasit*, 37: 1-8.
14. Bruneton J **(1999)** *Pharmacognosie: phytochimie, Plantes médicinales*. Editions TEC et DOC, éditions médicales internationales 3^{ème} édition Paris, 1120 p.
15. Bueno-Sánchez JG, Kouznetsov VV **(2010)** Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Braz J Microbiol*, 41: 270-277.
16. Chauty A, Ardant MF, Adeye A, Euverte H, Guédénon A, Johnson C, Aubry J, Nuermberger E, Grosset J **(2007)** Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 4029-4035
17. Clancey JK, Dodge OG, Lunn HF, Oduori ML **(1961)** Mycobacterial skin ulcers in Uganda. *Lancet*, 28: 951-954.
18. Coloma JN, Navarrete-Franco G, Iribe P, Lopez-Cepeda LD **(2005)** Ulcerative cutaneous mycobacteriosis due to *Mycobacterium ulcerans*: reports of two Mexican cases. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 73: 5-12.

19. Commission SFSTP, Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, Feinberg, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Nivet C, Muzard G, Valat L **(2003)** Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. STP PHARMA PRATIQUES, 13 :27-64.
20. Connell ND, Nikaido H **(1994)** Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: American Society of Microbiology, p 333–452.
21. Cornet L, Richard-Kadio M, N'Guessan HA, Yapo P, Hossoko H, Dick R, Casanelli JM **(1992)** Le traitement des ulcères de Buruli par excision-greffe. Bull Soc Pathol Exot, 85: 355-358.
22. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L **(2006)** Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol, 106: 290–302.
23. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Guédénon A, Scott JT, Dramaix M, Portaels F **(2004)** *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001. Emerg Infect Dis, 10: 1391-1398.
24. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Portaels F **(2005)** Buruli ulcer recurrence, Benin. Emerg Infect Dis, 11: 584-589.
25. Drummond C, Butler JR **(2004)** *Mycobacterium ulcerans* treatment costs, Australia. Emerg Infect Dis, 10: 1038- 1043.
26. Duez P, Chamart S, Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, Hanocq M, Molle L **(1986)** Comparison of high-performance thin-layer chromatography-densitometry and gas-liquid chromatography for the determination of conessine in *Holarthena floribunda* stem. Journal of Chromatography, 351: 140-143.

27. Eddyani M, Fraga AG, Schmitt F, Uwizeye C, Fissette K, Johnson C, Aguiar J, Sopoh G, Barrogui Y, Meyers WM, Pedrosa J, Portaels F **(2009)**. Fine-needle aspiration, an efficient sampling technique for bacteriological diagnosis of nonulcerative Buruli ulcer. *J Clin Microbiol*, 47: 1700-1704.
28. Elsen P, Meyers WM, Guédénon A, Guimaraes-peres A, Fonteyne PA, Portaels F **(1999)** Les punaises interviennent dans l'épidémiologie de l'UB en Afrique de l'ouest? *Bull de l'ALLF N°4 Décembre*.
29. Espey DK, Djomand G, Diomande I, Dosso M, Saki MZ, Kanga JM, Spiegel RA, Marston BJ, Gorelkin L, Meyers WM, Portaels F, Deming MS, Horsburgh CR Jr **(2002)** A pilot study of treatment of Buruli ulcer with rifampin and dapsone. *Int J Infect Dis*, 6: 60-65.
30. Etuaful S, Carbonnelle B, Grosset J, Lucas S, Horsfield C, Phillips R, Evans M, Ofori-Adjei D, Klustse E, Owusu-Boateng J, Amedofu GK, Awuah P, Ampadu E, Amofah G, Asiedu K, Wansbrough-Jones M **(2005)** Efficacy of the combination rifampin-streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3182-3186.
31. Faber WR, Arias-Bouda LM, Zeegelaaar JE, Kolk AH, Fonteyne PA, Toonstra J, Portaels F **(2000)** First reported case of *Mycobacterium ulcerans* infection in a patient from China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94: 277-279.
32. Fyfe JA, Lavender CJ, Johnson PD, Globan M, Sievers A, Azuolas J, Stinear TP **(2007)** Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 73: 4733-4740.
33. Goutarel R **(1961)** Stéroïdes aminés naturels des apocynacées. *Tetrahedron*, 14: 126-137.
34. Goutarel R, Cave A, Tan L, Leboeuf M **(1962)** Steroid alkaloids. XII. Synthesis of holaphyllamine and holamine. *Bulletin de la Société Chimique de France*, p 646-648.

35. Grosset J **(2004)** Essai clinique d'un traitement de l'UB par l'association Rifampicine- Streptomycine. Bull de l'ALLF, 14: 33.
36. Guédénon A, Zinsou C, Josse R, Andele K, Pritze S, Portaels F, Meyers WM **(1995)** Traditional treatment of Buruli ulcer in Benin, Arch Dermatol, 131: 741-742.
37. Guerra H, Palomino JC, Falconi E, Bravo F, Donaires N, Van Marck E, Portaels F **(2008)** *Mycobacterium ulcerans* disease, Peru. Emerg Infect Dis, 14: 373-377.
38. Guissou JP, Millogo-Koné H, Kaboré IZ **(1992)** Etude comparative de l'activité pharmacologique de *Euphorbia hirta* L. (euphorbiaceae) et *Holarrhena floribunda* G. Don (Apocynaceae) vis-a-vis d'amibes non pathogènes du genre *Amoeba proteus*. Médecine d'Afrique Noire, 39: 358-363.
39. Heinrich M, Gibbons S **(2001)** Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. J Pharm Pharmacol, 53: 425-432.
40. Houghton PJ, Raman A **(1998)** Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Ed Chapman and Hall first edition, New York, 199p.
41. Hoyer GA, Huth A, Nitschke I, Szczepanski CV **(1978)** Biologically active compounds from plants III Holarrhesine, a new steroidal alkaloid from *Holarrhena floribunda*. Planta Med, 34: 47-52.
42. Igo JD, Murthy DP **(1988)** *Mycobacterium ulcerans* infections in Papua New Guinea: correlation of clinical histological and microbiologic features. Am J Trop Med Hyg, 38: 391-392.
43. Janot MM, Cave A, Goutarel R **(1959)** Sterol alkaloids. III. Toghohamine, holaphyllamine, and holaphylline, new alkaloids from the leaves of *Holarrhena floribunda*. Bulletin de la Société Chimique de France, 896-900.
44. Janssens PG, Pattyn SR, Meyers WM, Portaels F **(2005)** Buruli ulcer: an historical overview with updating to 2005. Bull séances Acad R Sci Outre-mer, 51: 165-199.
45. Janssens PG, Quertinmont MJ, Sienniawski J, Gatti F **(1959)** Necrotic tropical ulcers and mycobacterial causative agents. Trop Geogr Med, 11: 293-312.

46. Ji B, Lefrançois S, Robert J, Chauffour A, Truffot C, Jarlier V **(2006)** In vitro and in vivo activities of rifampin, streptomycin, amikacin, moxifloxacin, R207910, linezolid, and PA-824 against *Mycobacterium ulcerans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1921-1926.
47. Johnson RC, Ifebe D, Hans-Moevi A, Kestens L, Houessou R, Guédénon A, Meyers WM, Portaels F **(2002)** Disseminated *Mycobacterium ulcerans* disease in an HIV-positive patient: a case study. *AIDS*, 16: 1704-1705.
48. Johnson RC, Makoutodé M, Hougnyhim R Guédénon A, Ifebe D, Boko M, Portalels F **(2004)** Traitement traditionnel de l'UB au Bénin. *Méd Trop*, 64: 145-150.
49. Johnson RC, Nackers F, Glynn JR, de Biurun Bakedano E, Zinsou C, Aguiar J, Tonglet R, Portaels F **(2008)** Association of HIV infection and *Mycobacterium ulcerans* disease in Benin. *AIDS*, 22: 901-903.
50. Johnson RC, Sopoh GE, Boko M, Zinsou C, Gbovi J, Makoutodé M, Portaels F **(2005)** Distribution de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (Ulcère de Buruli) dans la commune de Lalo au Bénin. *Trop Med Int Health*, 10: 863-871.
51. Junghanss T, Um Boock A, Vogel M, Schuette D, Weinlaeder H, Pluschke G **(2009)** Phase Change Material for Thermo-therapy of Buruli Ulcer: A Prospective Observational Single Centre Proof-of-Principle Trial. *Plos Negl Trop Dis*, 3: e380.
52. Kanga JM, Kacou DE, Sangaré A, Dabila Y, Asse NH, Djakeaux S **(2003)** Les rechutes observées après le traitement chirurgical des cas d'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 96: 406-409.
53. Kanga JM, Kacou ED **(2001)** Aspects épidémiologiques de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire: résultats d'une enquête nationale. *Bull Soc Pathol Exot*, 94: 46-51.
54. Kanga JM, Kacou ED, Kouame K, Kassi E, Kaloga M, Yao JK, Dion-Laine M, Avoaka LE, Yoboue-Yao P, Sangare A, Ecra JE, Ahogo C, Djedje MS, Kadiri AJ, Aye C **(2004)** L'ulcère de Buruli: aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques en Côte d'Ivoire. *Med Trop*, 64: 238-242.

55. Kibadi K, Aujoulat I, Meyers WM, Mokassa L, Muyembe T, Portaels F **(2007)** Etude des appellations et des représentations attachées à l'infection à *Mycobacterium ulcerans* dans différents pays endémiques d'Afrique. *Méd Trop*, 67: 241-248.
56. Kibadi K, Boelaert M, Fraga AG, Kayinua M, Longatto-Filho A, Minuku JB, Mputu-Yamba JB, Muyembe-Tamfum JJ, Pedrosa J, Roux JJ, Meyers WM, Portaels F **(2010)** Response to treatment in a prospective cohort of patients with large ulcerated lesions suspected to be Buruli Ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e736.
57. Kibadi K, Boelaert M, Kayinua M, Minuku J-B, Muyembe-Tamfum J-J, Portaels F, Lefèvre P **(2009)** Therapeutic itineraries of patients with ulcerated forms of *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) disease in a rural health zone in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health*, 14: 1110-1116.
58. Kibadi KA **(2004)** Enquête Connaissances-Attitudes-Pratiques(CAP) de la population de Songololo (R.D.Congo) sur l'ulcère de Buruli. *Bull Soc Pathol Exot*, 97: 302-305.
59. Lagarrigue V, Portaels F, Meyers WM, Aguiar J **(2000)** L'ulcère de Buruli: attention aux atteintes osseuses! A propos de 33 cas observés au Bénin. *Méd Trop*, 60: 262-266.
60. Lambin S, Bernard J **(1953)** Action of some alkaloids on *Mycobacterium tuberculosis*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 147: 638-641.
61. Lebœuf M, Cavé A, Goutarel R **(1969)** Alcaloïdes stéroïdiques LXXXII. Composition chimique des feuilles de *Holarrhena floribunda* Dur et Schinz. Isolement de la progestérone et de quatre nouveaux alcaloïdes: méthylholaphylline, hoaphyllinol, holaphyllidine et dihydroholaphyllamine. *Annales pharm franç*, 27: 217-228.
62. Leitao GG, Abreu LF, Costa FN, Brum TB, Ramos DF, Silva PEA, Lourenco MCS, Leitao SG **(2008)** Preparative Isolation of antimycobacterial shoreic acid from

- Cabralea canjerana* by high speed countercurrent chromatography. Natural Products Communication, 3: 1995-1997.
63. Marchandin H, Portaels F, Van de Perre P **(2004)** *Mycobacterium ulcerans* agent de l'UB. Mycobactéries et Mycobactéries atypiques. Elsevier SAS, 99-115.
64. Marsollier L, Tchibozo S, Aubry J Merritt RW, Saint André JP, Legras P, Manceau AL, Chauty A, Carbonnelle B, Cole ST **(2004)** Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol, 70: 6296-6298.
65. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC **(2003)** Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. Antimicrob Agents Chemother, 47: 3616-3619.
66. Martin A, Portaels F, Palomino JC **(2007)** Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother, 59: 175-183.
67. Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK **(1974)** Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. Am J Trop Med Hyg, 23: 919-923.
68. Meyers WM, Tignokpa N, Priuli GB, Portaels F **(1996)** *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer): first reported patients in Togo. Br J Dermatol, 134: 1116-1121.
69. Michel A **(2002)** Arbres et Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, 2^{ème} éd, Cirad; Paris.
70. Monson MH, Gibson DW, Connor DH, Kappes R, Hienz HA **(1984)** *Mycobacterium ulcerans* in Liberia: a clinicopathologic study of 6 patients with Buruli ulcer. Acta Trop, 41: 165-172.
71. Muelder K **(1988)** Buruli ulcer in Benin. Trop Doct, 18:53.

72. Neuwinger HD **(2000)** African Traditional medicine. A dictionary of plant use and application, London, Medpharm scientific publishers, p.589.
73. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM **(2003)** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, 66: 1022-1037.
74. Nienhuis WA, Stienstra Y, Thompson WA, Awuah PC, Abass KM, Tuah W, Awua-Boateng NY, Ampadu EO, Siegmund V, Schouten JP, Adjei O, Bretzel G, van der Werf TS **(2010)** Antimicrobial treatment for early, limited *Mycobacterium ulcerans* infection: a randomised controlled trial. *Lancet*, 375: 664-672.
75. Oluwasamni JO, Solanke TF, Olurin EO, Itawemi SO, Lucas AO **(1976)** *Mycobacterium ulcerans* (Buruli) skin ulceration in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*, 25: 122-128.
76. OMS **(2001)** Ulcère de Buruli. Prise en charge de l'infection à *Mycobacterium ulcerans*, Genève, eds WHO/CDS/CPE/GBUI, p.92.
77. Organisation Mondiale de la Santé **(2002)** Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005. Genève; OMS, p78.
78. Osoniyi O, Onajobi F **(2003)** Coagulant and anticoagulant activities in *J. curcas* latex. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 101-105.
79. Ouaba K, Sano D, Adama T, Ouédraogo R, Sakandé B, Sanou A **(1998)** Les ulcères de Buruli au Burkina Faso: à propos de 06 observations et la revue de la littérature. *Med Afr Noire*, 36: 402-408.
80. Ouattara D, Meningaud JP, Kaba L, Sica A, Asse H **(2004)** Traitement de l'ulcère de Buruli par excision-greffe: à propos de 118 observations. *Ann Chir Plast Esthet*, 49: 11–16.
81. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F **(2002)** Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 2720–2722.

82. Palomino JC, Obiang AM, Realini L, Meyers WM, Portaels F **(1998)** Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol*, 36: 3420–3422.
83. Pavan FR, Poelhsitz GV, do Nascimento FB, Leite SR, Batista AA, Deflon VM, Sato DN, Franzblau SG, Leite CQ **(2010)** . Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. *Eur J Med Chem*, 45:598-601.
84. Perraudin ML, Herrault A, Desbois JC **(1980)** Ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). *Ann Pediatr*, 27: 687-692.
85. Phanzu MD, Bafende AE, Imposo BB, Meyers WM, Portaels F **(2010)** Under treated necrotizing fasciitis masquerading as ulcerated edematous *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). *Am J Trop Med Hyg*, 82: 478-481.
86. Phillips R, Wilks S, Kolk AHJ **(2004)** *In vitro* killing of *Mycobacterium ulcerans* by acidified nitrite. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 3130-3132.
87. Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Guédénon A, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM **(2004)** *Mycobacterium bovis* BCG vaccination as prophylaxis against *Mycobacterium ulcerans* osteomyelitis in Buruli ulcer disease. *Infect Immun*, 72: 62-65.
88. Portaels F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PDR, Hayman JA, Kirkwood R, Meyers WM **(2001)** *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. In: *Mycobacterial infections in domestic and wild animals*. Office International de Epizooties. Scientific and Technical Review. Paris, Ed Collins MT, Manning B, 20: 252-264.
89. Portaels F, Fonteyne PA, Meyers WM **(1999)** Insects in transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *The Lancet*, 353: 986.
90. Portaels F, Guédénon A **(2000)** Ulcère de Buruli (Infection à *Mycobacterium ulcerans*) Guide diagnostique à l'usage des professionnels de la santé. Direction Générale de Coopération Internationale (DGIS/DGCI), Belgique; p 46.
91. Portaels F, Silva MT, Meyers WM **(2009)** Buruli ulcer. *Clin Dermatol*, 27: 291-305.

92. Portaels F, Traore H, de Ridder K, Meyers WM **(1998)** In vitro susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to clarithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2070-2073.
93. Portaels F, Zinsou C, Aguiar J Debacker M, De Biurrun E, Guédénon A, Josse R, Lagarrigue V, Silva M, Steunou C, Meyers W **(2003)** Les atteintes osseuses dans l'UB: A propos de 73 cas. *Bull Seanc Acad R Sci Outre-mer*, 49: 161-190.
94. Pousset J **(2004)** *Plantes médicinales d'Afrique Comment les reconnaître et les utiliser?*, Aix-en-Provence, Edisud, p.288.
95. Pradinaud R, Basset A, Grosshans E **(1974)** Vingt ans de mycobactérioses cutanées en Guyane Française. *Castellania*, 2: 273-274.
96. Pszolla N, Sarkar MR, Strecker W, Kern P, Kinzl L, Meyers WM, Portaels F **(2003)** Buruli ulcer: a systemic disease. *Clin Infect Dis*, 37: e78-82.
97. Ramos DF, Leitao GG, Costa FN, Abreu L, Villarreal JV, Leitao SG, Fernández SLS, Silva PEA **(2008)** Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44: 669-674.
98. Rastogi N, Labrousse V **(1991)** Extracellular and intracellular activities of clarithromycin used alone and in association with ethambutol and rifampin against *Mycobacterium avium* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*, 35:462-470.
99. Ravisse P **(1977)** l'ulcère cutané à *Mycobacterium ulcerans* au Cameroun. *Bull Soc Path Exot*, 70: 109-124.
100. Renzaho AM, Woods PV, Ackumey MM, Harvey SK, Kotin J **(2007)** Community-based study on knowledge, attitude and practice on the mode of transmission, prevention and treatment of the Buruli ulcer in Ga West District, Ghana. *Trop Med Int Health*, 12: 445-458.
101. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, Rasolofo Razanamparany V **(2007)** Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*, 11: 683-688.

102. Rouessac F, Rouessac A **(2009)** Analyse chimique: Méthodes et Techniques instrumentales, Paris, 7^{ème} édition Dunod, P512.
103. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y **(2007)** Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324.
104. Shivali G, Bhutani K **(2008)** Chromatographic analysis of kutajarista—an ayurvedic polyherbal formulation. *Phytochemical Analysis*, 19: 323–328.
105. Silverstein RM, Clayton BG, Morrill TC **(1991)** Spectrometric Identification of organic compounds. 5th ed; New York: John Wiley et sons.
106. Sopoh GE, Johnson RC, Anagonou SY, Barogui YT, Dossou AD, Houézo JG, Phanzu DM, Tente BH, Meyers WM, Portaels F **(2011)** Buruli ulcer prevalence and altitude, Bénin. *Emerg Infect Dis*, 17: 153-154.
107. Sopoh GE, Johnson RC, Chauty A, Dossou AD, Aguiar J, Salmon O, Portaels F, Asiedu K **(2007)** Buruli ulcer surveillance, Benin, 2003-2005. *Emerg Infect Dis*, 13: 1374-1376.
108. Stienstra Y, Van der Graaf WT, Asamoah K, Van der Werf TS **(2002)** Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana. *Am J Trop Med Hyg*, 67: 207-213.
109. Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Portaels F, Ross BC, Oppedisano F, Johnson PD **(2000)** Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3206–3213.
110. Thangaraj HS, Adjei O, Allen BW, Portaels F, Evans MR, Banerjee DK, Wansbrough-Jones MH **(2000)** *In vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *J Antimicrob Chemother*, 45: 231-233
111. Tosun F, Kizilay CA, Sener B, Vural M, Palittapongarnpim P **(2004)** Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol*, 95: 273-275.

112. Tsukamura M, Mikoshiba H **(1982)** A new *Mycobacterium* which caused skin infection. *Microbiol Immunol*, 26: 951-955.
113. van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, Phillips R, Adjei O, Fleischer B, Wansbrough-Jones MH, Johnson PD, Portaels F, van der Graaf WT, Asiedu K **(2005)** *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ*, 83: 785-791.
114. Van Oye E, Ballion M **(1950)** Faudra –t-il tenir compte d'une nouvelle affection à bacilles acido-résistants en Afrique? *Ann Soc Belge Méd Trop*, 30: 619-627.
115. Veitch MG, Johnson PD, Flood PE, Lestile DE, Street AC, Hayman JA **(1997)** A large localized outbreak of *Mycobacterium ulcerans* infection on a temperate southern Australia island. *Epidemiol Infect*, 119: 313- 318.
116. Vessman J **(1996)** Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal*, 14: 867-869.
117. Wagner H and Blatt S **(1996)** Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed, Berlin, Springer Verlag.
118. Walsh DS, Eyase F, Onyango D, Odindo A, Otieno W, Waitumbi JN, Bulimo WD, Schnabel DC, Meyers WM, Portaels F **(2009)** Short report: Clinical and molecular evidence for a case of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection) in Kenya. *Am J Trop Méd Hyg*, 81: 1110 -1113.
119. Walsh DS, Portaels F, Meyers WM **(2011)** Buruli ulcer: Advances in understanding *Mycobacterium ulcerans* infection. *Dermatol Clin*, 29: 1-8.
120. WHO **(2004)** Provisional guidance on the role specific antibiotics in the management of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer), Geneva, eds WHO/CDS/CPE/GBUI p.33.
121. WHO **(2007)** *Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans infection)*, Geneva, WHO press office; Fact Sheet N°199 p.5.
122. World Health Organization **(2008)** Buruli ulcer: Progress report. *Weekly Epidemiol Rec* 83, 145-156.

123. Yemoa A **(2009)** Etude phytochimique et évaluation *in vitro* sur *Mycobacterium ulcerans* de l'activité d'extraits de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin Mémoire de Diplôme d'Etude Approfondie (DEA) de Pharmacognosie. Université d'Abomey Calavi, DEA N°002- UAC.
124. Yémoa A, Gbénou J, Affolabi D, Moudachirou M, Bigot A, Anagonou S, Portaels F, Quetin-Leclercq J, Martin A **(2011)** Buruli ulcer: A review of *In Vitro* tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans*. *Planta Med*, 77: 641–646.
125. Yémoa AL, Gbénou JD, Johnson RC, Djégo JG, Zinsou C, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J, Bigot A, Portaels F **(2008)** Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*, 42: 50-57.
126. Ziefer AM, Connor DH, Gibson DW **(1981)** *Mycobacterium ulcerans* infection of two patients in Liberia. *Int J Dermatol*, 20: 362-367.

ANNEXES

**TRAVAUX SCIENTIFIQUES EN RAPPORT AVEC
LA THESE**

Publications

Yémoa AL, Gbénou JD, Johnson RC, Djégo JG, Zinsou C, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J, Bigot A, Portaels F (2008) Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*, 42: 50-57.

Yemoa AL, Gbenou J, Affolabi D, Moudachirou M, Bigot A, Anagonou S, Portaels F, Quetin-Leclercq J, Martin A (2011) Buruli ulcer: A review of *In Vitro* tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans*. *Planta Med*, 77: 641–646.

Posters

Yemoa AL, Gbenou JD, Johnson RC, Djégo JG, Zinsou C, Moudachirou M, Bigot A, Portaels F, Quetin-Leclercq J (2008) Identification and chemical study of plants used in the traditional treatment of Buruli Ulcer in Benin. *Planta medica*, 74: 1069 (Poster présenté au 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE et SIF ; Grèce).

Communications et présentations orales

Yemoa AL, Gbenou JD, Johnson RC, Djégo JG, Zinsou C, Moudachirou M, Bigot A, Portaels F, Quetin-Leclercq J (2007). Identification et étude phytochimique de plante utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin (Abstrat publié dans le livre du congrès, CIPO ; Burkina Faso).

Participation à des colloques, congrès et réunions internationales

- ✓ Annual Meeting of Belgian Society for Mass spectrometry (BSMS): 16th april 2010, CATHOLIC UNIVERSITY OF LOUVAIN, WOLUWE, BELGIUM
- ✓ *Maladies tropicales négligées, Réunion de haut niveau sur l'Ulçère de Buruli*: Cotonou (Bénin) du 30 au 03 Avril 2009. OMS,MSP-Bénin, ONG Wather for all children-Africa.
- ✓ Congrès Constitutif de La Société Béninoise De Parasitologie – Mycologie (SOBEPAM): Cotonou (Bénin), les 14,15 et 16 Janvier 2009.
- ✓ 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE et SIF du 3 au 8 Août 2008 à ATHENES (GRECE).

- ✓ Congrès International de Phytothérapie de Ouagadougou (Burkina Faso): CIPO **2007**
- ✓ Colloque international sur l'Amélioration de la prise en charge de la tuberculose et de l'ulcère de Buruli en Afrique: Cotonou (Bénin) du 05 au 07 décembre **2005**. Institut de Médecine Tropicale (IMT) Antwerpen- Belgique, Programme National de Lutte contre l'Ulçère de Buruli, MSP- Bénin.

Séminaires

1- CHIMIE ANALYTIQUE

2008 : HPLC/ UPLC (Société Walters, Belgique)

2010: Oneline coupling of HPTLC-MS (CAMAG, Belgium)

2- BIOLOGIE

2008 : Bactériologie / Virologie: Formation Biowin 2008, Belgique

2008 : Culture cellulaire: Formation Biowin 2008, Belgique

3- STATISTIQUES

2008: Validation des méthodes analytiques: Formation Biowin, Belgique

2010: Statistical concepts and methods for live sciences: Formation Biowin, Belgique

4- ETHNOPHARMACOLOGIE

2010: Ethnopharmacologie appliquée, de la plante au médicament (Société Française d'Ethnopharmacologie; France)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

Yemoa A.L.^{1,2}, Gbenou J.D.², Johnson R.C.³, Djego J.G.⁴, Zinsou C.⁵, Moudachirou M.², Quetin-Leclercq J.⁶, Bigot A.¹, Portaels F.*⁷

R
É
S
U
M
É

Le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli (UB) au Bénin se fait principalement à base de plantes. L'enquête ethnobotanique menée auprès de 17 tradipraticiens dans la commune de Ouinhi (département du Zou) a répertorié 49 plantes différentes utilisées pour traiter cette maladie. Deux de ces plantes présentent un fort taux d'utilisation : *Erythrophleum suaveolens* (Guill. et Perr.) Brenan et *Strophanthus hispidus* DC. L'étude phytochimique de dix-sept de ces plantes révèle la présence de grands groupes chimiques dont de nombreux composés possèdent diverses propriétés notamment anti-œdémateuses, anti-inflammatoires, antibactériennes, antiseptiques, sédatives, analgésiques, anesthésiques, cicatrisantes qui pourraient intervenir dans le traitement de l'UB.

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier les composés de ces groupes chimiques présents dans les plantes et étudier leur place relative dans le traitement de l'UB.

Mots clés : Ulcère de Buruli - Tradipraticiens - Phytothérapie - Etude phytochimique

INTRODUCTION

L'ulcère de Buruli (UB) est une affection cutanée provoquée par une mycobactérie appelée *Mycobacterium ulcerans*. Les foyers sont circonscrits géographiquement presque toujours autour d'un écosystème aquatique (fleuve, lac artificiel ou naturel, zone marécageuse, système d'irrigation) (Portaels & Meyers, 2006). A ce jour, l'UB a été recensé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans plus de trente pays de plusieurs continents (Afrique, Amérique, Asie, Océanie). Au Bénin, c'est la deuxième affection mycobactérienne après la tuberculose, avec près de 7000 cas entre 1989 et 2006 (Johnson *et al.*, 2004 ; WHO, 2007).

L'UB débute par un nodule, une plaque ou un œdème indolore au niveau de la peau qui, en l'absence de traitement, évolue vers une ulcération massive de la peau (Asiedu *et al.*, 2000). Actuellement, seul le traitement chirurgical éventuellement associé ou non aux antibiotiques spécifiques a une efficacité prouvée (van der Werf *et al.*, 2005). Il ne peut cependant être réalisé que dans certains centres médicaux disposant d'un plateau technique adéquat et de personnel spécialisé (van der Werf *et al.*, 2005).

Pour les malades, ce traitement paraît coûteux et pourvoyeur de mutilations diverses, voire des amputations (Stienstra *et al.*, 2002).

Le traitement traditionnel pour des raisons aussi bien culturelles qu'économiques, est donc le premier recours qui s'offre à ces malades qui sont en général pauvres (Johnson *et al.*, 2004).

Malgré son importance pour les malades, il est peu documenté. Deux études antérieures réalisées au Bénin par Guédénon *et al.*

Contact

1. UFR Pharmacie, Faculté des Sciences de la Santé (FSS), Université d'Abomey-Calavi (UAC), Bénin
2. Laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles, FSS / UAC, Bénin
3. Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, (PNLUB), Ministère de la Santé Publique, Cotonou, Bénin
4. Laboratoire d'Ecologie Appliquée (LEA), Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), UAC, Bénin
5. Centre Sanitaire et Nutritionnel Gbemoten, Zagnanado, Bénin
6. Université Catholique de Louvain, Laboratoire de Pharmacognosie, Unité CHAM, Bruxelles, Belgique
7. Institut de Médecine Tropicale, Département Microbiologie Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique

*Auteur correspondant : portaels@itg.be

(1995) et Johnson *et al.* (2004) ont décrit ce type de traitement, notamment le contexte culturel et les différentes formes de ce traitement. Cependant, la plupart des différentes composantes entrant dans ce traitement appartiennent au règne végétal et sont peu connues. C'est dans le but d'identifier les plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB et de caractériser les grands groupes de substances chimiques contenus dans ces plantes que la présente étude est réalisée.

MATERIEL ET METHODES

1. Cadre d'étude

L'étude s'est déroulée au Bénin dans la commune de Ouinhi dans le département du Zou. La commune de Ouinhi (Figures 1 et 2) couvre une superficie de 483 km² avec une population estimée à 38 319 habitants en 2005. Son système sanitaire comporte un Centre de Santé de Commune (CSC) et quatre Centres de Santé d'Arrondissement (CSA).

Ouinhi se situe dans une dépression argilo-marneuse marquée par une plaine d'inondation (Adjanooun *et al.*, 1989). La végétation est constituée de mosaïques de cultures et de jachères, de savanes à emprise agricole et de savanes marécageuses. Ce biotope est très favorable au développement de *M. ulcerans*. En effet, Ouinhi constitue un foyer d'UB à forte endémicité : en 1997, on a noté 73 cas. Ce chiffre est le deuxième après Zagnanado (76 cas). En 2001, on a noté 32 cas, contre 52 cas pour Zagnanado qui vient toujours en première position dans le département du Zou (Debacker *et al.*, 2004).

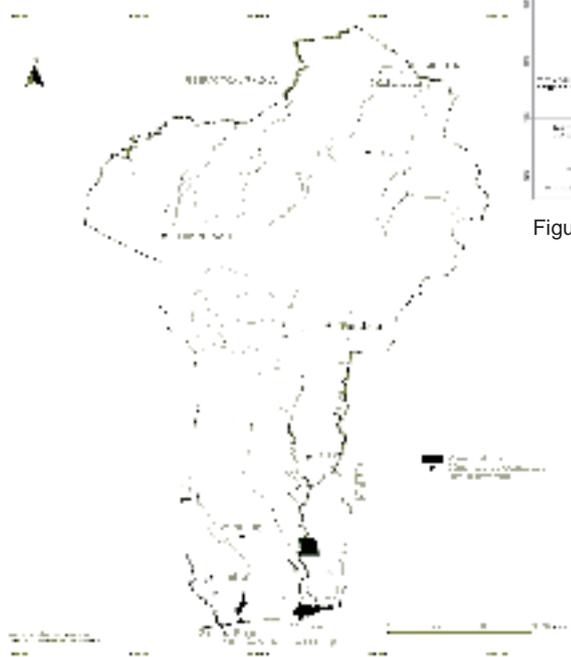


Figure 1 : Carte du Bénin situant la zone d'étude (commune de Ouinhi)

2. Méthode d'étude

2.1. Nature de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale qualitative effectuée en deux phases :

- une phase préparatoire allant de février à avril 2005 pour la phase prospective et la prise de contact avec les autorités, l'édition d'une fiche d'enquête en collaboration avec le coordonnateur du Programme National de Lutte contre l'UB (PNLUB) et le pré-test
- une phase d'enquête proprement dite allant d'avril à octobre 2005 pour l'enquête ethnobotanique, la récolte des plantes et l'identification, le traitement des données et l'analyse phytochimique.

2.2. Population d'étude

L'étude porte sur dix-sept tradipraticiens de la commune de Ouinhi et sur les plantes médicinales qu'ils utilisent pour traiter l'UB.

2.3. Collecte des données

2.3.1. L'enquête ethnobotanique

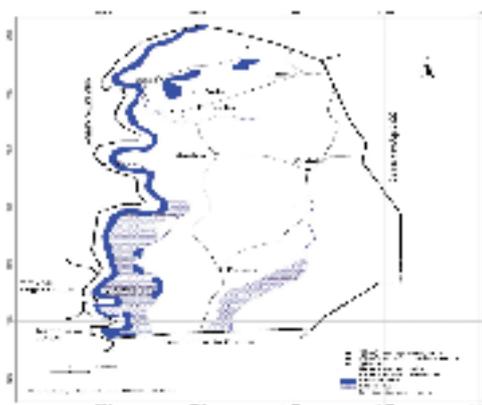


Figure 2 : Carte de la commune d'Ouinhi

Afin de mettre en confiance les cibles de l'enquête et assurer la fiabilité des informations à recueillir, l'enquête ethnobotanique a nécessité une phase de préparation du terrain. A cet effet, des rencontres et discussions avec des tradipraticiens de la commune de Ouinhi et le médecin-chef du CSC ont été effectuées.

Pour l'enquête ethnobotanique proprement dite, un questionnaire a été adressé aux tradipraticiens. Il renferme des questions relatives aux informations botaniques, ethnobotaniques et ethnopharmacologiques. Il a été procédé à une enquête individuelle et les informations reçues ont été notées. Ainsi, à l'aide de guides ayant une connaissance des plantes et de botanistes, les plantes indiquées par les tradipraticiens ont été systématiquement photographiées et des échantillons représentatifs ont été récoltés en vue de leur identification.

Ont été inclus dans l'étude : les tradipraticiens résidant dans la commune de Ouinhi, ayant des connaissances sur l'UB ainsi que sur son traitement traditionnel et ayant traité et gardé chez eux plusieurs cas d'UB.

Traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

2.3.2. Récolte des échantillons

La position spatiale de l'espèce végétale est d'abord déterminée grâce à un G.P.S (Global Positioning System). Les plantes herbacées sont récoltées entières, avec, si possible, fleurs et fruits. Pour les arbres et arbustes, un rameau feuillé avec fleurs et fruits est coupé. La récolte d'un fragment d'écorce est souvent nécessaire pour faciliter l'identification.

Lorsque les échantillons sont trop longs (exemple : Poaceae de savanes), on récolte les parties fructifiées, les feuilles supérieures et les feuilles inférieures ainsi que les fragments caractéristiques des racines.

Les fleurs délicates sont étalées au moment de la récolte entre deux morceaux de papier humide. Les plantes aquatiques sont récoltées en masse dans du papier humide.

Au moment de la récolte, la date de récolte, la localité, la station (savane, forêt, prairie...), la couleur des fleurs, le nom scientifique et si possible le nom vulgaire sont répertoriés; un numéro est ensuite attribué à chaque échantillon.

2.4. Identification des espèces végétales

L'herbier national du Bénin et le laboratoire d'écologie appliquée de la faculté des sciences agronomiques de l'Université d'Abomey Calavi se sont chargés de l'identification à partir des échantillons récoltés : numéro d'herbier, nom de la famille, nom latin, nom français et nom vernaculaire.

2.5. L'analyse phytochimique

Les différentes analyses chimiques sont effectuées au laboratoire de pharmacognosie et des huiles essentielles de l'Université d'Abomey Calavi par un criblage phytochimique. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Celle-ci est effectuée sur des drogues végétales sèches et/ou fraîches selon la méthodologie décrite par Houghton & Raman (1998). Le tableau I indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

2.6. Traitement des données : analyse statistique

L'analyse statistique est faite à l'aide du logiciel <SPSS for windows> version 11.5. Pour l'analyse des données, le taux d'utilisation (t) de chaque plante est calculé comme suit :

$$t = \frac{\text{Nombre d'utilisateurs d'une plante donnée} \times 100}{\text{Nombre total d'utilisateurs}}$$

RESULTATS

1. L'enquête ethnobotanique

Au terme de l'enquête, 49 plantes différentes sont identifiées. Elles appartiennent à 32 familles. Le tableau II liste ces plantes, les parties utilisées, leurs modes de préparation ainsi que leurs taux d'utilisation.

Il ressort de l'analyse de ce tableau que les plantes les plus utilisées sont :

Erythrophleum suaveolens (Guill. et Perr.) Brenan : t = 35,3%
Strophanthus hispidus DC.: t = 29,4%

2. Plantes retenues pour l'analyse phytochimique

Nous avons réparti les 49 plantes répertoriées (Tableau II) et identifiées en trois groupes. Dans cette étude, nous considérons comme taux fort d'utilisation un t compris entre 25% et 50%, comme taux moyen d'utilisation 10 % < t ≤ 25%, et comme taux faible d'utilisation un t < 10%.

Ainsi le groupe I comprend les deux plantes ayant un fort taux d'utilisation, celles souvent disponibles en toutes saisons ainsi que les plantes qui ont une distribution géographique large. Son effectif est de 17.

Le groupe II a également un effectif de 17 plantes et reprend les



Erythrophleum suaveolens
(à droite)

Strophanthus hispidus
(à gauche)



Tableau I : Réactifs spécifiques et réactions du criblage phytochimique

Groupes chimiques	Réactifs et résultats positifs
Alcaloïdes	Mayer (iodomercurate de potassium) → précipité jaunâtre
Huiles essentielles	Hydro distillation. Odorat
Dérivés quinoniques	Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en milieu NH ₄ OH) → coloration rouge violacée
Tanins	FeCl ₃ → coloration bleu-foncée, verte ou noire
Flavonoïdes	Shinoda (réaction à la cyanidine) → coloration orangée, rouge ou violette
Dérivés cyanogénétiques	Guignard (papier imprégné d'acide picrique) → coloration marron
Stéroïdes et terpènes	Libermann-Burchard (anhydride acétique-H ₂ SO ₄ , 50:1) → coloration violette-bleue ou verte
Saponosides	Détermination de l'Indice Mousse (IM*) : test positif si IM>100

* IM est le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue végétale qui, dans les conditions déterminées, donne une mousse persistante

plantes qui ont un taux moyen d'utilisation. Elles sont complétées de quelques plantes à faible taux d'utilisation.

Le groupe III comprend les 15 plantes restantes.

La présente étude prend uniquement en compte le groupe I. Les groupes II et III feront l'objet d'une analyse ultérieure. Les plantes appartenant au groupe I sont marquées d'une * dans le tableau II.

3. Analyse phytochimique

Les résultats de l'analyse phytochimique sont présentés dans le tableau III. Le signe "+" traduit la présence du groupe de composés chimiques en quantité supérieure au seuil de détection, et le signe "-" une réaction négative. Il ressort de l'analyse de ce tableau que huit grands groupes de composés chimiques sont caractérisés. Il s'agit des alcaloïdes, des huiles essentielles, des dérivés quinoniques, des tanins, des flavonoïdes, des dérivés cyanogénétiques, des stéroïdes et terpènes, des saponosides.

Le tableau III montre que les tanins sont le groupe chimique le plus fréquent. On les retrouve dans 13 plantes. Ils sont suivis par les saponosides présents dans 10 plantes. Les dérivés quinoniques et cyanogénétiques, par contre, ne sont présents que dans une seule plante.

DISCUSSION

La présente étude, relative à l'identification et à l'étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'UB dans la commune de Ouinhi au Bénin, a inclus 17 tradipraticiens parmi ceux qui reçoivent et traitent des malades atteints d'UB. Parmi les plantes qu'ils utilisent, 49 ont été identifiées. Elles sont regroupées au sein de 32 familles. Différentes parties de ces plantes sont utilisées sous diverses

formes de préparation par voie interne et/ou externe. *Erythrophleum suaveolens* (Guill et Perr.) Brenan et *Strophanthus hispidus* DC. sont les plus fréquemment utilisées et se retrouvent dans la plupart des préparations. Leur taux d'utilisation est respectivement de 35,3% et 29,4%.

Plusieurs revues montrent que des composés isolés de plantes appartenant aux différents groupes chimiques caractérisés dans ces plantes (principalement alcaloïdes, flavonoïdes et autres composés phénoliques, terpènes, volatils ou non, stéroïdes ou saponosides) possèdent une activité inhibitrice de la croissance *in vitro* de *M. tuberculosis* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) < 10mg/ml (Copp, 2003 ; Newton et al., 2000 ; Okunade et al., 2004).

Selon les données que nous avons recueillies lors de notre étude, différents extraits provenant des 17 plantes retenues pour l'analyse phytochimique ont été administrés par les tradipraticiens *per os* et/ou localement sous forme d'associations diverses (tableau II), sans tenir compte des problèmes de toxicité et ou d'interactions. Ceci pourrait éventuellement causer des échecs thérapeutiques voire des accidents.

Plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels en Afrique, ont fait état de problèmes similaires (Pousset, 2004). Il ressort de cette analyse l'intérêt d'une standardisation des remèdes traditionnels à base de plantes. Par ailleurs, il existe une nécessité urgente d'études toxicologiques et pharmacologiques sur ces remèdes.

Le traitement traditionnel de l'UB se fait en quatre étapes : le diagnostic de la maladie, l'ablation de la nécrose, le soin de la plaie et l'exorcisme (Johnson *et al.*, 2004). L'utilisation des plantes se fait principalement au cours des deuxième et troisième phases du traitement. Pour vérifier l'effet directe sur *M. ulcerans* des plantes sélectionnées, les extraits doivent être testés *in vitro*. Un effet inhibiteur de la croissance serait le signe d'un effet aussi bien symptomatique qu'étiologique. Dans le cas contraire, ce traitement

Traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

Tableau II : Répertoire des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin

Famille	Nom (genre et espèce)	Partie utilisée	Préparation	t (%)	a, b
Anarcadiaceae	<i>Lannea kerstingii</i> (Engl.) K. Krause	Feuille	Décoction	5,9	
	<i>Spondias mombin</i> L.	Feuille	Décoction / Trituration	5,9	
Annonaceae	<i>Xylopia aethiopica</i> * (Dunal) A. Rich.	Fruit	Décoction	17,6	a
	<i>Monodora myristica</i> * (Gaertn) Duna	Graine	Décoction	17,6	a
Apocynaceae	<i>Strophanthus hispidus</i> * DC.	Racine	Décoction / Macération	29,4	a
	<i>Holarhena floribunda</i> (G.Don) T. Durand et Schinz	Racine	Décoction	5,9	
Araceae	<i>Anchomanes difformis</i> * (Bl.) Engl.	Racine	Décoction	5,9	a
Asteraceae	<i>Launaea taraxacifolia</i> (Wild.) Amin	Feuille	Décoction	5,9	
	<i>Vernonia amygdalina</i> L.	Feuille	Utilisé tel	5,9	
Bignoniaceae	<i>Spathodea campanulata</i> * P. Beauv.	Ecorce / Racine	Infusion	11,8	a,b
	<i>Stereospermum kuntianum</i> Cham	Ecorce	Décoction	5,9	
	<i>Newbouldia laevis</i> * (P. Beauv.) Seem.	Racine	Trituration	5,9	a
Caesalpinaceae	<i>Erythrophleum suaveolens</i> * (Guill. et Perr.) Brenan	Ecorce	Décoction	35,3	a
		Racine	Macération / Pulvérisation		
	<i>Piliostigma thonningii</i> * (Schum.) Milne-Redh.	Feuille	Décoction	11,8	a,b
Capparaceae	<i>Ritchiea capparoides</i> (Andrews) Britten	Racine	Macération	5,9	
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> * L.	Feuille	Décoction	5,9	a,b
Clusiaceae	<i>Garcinia kola</i> * Heckel	Racine	Pulvérisation / Infusion	5,9	a
Combretaceae	<i>Anogeissus leiocarpus</i> * (DC.) Guill. et Perr.	Feuille / Racine	Décoction	11,8	a,b
	<i>Terminalia glaucescens</i> Planch.	Ecorce / Racine	Décoction	5,9	
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	Feuille	Pulvérisation	5,9	
Cucurbitaceae	<i>Kedrostis foedissima</i> (Jacq.) Cogn.	Feuille	Trituration	11,8	
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia kamerunica</i> Pax.	Ecorce	Décoction	17,6	
	<i>Hymenocardia acida</i> * Tul.	Ecorce / Pulvérisation	Décoction	11,8	a
	<i>Bridellia ferruginea</i> * Benth.	Ecorce	Trituration	17,6	a
	<i>Euphorbia unispina</i> * N.E.Br.	Tronc	Décoction	5,9	a,b
	<i>Jatropha curcas</i> L.	Feuille	Décoction	5,9	
	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Feuille	Pulvérisation	5,9	
Fabaceae	<i>Lonchocarpus cyanescens</i> (Schum. et Thonn.) Benth	Racine	Macération	5,9	
Lamiaceae	<i>Ocimum gratissimum</i> * L.	Feuille	Infusion	11,8	a,b
	<i>Ocimum canum</i> Sims	Feuille	Infusion	5,9	
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Bulbe	Infusion	11,8	
Liliaceae	<i>Aloë buettneri</i> A. Berger	Feuille	Macération	5,9	
Melastomataceae	<i>Dissotis rotundifolia</i> * (Sm.) Triana	Feuille	Décoction	5,9	a
Mimosaceae	<i>Tetrapleura tetraptera</i> (Schum. et Thonn.) Taub	Fruit	Macération	5,9	
Moraceae	<i>Ficus exasperata</i> Vahl	Feuille	Utilisé tel	5,9	
Musaceae	<i>Musa sinensis</i> Sag.	Tige	Macération	11,8	
Myrtaceae	<i>Eugenia aromatica</i> (L.) Baill.	Fruit	Décoction	5,9	
Nyctagynaceae	<i>Boerhavia erecta</i> L.	Feuille / Racine	Décoction	5,9	
Periplocaceae	<i>Parquetina nigrescens</i> (Afzel.) Bullock	Feuille	Utilisé tel	5,9	
Piperaceae	<i>Piper guineense</i> Schum. et Thonn.	Graine	Infusion	5,9	
Poaceae	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Plante entière	Pulvérisation	5,9	
Polygalaceae	<i>Carpolobia lutea</i> G. Don.	Tige	Pulvérisation	5,9	
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Fruit	Décoction	11,8	
	<i>Clausena anisata</i> (Wild.) Hook. f.	Racine	Infusion	5,9	
Sapindaceae	<i>Paullinia pinnata</i> * L.	Feuille	Décoction / Trituration	11,8	a,b
Sapotaceae	<i>Vitellaria paradoxa</i> Gaertn.	Feuille	Décoction	11,8	
Solanaceae	<i>Capsicum frutescens</i> L.	Fruit	Macération	5,9	
Zingiberaceae	<i>Aframomum melegueta</i> K. Schum.	Fruit	Carbonisation	5,9	
	<i>Curcuma longa</i> L.	Feuille	Décoction	5,9	

* Plantes retenues pour l'analyse phytochimique

t = taux d'utilisation

a = plantes disponibles en toutes saisons / b = plantes à distribution géographique large

serait considéré comme symptomatique et relèverait plutôt des propriétés anti-oedémateuses, anti-inflammatoires, sédatives, analgésiques, anesthésiques ou cicatrisantes.

Jusqu'en 2004, le traitement chirurgical était le seul traitement reconnu (OMS, 2001). Suite à des résultats encourageants sur des lésions précoces, l'OMS recommande depuis 2004 l'utilisation de l'association rifampicine-streptomycine associée ou non à la chirurgie suivant les cas (WHO, 2004). Nous pensons qu'au cours de la phase préopératoire, l'administration d'extraits de plantes efficaces pourrait également être envisagée. Cela soulagerait au

moins les patients du point de vue des manifestations symptomatiques de la maladie (oedème, inflammation, anxiété, douleur) et serait compatible avec leur vécu culturel.

Etant donné qu'au Bénin comme dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest tel le Ghana, la majorité des patients atteints d'UB consultent en premier lieu un tradipraticien, il est important de favoriser la collaboration entre les tradipraticiens, les médecins et les autres professionnels de la santé afin d'améliorer la prise en charge de l'UB tout en respectant le vécu culturel des patients (Johnson *et al.* 2004 ; Renzaho *et al.*, 2007).

MINI-MONOGRAPHIE DES 2 PLANTES LES PLUS UTILISÉES

Erythrophleum suaveolens (Guill. et Perr.) Brenan

Identification

Nom commun	Bois rouge, Poison de Guinée
Famille	Caesalpinaceae
Origine	Afrique de l'Ouest

Caractères botaniques

Forme biologique	Arbre haut de 15 à 35 m ou plus
Feuillage	Feuille bipennée alternée
Inflorescence	Fleur blanc crème en épis long de 5 à 12 cm
Fruit	Gousse ligneuse plate d'un rouge noirâtre, longue de 6 à 15 cm, large de 3 à 4 cm, contenant 6 à 10 graines oblongues, aplaties, brun rougeâtre
Station	Lisière de la forêt dense, galeries, forêt sèche dense et savane

Usage médical

- Tuberculose, bronchite, angine : l'écorce est utilisée en décoction et administrée par voie orale en faible quantité
- Affections dermatologiques et plaies : l'écorce et la feuille sont utilisées en infusion
- Lèpre : l'écorce est utilisée en macéré en bain de douche
- Autres usages : blennorragie, sinusite, morsure de serpent

Usage dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli

Récolte	Pas de condition particulière. Mais la récolte par les femmes en menstruations est déconseillée par les tradipraticiens
Partie utilisée	Racine et écorce du tronc
Préparation	Décoction, pulvérisation de l'écorce du tronc et de la racine
Ablation de la nécrose	Utiliser le décocté tiède pour nettoyer la plaie 3/ jour pendant 3 à 4 jours
Soins de la plaie	Utiliser le décocté pour laver la plaie et appliquer la poudre à la surface. Administrer le décocté sous forme de tisane. La durée du traitement est fonction de l'étendue de la plaie. Il dure de 2 semaines à plusieurs mois.

Strophanthus hispidus DC

Identification

Nom commun	Strophanthe velu
Famille	Apocynaceae
Origine	Afrique de l'Ouest (Bénin, Togo, Côte d'Ivoire), Afrique orientale, Afrique centrale

Caractères botaniques

Forme biologique	Arbuste sarmenteux à latex translucide
Feuillage	Feuilles opposées, oblongues, sessiles
Fruit	Double follicule cylindrique.
Station	Savane

Usage médical

- Abscesses et cicatrisation de plaies : usage de la décoction de la racine en application externe
- Lèpre : décoction de la racine à administrer par voie orale
- Plaies : les feuilles sont utilisées sous forme de cataplasme
- Ulcères syphilitiques : l'écorce des tiges ou de la racine est donnée en boisson, en lavement et en application locale
- Ascites : usage de la macération aqueuse de la racine et de l'écorce des tiges comme boisson.

Usage dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli

Récolte	Pas de condition particulière, mais la récolte par les femmes en menstruations est déconseillée par les tradipraticiens
Partie utilisée	Racine
Préparation	Décoction, macération
Ablation de la nécrose	Utiliser le décocté tiède pour nettoyer la plaie 3x /jour pendant 10 jours
Soins de la plaie	Débuter après l'ablation de la nécrose. Utiliser le décocté ou le macéré pour laver la plaie. La durée du traitement est fonction de l'étendue de la plaie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES POUR LA MONOGRAPHIE

Adjanooun E.A., Adjakidje V., Ahyi M.R., Ake A.L., Akoegninou A., d'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Cusset G., Dramane K., Eyme J., Gassita J.N., Gbaguidi N., Goudote E., Guinko S., Houngnon P., Issa L., Keita A., Kiniffo H.V., Kone-Bamba D., Musampa N.A., Saadou M., Sodogandji T., de Souza S., Tchabi A., Zinsou D.C., Zohoun T. (1989) *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin*, Paris, Edition de l'ACCT, 895 p. (Médecine traditionnelle et pharmacopée)

Berhaut J. (1971) *Flore illustrée du Sénégal*, Dakar, 610 p.

Bouhard B. (2001) *Dictionnaire Plantes Médicinales du monde-Réalités et croyances*, Paris, Ed Estem, 634 p.

Neuwinger H.D. (2000) *African Traditional medicine. A dictionary of plant use and application*, London, Medpharm Scientific Publishers, 589 p.

Thies E. (1995) *Principaux ligneux forestiers de la Guinée-Zone de transition Guinée Bissau, Guinée, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin, Niger, Cameroun*, GTZ, 541p.

Tableau III : Résultats du criblage phytochimique

Plantes	Composés chimiques							
	Al	He	dq	Ta	Fl	dcy	T/St	Sap
<i>Erythrophleum suaveolens*</i> (Ecorce)	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>Erythrophleum suaveolens*</i> (Racine)	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Strophanthus hispidus</i> (Racine)	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Euphorbia unispina</i> (Tronc)	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Piliostigma thonningii</i> (Feuille)	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Paullinia pinnata</i> (Feuille)	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bridellia ferruginea</i> (Ecorce)	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Spathodea campanulata</i> (Racine)	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Hymenocardia acida</i> (Ecorce)	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Anogeissus leiocarpus*</i> (Feuille)	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Anogeissus leiocarpus*</i> (Racine)	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Anchomanes difformis</i> (Racine)	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Dissotis rotundifolia</i> (Feuille)	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Newbouldia leavis</i> (Feuille)	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Garcinia kola</i> (Racine)	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Xylopi aethiopica</i> (Fruit)	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Monodora myristica</i> (Graine)	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ocimum gratissimum</i> (Feuille)	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Chenopodium ambrosiodes</i> (Feuille)	-	+	-	-	-	-	-	+
Total ⁽¹⁾	7	4	1	13	8	1	3	10

(1) Nombre de plantes contenant un composé chimique donné
* Plantes dont plusieurs parties sont utilisées

Légende
Al: alcaloïde
He: huile essentielle
dq: dérivé quinonique
Ta: tanins
Fl: flavonoïde
dcy: dérivé cyanogénétique
T/St: terpène et stéroïde
Sap: saponoside

CONCLUSION

Le traitement chirurgical de l'UB associé aux antibiotiques spécifiques se heurte à d'énormes facteurs limitatifs liés entre autres à l'infrastructure nécessaire, au coût des traitements et aux rechutes. Ainsi, d'autres voies de recherches comme l'utilisation de la phytothérapie devraient être explorées pour améliorer la prise en charge de l'UB.

Au vu de l'étape actuelle des résultats de notre étude, une collaboration entre médecine traditionnelle et médecine moderne devrait être envisagée.

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier les composés présents dans les plantes que nous avons sélectionnées, et étudier leur place respective dans le traitement de l'UB.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à l'endroit des tradipraticiens et autorités locales de la commune de Ouinhi sans qui la présente étude n'aurait pu être réalisée. Nos sincères remerciements au Dr Adjakidje Victor, botaniste de l'herbier national du Bénin, et à son collaborateur M. Yedomonhan Paul.

Ce travail a partiellement bénéficié d'un soutien financier de la Commission Européenne (Projet BURULICO n°INCO-CT-2005-051476). M. Yemoa Achille bénéficie depuis septembre 2006 d'une bourse de formation doctorale du Commissariat général aux Relations internationales de la Communauté française Wallonie-Bruxelles (CGRI).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adjanooun E.A., Adjakidje V., Ahyi M.R., Ake A.L., Akoegninou A., d'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Cusset G., Dramane K., Eyme J., Gassita J.N., Gbaguidi N., Goudote E., Guinko S., Houngnon P., Issa L., Keita A., Kiniffo H.V., Kone-Bamba D., Musampa N.A., Saadou M., Sogodandji T., de Souza S., Tchabi A., Zinsou D.C., Zohoun T. (1989) *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République*

Populaire du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée, Paris, Edition de l'ACCT, p. 895.

Asiedu K., Scherpier R., Raviglione M. (2000) *UB: infection à Mycobacterium ulcerans*, Genève, eds WHO/CDS/CPE/GBUI, p.117.

Copp B.R. (2003) Antimycobacterial natural products, *Nat Prod Rep*, 20: 6, 535-557.

Debacker M., Aguiar J., Steunou C., Zinsou C., Meyers W.M., Guedenon A., Scott J.T., Dramaix M., Portaels F. (2004) *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001, *Emerg Infect Dis*, 10: 8, 1391-1398.

Guedenon A., Zinsou C., Josse R., Andele K., Pritze S., Portaels F., Meyers W.M. (1995) Traditional treatment of Buruli ulcer in Benin, *Arch Dermatol*, 131: 741-742.

Houghton P.J., Raman A. (1998) *Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts*, New York, Ed Chapman and Hall, p.208.

Johnson R.C., Makoutode M., Hougnyhin R., Guedenon A., Ifebe D., Boko M., Portaels F. (2004) Traditional treatment for Buruli ulcer in Benin, *Med Trop*, 64: 2, 145-150.

Newton S.M., Lau C, Wright C.W. (2000) A review of antimycobacterial natural products, *Phytother Res*, 14: 5, 303-322.

Okunade A.L., Elvin-Lewis M.P., Lewis W.H. (2004) Natural antimycobacterial metabolites: current status, *Phytochemistry*, 65: 8, 1017-1032.

OMS (2001) *Ulcère de Buruli. Prise en charge de l'infection à Mycobacterium ulcerans*, Genève, eds WHO/CDS/CPE/GBUI, p.92.

Portaels F., Meyers W.M. (2006) Buruli ulcer. In Faber W.R., Hay R.J., Naafs B (Eds.), *Imported skin diseases*, The Netherlands, Elsevier Gezondheidszorg, Maarssen, 117-129.

Pousset J. (2004) *Plantes médicinales d'Afrique, Comment les reconnaître et les utiliser ?*, Aix-en-Provence, Edisud, p.288.

Renzaho A.M., Woods P.V., Ackumey M.M., Harvey S.K., Kotin J. (2007) Community-based study on knowledge, attitude and practice on the mode of transmission, prevention and treatment of the Buruli ulcer in Ga West District, Ghana, *Trop Med Int Health*, 12: 3, 445-458.

Stienstra Y., van der Graaf W.T., Asamoah K., van der Werf T.S. (2002) Beliefs and attitudes toward Buruli ulcer in Ghana, *Am J Trop Med Hyg*, 67: 2, 207-13.

Van der Werf T.S., Stienstra Y., Johnson R.C., Phillips R., Adjei O., Fleischer B., Wansbrough-Jones M.H., Johnson P.D., Portaels F., van der Graaf W.T., Asiedu K. (2005) *Mycobacterium ulcerans* disease, *Bull World Health Organ*, 83: 10, 785-791.

WHO (2007) Geneva, WHO press office, Fact Sheet N°199, p. 5.

WHO (2004) *Provisional guidance on the role specific antibiotics in the management of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli ulcer)*, Geneva, WHO/CDS/CPE/GBUI, 33 p.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
RESUME	1
I - BUT DU TRAVAIL	5
II – INTRODUCTION	8
2.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR L'UB	9
2.1.1. Historique et répartition géographique	9
2.1.2. Incidence, Prévalence, distribution de cas.	9
2.1.3. Epidémiologie	11
2.1.3.1 Agent pathogène.....	11
2.1.3.2. Terrain.....	14
2.1.4. Pathogénie	14
2.1.5. Etude clinique	15
2.1.5.1. Les stades cliniques	15
2.1.5.1.1. Stade pré ulcéré	15
2.1.5.1.2. Stade ulcéré.....	16
2.1.5.1.3. Stade cicatriciel.....	16
2.1.5.2. Les autres formes cliniques	16
2.1.6. Diagnostic	16
2.1.6.1. Diagnostic clinique	16
2.1.6.2. Diagnostic microbiologique	17
2.1.6.2.1. Prélèvement	17
2.1.6.2.2. Critères biologiques	18
2.1.6.3. Diagnostic radiologique	18
2.1.6.4. Diagnostic différentiel	18
2.1.7. Traitement de l'UB: historique.....	20
2.1.7.1. Le traitement chirurgical	20
2.1.7.2. Le traitement médicamenteux	22
2.1.7.2.1. Drug Susceptibility Test (DST)	22
2.1.7.2.2. Antibiotiques actifs sur <i>M. ulcerans</i> chez l'homme	23
2.1.7.3. La réadaptation.....	27
2.1.7.4. Traitements liés aux caractéristiques de <i>M. ulcerans</i>	27
2.1.7.4.1. Thermo thérapie	27
2.1.7.4.2. Traitement de l'UB par des agents chimiques.....	27
2.1.7.5. Traitement traditionnel de l'UB.....	27
2.1.7.6. Traitement préventif de l'UB.....	31
2.1.8. Situation de l'UB au Bénin	31
III – IDENTIFICATION DES PLANTES	33
3.1. INTRODUCTION	34
3.2. CADRE D'ETUDE	34
3.3. MATERIELS ET METHODE	36
3.3.1. Nature de l'étude	36

3.3.2. Population d'étude	36
3.3.3. Collecte de données	36
3.3.3.1. L'enquête ethnobotanique.	36
3.3.3.2. Récolte des échantillons	37
3.3.4. Identification des espèces végétales	37
3.3.5. Traitement des données: analyse statistique	37
3.4. RESULTATS	38
3.4.1. L'enquête ethnobotanique.....	38
3.4.1.1. Mode d'emploi des différentes préparations.....	42
3.5. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	42

**IV- ETUDE DE L'ACTIVITE IN VITRO SUR M. ULCERANS DES EXTRAITS HYDRO
ETHANOLIQUES DES PLANTES IDENTIFIEES : MISE AU POINT DE LA METHODE....44**

4.1. INTRODUCTION.....	45
4.2. MATERIELS ET METHODES	45
4.2.1. Matériels végétaux	45
4.2.1.1. Préparation des extraits	46
4.2.1.2. Préparation des solutions d'extrait pour le test	46
4.2.2. Matériels biologiques	46
4.2.2.1. Préparation de l'inoculum	47
4.2.2.2. Incubation	47
4.2.3. Sels Redox de resazurine	47
4.2.3.1. Principe.....	47
4.2.4. Test Biologique	48
4.2.4.1. Préparation du milieu de culture 7H9	48
4.2.4.2. Préparation de la plaque REMA	48
4.2.4.3. Inoculation des plaques	49
4.2.4.4. Addition de la resazurine	49
4.3. RESULTATS	49
4.4. DISCUSSION.....	51

**V - CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE ET FRACTIONNEMENT BIO GUIDE DE
Holarrhena floribunda (G.Don) T. Durand et Schinz54**

5.1. INTRODUCTION	55
5.1.1. <i>Holarrhena floribunda</i> (G.Don) T.Durand et Schinz).....	55
5.2. MATERIELS ET METHODE	62
5.2.1. Matériel végétal	62
5.2.2. Préparation de l'extrait	62
5.2.3. Fractionnement liquide-liquide	64
5.2.4. Chromatographie sur couche mince (CCM) des différentes fractions	66
5.2.5. Préparation d'un extrait enrichi en alcaloïdes.....	68
5.2.6. Test d'activité sur <i>M. ulcerans</i>	68

5.3. RESULTATS	69
VI- IDENTIFICATION, ISOLEMENT, DETERMINATION STRUCTURALE D'ALCALOÏDES DE H. FLORIBUNDA, ET EVALUATION DE LEUR EFFET SUR M. ulcerans.....	76
6.1. ISOLEMENT DES COMPOSES DE LA FRACTION DICHLOROMETHANE.....	77
6.1.1. Matériels et Méthodes.....	77
6.1.1.1. Extraction des alcaloïdes totaux.....	77
6.1.1.2. Purification de la fraction alcaloïdique.....	77
6.1.1.2. 1. Méthodes chromatographiques.....	77
6.1.2. Résultats.....	79
6.1.2.1. CCM préliminaires d'identification.....	79
6.1.2.2. Chromatographie liquide et filtration sur gel de SEPHADEX LH20...80	
6.2. DETERMINATION DE STRUCTURE.....	82
6.2.1. Matériels et Méthodes.....	82
6.2.1.1. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC- MS ou LC-MS).....	82
6.2.1.1.1. L'HPLC	82
6.2.1.1.2. Spectrométrie de Masse (SM).....	83
6.2.1.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	87
6.2.1.2.1. Matériels utilisés.....	88
6.2.2. Résultats	89
6.2.2.1. LC-MS	89
6.2.2.2. Spectrométrie de Masse	91
6.2.2.2.1. Analyse des spectres et des fragments obtenus par MS/MS93	
6.2.2.3. Résonance magnétique nucléaire.....	99
6.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FRACTIONS I A IV ET DE L'HOLADYSAMINE (COMPOSE D) SUR M. ULCERANS	106
6.4. CONCLUSION	107
VII - ESSAIS PRELIMINAIRES DE DEVELOPPEMENT ET DE VALIDATION D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION.....	109
A. GENERALITES SUR LA VALIDATION	110
7.1. OBJECTIF DE LA VALIDATION	110
7.2. DIFFERENTES PHASES DE LA VALIDATION	110
7.2.1. Phase de Prévalidation	111
7.2.2. Phase de validation	111
7.3. DEFINITION DES CRITERES DE VALIDATION	111
7.3.1. Spécificité-Sélectivité	111
7.3.2. Sensibilité	111
7.3.3. Fonction de réponse: Courbe de calibration	112
7.3.4. Limite de détection	112
7.3.5. Récupération ou rendement d'extraction	112
7.3.6. Fidélité	112
7.3.6.1. Répétabilité	113

7.3.6.2. Fidélité intermédiaire	113
7.3.6.3. Reproductibilité	113
7.3.6.4. Justesse (Biais)	113
7.3.6.5. Exactitude	113
7.3.6.6. Limite de quantification	114
7.3.6.7. Intervalle de dosage	114
B- STRATEGIE UTILISEE	114
7.4. PHASE DE PREVALIDATION.	114
7.4.1. La sélectivité	114
7.4.2. Etablissement de la fonction de réponse	114
7.4.3. Limite de détection	115
7.4.4. Détermination de la limite de Quantification (LOQ).....	115
7.4.5. Mise au point de la technique de dosage.....	115
7.4.5.1. Essais préliminaires	115
7.5. CONCLUSION.....	120
VIII - DISCUSSION GENERALE	121
8.1. IDENTIFICATION DES PLANTES.....	122
8.1.1. Limites de notre étude	122
8.1.2. Forces de l'étude.....	123
8.1.3. Recommandations et perspectives	124
8.2. ETUDE DE L'ACTIVITE <i>IN VITRO</i> DES EXTRAITS SUR <i>M. ULCERANS</i>	124
8.2.1. Commentaires.....	126
8.3. PLACE RELATIVE DES PLANTES (PHYTOTHERAPIE) DANS LE TRAITEMENT DE L'UB.....	127
8.4. IDENTIFICATION, ISOLEMENT DE PRINCIPES ACTIFS ET EVALUATION DE LEUR EFFET SUR <i>M. ULCERANS</i>	129
IX - CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	132
9.1. CONCLUSIONS GENERALES	133
9.2. PERSPECTIVES	134
X - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	135
ANNEXES	150