

UNIVERSITE DE KISANGANI

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION DES PRINCIPES
ACTIFS DE *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H. Dur : PLANTE
UTILISEE PAR LES PYGMEES (Mbuté) POUR COMBATTRE LE
PALUDISME A MAMBASA EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE
DU CONGO

Par

Matthieu BOKOTA TWANGAKA
Chef de Travaux

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du grade de
Diplômé d'Etudes Supérieures en Sciences
Chimiques.

Orientation : Chimie des Substances naturelles

Directeur : Pr Dr Victor MBUYI
MUSANGU

Co-directeur : Pr Dr Leopold NDJELE
MIANDA

ANNEE ACADEMIQUE 2006-2007

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : Chromatogramme des alcaloïdes totaux de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) <i>Th. & H. Dur</i>	57
Figure 2 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine.....	62
Figure 3 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alcaloïde A ₁	63
Figure 4 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alcaloïde A ₂	63
Figure 5 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alcaloïde A ₃	64
Figure 6 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alcaloïde A ₄	64
Figure 7 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A ₁	65
Figure 8 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A ₂	66
Figure 9 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A ₃	66
Figure 10 : Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A ₃	67

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Taux d'humidité, lipides, cendres et protéines bruts des grains de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th. & H.Dur.....	51
Tableau 2 : Screening chimique des grains de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th. & H.Dur.p.....	52
Tableau 3 : Minéraux dosés dans les cendres et substances toxiques dans la poudre brute des grains de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th. & H.Dur	54
Tableau 4 : Taux d'alcaloïdes, des saponines, des sapogénines et des tanins des grains de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th. & H.Dur.....	55
Tableau 5 : Valeurs de Rf des spots des alcaloïdes de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th.& H.Dur sur couche mince	56
Tableau 6 : Caractéristiques macrophysiques des alcaloïdes des grains de <i>Picralima nitida</i> (Stapf) Th. & H.Dur. isolés par chromatographie sur colonne	58

*A mon défunt oncle Professeur Ordinaire Jean-Marie Loko
Lyande Bossenghi,*

*A mes parents Bernard Tabu Ngandi et Berthe Komba
Twangaka Owaitunge,*

*A ma très chère épouse Marie-Louise Mbembe Lobela ainsi qu'à
ma très chère fille Benita Bokota Komba,*

A tous mes Frères et Sœurs

Je dédie ce travail.

REMERCIEMENTS

Au terme de nos Etudes Supérieures en Sciences, nous voulons, à travers ces quelques lignes, nous acquitter d'un agréable devoir, celui de dire grand merci à tous ceux qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à la réalisation de la présente œuvre.

A tout Seigneur tout honneur, nous rendons tout d'abord grâce à notre Créateur pour nous avoir créé et de nous avoir accordé santé, force et intelligence pour entreprendre ce travail.

En suite, nous rendons hommage au Professeur Dr Victor Mbuyi Musangu, Directeur du présent mémoire de DES, pour avoir accepté de le diriger.

Aussi, notre profonde reconnaissance s'adresse au Professeur Dr Léopold Ndjele Mianda B. pour avoir accepté la co-direction de ce travail malgré ses multiples occupations.

Nous ne pouvons passer sous silence l'appui moral, technique et scientifique nous apportés par l'équipe de LACOREN dirigée par le Professeur Taba Kalulu, secondé par le Chef de Travaux Jean Kayembe, qui n'a pas hésité un seul instant à nous accueillir dans son laboratoire et ce de façon désintéressée. Qu'elle trouve ici l'expression de notre très grande reconnaissance.

Nous disons aussi particulièrement merci au Professeur Noël Obotola et à son épouse Saraza pour leur encourage,ent.

Que les professeurs Monama Ondongo, Makambo Lisika, Fortunat Kabangu et Pius Mpiana , ainsi que le Chef de Travaux Damien Tshibangu de l'UNIKIN trouvent ici aussi toute notre gratitude pour leur accueil et toutes les facilités nous offerts en rapport avec notre travail.

Le réconfort moral et les encouragements notamment de ma chère épouse Marie Louise Mbembe et ma fille Benita ainsi que ceux de mes

collègues ou aînés CT Tchatchambe, CT Bamawa, CT Bandombele Sukela, CT Lomba, CT. Etutu, et CT. Angongolo nous ont permis de tenir bon jusqu'à la réalisation de ce travail, nous leur témoignons toute notre reconnaissance.

Nous adressons également nos remerciements aux laborantins Mafwakadi de l'IFA /YANGAMBI et Babiomba du Laboratoire de Chimie Générale de la Faculté des Sciences UNIKIS pour leur assistance.

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier de la Coopération Technique Belge (CTB). Nous l'avons entrepris aux laboratoires de la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani (UNIKIS) , LACOREN(Laboratoire de Chimie Organique et Energétique) de l'Université de Kinshasa et de l'Institut Facultaire Agronomique de Yangambi (IFA / YANGAMBI). Que la Coopération Technique Belge et les responsables de ces trois Institutions Universitaires trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

Que toutes les autres personnes que nous n'avons pas expressément citées les noms mais qui se reconnaîtrons dans la réalisation de ce travail trouvent également ici l'expression de nos remerciements.

Matthieu Bokota Twangaka
Chef de Travaux

RESUME

Nous présentons dans ce travail une contribution sur l'étude chimique de la caractérisation des principes actifs de *Picralima nitida* (Stapf) Th.& H.Dur ainsi que le mode d'action du principe actif responsable de l'activité antipaludéenne.

Le screening chimique basé sur des propriétés chimiques propres aux différents principes actifs ainsi que quelques tests qualitatifs ont permis de déceler les différents principes actifs ci-après : les alcaloïdes, tanins et saponines en quantités considérables tandis que les flavonoïdes et leucoanthocyanes en faibles quantités. Les quinones, stérols et terpènes sont quasiment absents. L'extraction des principes chimiques majeurs: alcaloïdes, tanins et saponines a donné respectivement les rendements ci-après : 2,567%, 7,374%, et 10,550%. Les saponines ont donné 20,301% de sapogénines

Le fractionnement, la purification et la quantification des alcaloïdes sont faits par la chromatographie sur couche mince ainsi que la chromatographie sur colonne. La chromatographie sur couche mince a permis d'obtenir 4 spots représentant 4 alcaloïdes différents A₁, A₂, A₃ et A₄ avec les R_f 0,38 ; 0,55 ; 0,70 et 0,87. Tandis que celle sur colonne nous a donné 4 éluats A₁, A₂, A₃ et A₄ avec les pourcentages respectifs suivants : 12,388%, 22,772%, 11,072% et 32,264%.

Les mesures statiques sont faites par la spectrométrie UV-Visibles et celles-ci nous ont permis de prouver l'interaction entre l'hémimine et les alcaloïdes A₁, A₂ et A₃ qui est certainement à la base de l'activité antipaludique de ce principe actif.

Des substances toxiques à savoir: les nitrites, nitrates, cyanures et oxalates seules les nitrates sont décelées à l'état de traces.

Les lipides totaux bruts ont été extraits et dosés, ils ont donné un taux de 7,693%. Les protéines brutes quant à elles ont été dosées et ont présenté un taux de 11,88% dans nos grains.

Quelques oligoéléments et macroéléments se trouvant dans notre échantillon ont été aussi dosés : Le fer, calcium, magnésium et le phosphore qui ont montré respectivement les pourcentages de 0,0117%, 0,000 %, 0,150 % et 0,100 %.

SUMMARY

We present in this work a contribution on the chemical study of the characterization of the active ingredients of *Picralima nitida* (Stapf) Th.& H.Dur as well as the mode of action of the active ingredient responsible for the antimalaria activity.

The chemical screening based on chemical properties specific to the various active ingredients as some qualitative tests made it possible to detect the various active ingredients hereafter: alkaloids, tannins and saponins in considerable quantities while flavonoïdes and leucoanthocyanes in small quantities. Quinones, sterols and terpenes miss almost. The extraction of the major chemical principles: alkaloids, tannins and saponins have given the outputs respectively hereafter: 2,567%, 7,374%, and 10,550%. Saponins have given sapogenin 20,301%

Fractionation, the purification and the quantification of alkaloids are made by thin layer chromatography as well as the chromatography on column. Thin layer chromatography has made it possible to obtain 4 spots representing 4 different alkaloids A1, A2, A3 and A4 with the RF 0,38; 0,55; 0,70 and 0,87. While that on column has given us four éluats A1, A2, A3 and A4 with the following respective percentages: 12,388%, 22,772%, 11,072% and 32,264%.

Static measurements are made by spectrometry UV-Visible and these enabled us to prove the interaction between hemin and the alkaloids A1, A2 and A3 which is certainly at the base of the antipaludic activity of this active ingredient.

The following toxic substances: the nitrites, nitrates, cyanides and oxalates only the nitrates are detected with the state traces.

The rough total lipids were extracted and proportioned; they have given a rate of 7,693%. The rough proteins as for them were proportioned and showed a rate of 11,88% in our grains.

Some oligoelements and macroelements being in our sample were also proportioned: The iron, calcium, magnesium and the phosphorus which have showed respectively the percentages of 0,0117%, 0,000%, 0,150% and 0,100%.

0.0. INTRODUCTION

0.1. Problématique

Personne n'ignore aujourd'hui la richesse et la diversité des plantes médicinales utilisées par plusieurs millions de personnes de notre planète qui ne se soignent que par les médecines traditionnelles de leur pays, car ils n'ont pas accès à la médecine moderne.

Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, la plupart d'entre elles n'ont pas attiré l'attention des chercheurs et leurs potentialités thérapeutiques restent à découvrir. C'est en fait la fréquente pertinence des indications thérapeutiques de remèdes traditionnels qui a frappé les scientifiques de tous les horizons, ceux-ci se demandaient de quelle manière les tradipraticiens avaient pu réussir à sélectionner des plantes aussi actives parmi le foisonnement important des espèces végétales qui les entouraient. (Fleurentin et Pelt, 1990)

Un autre phénomène curieux est celui des convergences d'usage chez des populations qui à priori n'ont eu aucun échange culturel. C'est le cas du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*) dont les feuilles (raquettes) coupées longitudinalement sont appliquées en cataplasme au Yémen pour soigner les blessures. Le manuscrit aztèque de Manuel de la Cruz décrit l'*Opuntia* avec des indications similaires. L'effet purgatif, drastique et toxique pour les enfants des graines de *Jatropha curcas* est connu de la même manière par les tradipraticiens du Yémen et de la Forêt Guyanaise. (Fleurentin et Pelt, 1990)

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Cette découverte de nouveaux médicaments

s'est effectuée en recherchant les principes actifs de plantes médicinales qui, pour la plupart d'entre elles, étaient des plantes toxiques. C'est le cas de la digitale qui nous a fourni les cardiotoniques ou du pavot, somnifère, qui nous a donné la codéine ou la morphine.

Pour Fleurentin et Pelt (1990), aujourd'hui, ce sont aussi des plantes toxiques, utilisées jadis comme poison de flèche, comme l'if, qui nous donnent de nouveaux anticancéreux. Or, la plupart de ces plantes étaient au départ des plantes toxiques et c'est justement la toxicité qui a, dans certains cas, guidé les pharmacologues et les chimistes facilement à identifier des molécules actives.

Les plantes médicinales sont abondamment utilisées dans la Province Orientale et dans notre Pays, la République Démocratique du Congo, en général pour soulager ou guérir beaucoup de maladies actuellement, mais pour la plupart de celles-ci, elles n'ont fait que l'objet d'une enquête ethnobotanique ou, dans le meilleur des cas, d'une analyse chimique et des tests in vitro pour déterminer l'activité des principes actifs isolés. Cette situation ne permet pas une avancée significative dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules pour combattre les maladies.

C'est en quelque la manière dont la partie est utilisée dans la tradition qui guide le chercheur : Il réalisera une infusion, une macération ou une décoction puis obtiendra un extrait sec en éliminant le solvant, eau ou alcool par lyophilisation. Cet extrait sera administré à l'animal ou sur culture cellulaire pour rechercher une activité thérapeutique.

Cependant l'étude pharmacologique quantifie les effets en fonction des doses utilisées et compare ces résultats à ceux de produits de référence. On établira aussi l'absence de toxicité de la plante étudiée. Les travaux de chimie interviendront lorsqu'il s'agira de tenter d'identifier les

substances responsables de l'activité pharmacologique. C'est une démarche qui vise à découvrir de nouvelles molécules et surtout de nouveaux médicaments. (Wilcox, Bodeker, Rasoanaivo., 2004).

Pour ces mêmes auteurs, deux antipaludéens majeurs (quinine, artémisinine et dérivés) prescrits à l'heure actuelle sont issus des plantes médicinales, traditionnellement employées dans leurs pays d'origine contre la fièvre et le paludisme; il s'agit de l'écorce d'un arbre originaire des flancs de la cordillère andine (*Cinchona callisaya* et autres espèces de *Cinchona*) et d'une herbacée originaire de Chine (*Artemisia annua*).

La recherche de nouvelles molécules antipaludiques se fait donc encore en partie au sein de la biodiversité végétale en se servant de l'ethnopharmacologie comme outil de travail. Cette approche permet de sélectionner les espèces les plus intéressantes pour leur activité antiplasmodiale potentielle. De plus, étant donné que le paludisme est un fléau qui touche les pays du tiers monde, dans lesquels la population a des difficultés d'accès aux soins de santé, l'étude des Remèdes Traditionnels Antipaludiques (RTA) employés par la population est primordiale. (Dos Santos, et Fleurentin, 1991)

En effet, une validation d'usage traditionnel peut déboucher sur une recommandation d'usage pour un traitement alternatif ou complémentaire. La lutte contre le paludisme se complique du fait que l'on enregistre une résistance accrue des vecteurs et des parasites envers les molécules actuellement utilisées. Depuis longtemps, dans le cadre du traitement du paludisme et de la recherche de nouvelles molécules antipaludiques, les chercheurs se tournent vers les remèdes traditionnels utilisés par les populations qui vivent en zone d'endémie (Vigneron, 2004).

Aussi le paludisme est, selon la dernière campagne de Médecins Sans Frontières, « une arme de destruction massive ». Les chiffres sont en

effet effrayants : on compterait entre 700 à 800 millions d'êtres humains impaludés, 300 à 400 millions de cas cliniques chaque année et 2 à 3 millions de décès annuels, dont la majorité se trouvent en Afrique subsaharienne. (Fleurentin et Younos 1991)

Les traitements préventifs sont tous des mélanges à base d'espèces du règne végétal et animal. Il existe des associations significatives d'espèces et elles dépendent du groupe ethnique. Les plantes préventives et les mélanges qui en résultent sont appelés des «amers». Ces plantes ont toutes pour caractéristique d'être amères, voire très amères ; ce qui leur donne aussi, on suppose, des vertus digestives, stomachiques, cholagogues, cholérétiques, bonnes pour le foie, apéritives, vermifuges. L'idée qui sous-tend l'utilisation de telles plantes est que leur amertume va rendre le sang amer, imprégner tout le corps, qui pourra ainsi mieux lutter contre la maladie. (Grenand et al, 1987).

L'évaluation pharmacologique de ces remèdes traditionnels devrait donc aboutir à des recommandations d'usage. D'ores et déjà, certaines plantes sont bien connues pour leur activité antipaludique réelle. (Fleurentin.1993)

0.2. Objectifs de la recherche

La présente étude poursuit les objectifs suivants :

- Déterminer la composition phytochimique des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur,
- Extraire, isoler et purifier les principes phytochimiques supposés actifs en vue d'apprécier leur action antipaludique;
- Rechercher l'existence des substances toxiques dans les grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur
- Faire une analyse qualitative de l'interaction entre le principe

actif majeur et la protohémine.

0.3. Hypothèses de recherche

Partant des résultats de la recherche menée par Magilu et al, (1996) qui a abouti au fait que la consommation des grains du fruit de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur, un grain trois fois par jour et ce pendant trois jours, par une personne atteinte du paludisme et d'accès de fièvre soulage complètement la personne malade chez le peuple pygmée, nous estimons que :

- Les grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur renferment des principes actifs dont les alcaloïdes, les quinones, et les terpènes etc....
- De ce fait, ces principes actifs possèdent le pouvoir d'inhiber le développement ou de détruire les parasites responsables du paludisme.
- Enfin, ces grains ne contiennent pas des substances toxiques.

0.4. Méthodologie de la recherche

En vue de vérifier l'atteinte de nos objectifs de la recherche, nous avons procédé de la manière suivante :

- La récolte du matériel a été faite à Mambassa par les pygmées. Ce matériel a été confirmé à Kisangani par des spécialistes à l'Herbarium de la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani ;
- Quant à sa préparation, notons que les fruits ont été coupés et les grains obtenus séchés à l'ombre et à la température ambiante (22 à 31 °C) au sein du Laboratoire de Chimie Générale de la Faculté des Sciences. Un séchage spontané bien surveillé pour contrecarrer la fermentation du matériel en évitant la superposition des grains étalés

sur la paille ;

- Enfin, sa mise en poudre a été réalisée de deux façons :
 - 1° à l'aide d'un moulin électrique de marque MF 10 Basic IKA°WERKE de fabrication allemande au laboratoire de Pédologie des Sciences de la Terre à l'Université de Kinshasa ;
 - 2° Au moyen d'un mortier et d'un pilon en bois. La poudre délipidée au soxhlet avec l'éther de pétrole et séchée a été gardée au dessiccateur pour les analyses chimiques et recherches ultérieures dont les différents modes opératoires sont mieux détaillés dans le deuxième chapitre.

0.5. Délimitation et intérêt du travail

Les informations provenant des enquêtes ethnobotaniques, les résultats obtenus par Magilu et al. (1996) sur les vertus curatives de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur ; le caractère, la situation du paludisme dans notre pays ainsi que dans le monde ont été les principales motivations qui ont suscité notre choix à entreprendre cette étude.

La plus grande part des travaux effectués en République Démocratique du Congo et cités au point I.4. ont concerné pour la plupart des cas les enquêtes ethnobotaniques : Inventaire des plantes médicinales, systématique ; et dans une moindre part les enquêtes ethnopharmacognosiques et les analyses chimiques poussées dans le but de déterminer par exemple les structures des principes actifs ou l'élaboration des médicaments.

Quant à Aubry (2007, p.1), le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme sont considérés comme des principaux problèmes de santé publique menaçant le développement des pays les plus pauvres.

En effet, le paludisme touche une centaine de pays dans le monde, particulièrement les zones tropicales défavorisées d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. L'Afrique est, de loin, le continent le plus touché avec 90% des cas de paludisme recensés dans ses zones tropicales. Des épidémies peuvent survenir lors de mouvements de populations peu exposées au paludisme vers des zones hautement endémiques.

Pour ce même auteur, il tue un enfant toutes les 30 secondes en Afrique et entre 1 et 3 millions de personnes par an, selon les estimations de l'OMS. Deux milliards d'individus, soit 40% de la population mondiale, sont exposés et on estime à 550 millions le nombre de cas cliniques survenant chaque année. Les moyens de lutte existants sont les médicaments antipaludéens (dont les plus connus sont la chloroquine et la quinine) et la lutte contre les moustiques vecteurs du parasite *Plasmodium*. Mais la situation est d'autant plus préoccupante que depuis plusieurs années, les parasites développent de plus en plus de résistances aux médicaments, et que les moustiques développent des résistances aux insecticides.

Notre pays constitue la deuxième plus grande réserve forestière au monde contenant une flore abondante et très diversifiée qui est en même temps mal utilisée et surexploitée pour ce qui est de l'exploitation forestière anarchique, tandis qu'elle est sous utilisée si nous jetons notre regard sur les plantes médicinales insondables qu'elle contient. Ces abus et lacunes sont inhérents tant au manque d'intérêt qu'à la connaissance superficielle de différentes espèces présentes tant sur le plan de l'ethnobotanique que de l'ethnopharmacognosie et de la caractérisation chimique des drogues issus des plantes et utilisés par les populations. C'est pour tenter d'apporter tant soit peu une contribution dans ce vaste domaine de recherche que nous avons initié ce travail.

Toutefois, ce travail se limitera à élucider la constitution phytochimique du matériel à l'étude et il abordera aussi l'extraction et

purification des substances phytochimiques majeures isolés, la détermination de l'activité antipaludique de quelques extraits.

0.6. Division du travail

Hormis l'introduction et la conclusion, notre travail se subdivise en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré aux considérations générales où nous avons défini quelques termes importants à la compréhension du texte, puis nous avons présenté certaines informations relatives aux études bibliographiques des principes actifs ayant un effet sur le plasmodium, à la prévention et traitement du paludisme et les résumés des études antérieures. Une brève présentation de l'environnement des peuples pygmées met fin à ce chapitre.

Le deuxième chapitre est réservé à la méthodologie de la recherche. Nous y développons les approches et les techniques utilisées tant pour la récolte de l'échantillon que pour son traitement.

Le chapitre troisième est consacré à la présentation et la discussion des résultats sur la composition phytochimique de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur, sur l'isolement, la purification et le dosage des principes actifs majeurs et enfin, sur l'interaction de la protohémine avec les alcaloïdes fractionnés.

CHAPITRE PREMIER : CONSIDERATIONS GENERALES

Dans ce chapitre, nous présentons les définitions de termes clés de l'étude ainsi que quelques considérations théoriques.

I.1. Définition des concepts

I.1.1. Les alcaloïdes

Par les alcaloïdes, on sous-entend des composés organiques généralement hétérocycliques d'origine naturelle, le plus souvent végétale, azotés, plus ou moins basiques et doués, à faible concentration, des propriétés physiologiques très puissantes. A forte dose les alcaloïdes sont des poisons très violents.

Souvent les alcaloïdes sont localisés dans les tissus périphériques : téguments de la graine, assise externe des écorces, des tiges et des racines ; épiderme et couche sous-épidermique des feuilles. (Delaude 1969, Babadi 1986, Makambo, 2005).

Du point de vue caractéristiques physico-chimiques, les alcaloïdes sont des composés à fonctions basiques. Ils sont soit ternaires (constitués de C, N et H) ou quaternaires (composés de C, N, H et O) (Babadi 1986).

En outre, les alcaloïdes sans oxygène sont des liquides huileux volatils.

Aussi, les alcaloïdes avec oxygène sont en général des solides cristallisés parfois colorés et doués de pouvoir rotatoire.

Les alcaloïdes ont en commun un certain nombre des propriétés

fondamentales :

- Leur comportement vis-à-vis des solvants en fonction du pH ;
- Leur aptitude à donner des réactions générales de précipitation ou de coloration avec quelques réactifs spécifiques ;
- Ils se combinent avec les acides et forment des sels solubles dans l'eau et capables de cristalliser ;
- Leur solubilité dans les différents solvants varie selon leur état (base ou sel)
- Ils sont thermolabiles, une température supérieure à 55°C entraîne leur décomposition.

I.1.2. Les quassinoides

Quant à Makambo (2005), les quassinoides sont des lactones fortement oxygénées à squelette basique nommé pucrasane. Cependant, les quassinoides à C18, C19 et C25 sont aussi connus. Ils possèdent un nombre différent des groupes oxygénés, hormis les carbones C5, C9 et les groupes méthyliques en C4 et C10. Ces fonctions oxygénées ont été identifiées sur les autres carbones. Un large spectre des propriétés biologiques a été rapporté sur cette classe des composés, dont l'activité antipaludique considérable.

I.1.3. Les quinones

Chimiquement, les quinones sont des composés à structure dicetocyclohexane-2,5 diénoïde ou 1,2 dicetocyclohexane-3,5 diénoïde, la structure de la plupart des quinones naturelles est basée sur le noyau ou système benzoquinone, naphtoquinone ou anthraquinone. Babadi (1986)

Les naphtoquinones agissent plutôt comme schizonticides, mais sont aussi hautement actives contre le *P. falciparum* in vitro.

I.1.4. Les flavonoïdes

Les principes actifs de certains composés de cette classe présentant une certaine activité contre le *P. falciparum* ont été isolés : exiguaflavone A et exiguaflavone B de *Artemisia annua* ; cowanin, cowanol et cowaxanthone de *Graciana cowa* ; etc... (Babadi, 1986)

I.1.5. Les triterpènes et les sesquiterpènes

Les terpènes sont des composés souvent non saturés, renfermant du carbone et de l'hydrogène ou du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Ils sont en outre odoriférants et obtenus généralement par entraînement à la vapeur. (Makambo, 2005).

Quelques triterpénoïdes et sesquiterpènes isolés de différentes plantes médicinales dénotent une activité antipaludéenne considérable. (Wongsrichanalai , 1999)

L'étude des sesquiterpènes s'est approfondie avec la découverte de l'artémisinine (qinghaosu) un endoperoxyde isolé de *Artémisia annua* et utilisé en Chine contre le paludisme. (Wongsrichanalai ,1999)

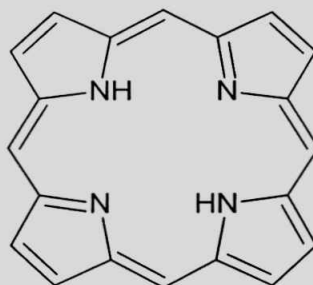
I.1.6. Les porphyrines

Les porphyrines sont des molécules à structures cycliques impliquées dans le transport de l'oxygène et pouvant jouer le rôle de cofacteur lié (groupement prosthétique) de certaines enzymes.

Elles entrent dans la composition de l'hémoglobine et ont donc une place importante dans le métabolisme respiratoire.

Les propriétés physiques de ces structures en font également des fluorophores de choix pour marquer des réactifs biologiques (anticorps, nucléotides...).

Cette dernière est formée de 4 noyaux pyrroles liés les uns aux autres par des ponts méthényles. L'hypercycle est stabilisé par des doubles liaisons conjuguées.

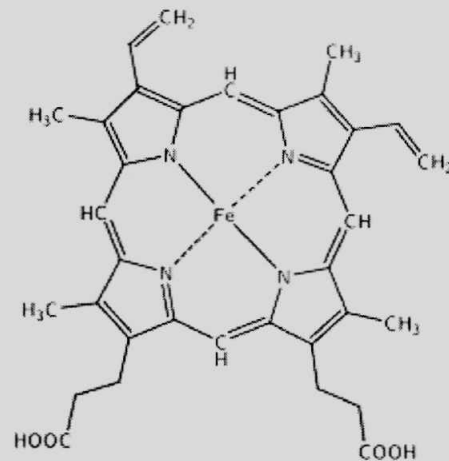


La porphyrine peut porter des substituants sur les 8 atomes de carbone β et β' des noyaux pyrroles. La nature de ces substituants est très variable donnant ainsi lieu à une grande diversité de porphyrines ayant différentes propriétés et une nomenclature complexe. Les porphyrines peuvent accepter deux protons pour former un diacide ou en céder deux pour devenir un anion deux fois chargé.

Dans cette dernière forme, elles peuvent former un complexe avec un métal généralement à l'étage d'oxydation +2. On obtient ainsi des métalloporphyrines. Ces derniers sont des pigments biologiques exerçant souvent des fonctions vitales pour les êtres vivants (chlorophylles et hème).

L'hème est le groupement prosthétique de l'hémoglobine et de la myoglobine. C'est une métalloporphyrine contenant le fer à l'étage d'oxydation +2 au sein du cycle de la protoporphyrine. C'est le pigment qui donne la coloration rouge au sang. Lors de la dégradation de l'hémoglobine, l'hème peut se séparer de la globine. Le Fe^{2+} de cette porphyrine est immédiatement oxydé en Fe^{3+} . On obtient alors la ferriprotoporphyrine IX.

La ferriprotoporphyrine IX ou le 1,3, 5, 8 tétraméthyl-6,7 dipropanecarboxyl -2,4 divinyl porphyrinato fer (III) est donc une métalloporphyrine qui renferme le fer ferrique et est communément appelé hémine ou hématine ou encore protohémine.



La ferriprotoporphyrine IX quant à elle est une hémine sans ion Fe^{3+} . Dans la deuterohémine, les deux groupements vinyles en positions 2 et 4 sont remplacés par l'hydrogène. (Mpiana, 2003)

I.1.7. Le paludisme

Pour des auteurs comme Malvy. & al, (2000) et Verdrager, (2005), le paludisme est un des rares fléaux de Santé Publique qui ait traversé les siècles sans jamais perdre de son activité. En 1999, l'initiative associant OMS, UNICEF, PNUD et Banque Mondiale pour faire reculer le paludisme «*Roll back malaria*» : la prévention de la morbidité et de la mortalité sont les nouveaux objectifs de stratégies de lutte. (Web 2, 3 et 5)

Selon Debacker (2000), le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle transmise par des moustiques. On pensait à l'origine que cette maladie provenait des zones marécageuses, d'où le nom de paludisme dérivé du mot ancien 'palud', marais. En 1880, les scientifiques ont découvert la véritable cause du paludisme, un parasite unicellulaire

appelé plasmodium. Ils ont ensuite découvert que le parasite était transmis d'une personne à une autre par les piqûres d'un moustique *Anophèle* femelle, qui a besoin de sang humain pour nourrir ses oeufs.

Quatre espèces de parasites du genre *Plasmodium* sont responsables de la maladie chez l'homme (Oleko, 1997):

1. *Plasmodium falciparum* à l'origine de la fièvre tierce maligne (espèce prédominante et responsable de 90% de la mortalité due au paludisme) ;
2. *Plasmodium vivax* à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes à long terme ;
3. *Plasmodium ovale* à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes à long terme 4 à 5 ans après la primo infection;
4. *Plasmodium malariae* à l'origine des fièvres quarte. Elle n'est pas meurtrière mais peut entraîner des rechutes jusqu'à 20 ans après la primo infection.

a) Mode de transmission du paludisme

Certains chercheurs tels que Imbert, Gendrel (2002) et Aubry (2005) considèrent que le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle, du genre *Anophèle*, lui-même infecté après avoir piqué un homme impaludé. La femelle, en prenant le repas de sang nécessaire à sa ponte, injecte le parasite à son hôte. Par contre les mâles ne piquent pas.

La transmission de *Plasmodium* d'une personne à une autre se fait donc par l'intermédiaire du moustique, le principal en cause étant *Anophèle gambiae*. Il existe un seul cas de contamination inter-humaine directe, lorsqu'une femme enceinte infectée contamine son enfant par voie transplacentaire. (Web 4 et 8)

b) Cycle du parasite

Le cycle de *Plasmodium* est complexe et comporte deux étapes essentielles : un cycle asexué chez l'homme, et un cycle sexué chez le moustique. L'anophèle injecte à l'homme le parasite sous forme de "sporozoïte". Celui-ci migre rapidement, *via* la circulation sanguine, vers le foie. Il pénètre dans la cellule hépatique, où il se divise très activement pour donner naissance, en quelques jours, à des dizaines de milliers de nouveaux parasites : les "mérozoïtes".

La cellule du foie éclate en libérant ces parasites dans le sang : là, ils pénètrent à l'intérieur des globules rouges et se multiplient. Lorsque ces derniers éclatent à leur tour, les mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine infectent de nouveaux globules rouges. A chaque cycle de réplication des mérozoïtes, des parasites sexués mâles et femelles (gamétocytes) sont formés à l'intérieur des globules rouges.

Lorsqu'un moustique pique une personne infectée, il ingère ces gamétocytes, qui se transforment en gamètes. Leur fécondation engendre un zygote, qui se différencie en oocyste dans le tube digestif du moustique. Les oocystes produisent des sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Un nouveau cycle peut alors commencer. (Web 9)

Les rechutes tardives de paludisme observées lors d'infections par *P. vivax* et *P. ovale* sont dues à la possibilité pour ces espèces de subsister sous une forme latente ("hypnozoïte") dans la cellule hépatique de l'homme. (Aubry, 2005) (Web 7) (Oleko, 1997)

c) Symptômes

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses. Le paludisme débute par une fièvre 8 à 30 jours après l'infection, qui peut

s'accompagner - ou non - de maux de tête, de douleurs musculaires, d'un affaiblissement, de vomissements, de diarrhées, de toux. (Roger, 2004)

Des cycles typiques alternant fièvre, tremblements avec sueurs froides et transpiration intense, peuvent alors survenir : c'est " l'accès palustre".

Cependant, la périodicité de ces cycles dépend de l'espèce de parasite en cause, et coïncide avec la multiplication des parasites et l'éclatement des globules rouges, qui conduit également à l'anémie. Le paludisme à *P. falciparum* peut être fatal s'il n'est pas traité. Dans certains cas, les globules rouges infectés peuvent bloquer les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau : c'est le neuropaludisme, souvent mortel.

Dans les régions où le paludisme est hautement endémique, les personnes sont tellement souvent infectées qu'elles finissent par être naturellement immunisées (" immunité acquise "), généralement après de nombreuses années d'infection chronique, et sont alors des porteurs plus ou moins asymptomatiques du parasite (Verdrager, 2005) (Le Bras et Malvy, 2004).

d) Prévention et traitements

Plusieurs molécules anti-paludiques peuvent être utilisés en prophylaxie (prévention en zone endémique) ou en thérapeutique. Les plus connues sont la chloroquine ou la quinine. D'autres, comme la méfloquine, sont utilisées dans les régions où vivent des parasites résistants à la chloroquine. Il est dangereux de partir en zone de transmission intense de paludisme sans prise régulière d'un traitement préventif, en particulier pour les enfants et les femmes enceintes qui ont un risque accru d'accès grave. (Brasseur, 2004)

Le traitement préventif doit être prescrit par un médecin. Il tient compte des zones visitées (risque, existence ou non de résistance), de la durée du voyage et aussi de la personne : l'âge, les antécédents

pathologiques, une intolérance aux antipaludéens, une possible interaction médicamenteuse, une grossesse. Mais les médicaments anti-paludéens ne garantissent pas une protection absolue contre l'infection et il est aussi important de se protéger des piqûres de moustiques (moustiquaires, produits anti-moustiques). (Fargier, 1999)

Aucun moyen préventif n'assure à lui seul une protection totale et, même si un traitement adapté a été bien pris, il est possible de faire une crise de paludisme, parfois d'apparition tardive. Les premiers symptômes sont souvent peu alarmants mais le paludisme peut être mortel si son traitement est retardé. Aussi, en cas de fièvre même légère, de nausées, de maux de tête, de courbatures ou de fatigue au cours du séjour ou dans les mois qui suivent le retour, un médecin doit être consulté en urgence. La prise d'un échantillon de sang est nécessaire pour confirmer le diagnostic. (Danis, Gentilini, 1985)

D'autres médicaments sont apparus récemment à base de l'artémisinine, sesquiterpène isolé de *Artémisia annua*, et de ses dérivés (Malvy, Djossou, Receveur, 2000 et Danis, 2003).

I.2. Généralités sur les principes actifs des plantes médicinales.

A part les classes des principes actifs (métabolites secondaires) citées au point I.1., il en existe d'autres sur lesquelles il est nécessaire que nous nous y attardions à savoir : les saponines et les stérols

I.2.1. Les saponines

Les saponines ou saponosides sont des glucosides dont les aglycones, sapogénines, sont soit de structure stéroïdique, soit de structure triterpénique.

L'hydrolyse des saponines par des microorganismes, des enzymes spécifiques, des bases ou des acides minéraux, donne un produit non sucré, appelé aglycone, génine ou sapogénine (un produit de nature triterpénoïdique ou stéroïdique) et un ou plusieurs sucres.

Certaines saponines libèrent également, outre les composés cités, un ou plusieurs acides organiques : acide cinnamique, acide tiglique, acide angélique etc. (Babadi, 1986 et Makambo, 2005).

On distingue généralement deux catégories de saponines à partir de la structure de la partie sapogénine du glucoside.

a) Saponines triterpénoïdiques

Il s'agit des produits qui résultent de la réaction entre l'hydroxyle glucidique et l'hydroxyle triterpénoïdique avec libération d'une molécule d'eau.

b) Saponines stéroïdiques

Ce sont des produits de condensation entre l'hydroxyle d'un stéroïde libre et l'hydroxyle d'un sucre. Tous les stéroïdes renferment un noyau commun, le cyclopentaperhydrophénanthrène.

c) Propriétés et usages des saponines

D'une manière générale, les propriétés détergentes des génines à saponosides ont été exploitées très précocement dans tous les continents par l'homme, beaucoup ont des propriétés antimicrobiennes et antifongiques ; ils modifient la tension superficielle de l'eau ; ils sont toxiques pour les animaux à sang froid, surtout les poissons mais pour l'homme et les mammifères , sauf exception, ils n'ont qu'une toxicité assez faible par voie orale mais assez prononcée par voie parentérale; ils ont les propriétés hémolytiques . (Babadi,

1986).

I.2.2. Stérols

Pour Makambo (2005-2006), ce sont des 3-monohydroxystéroïdes qui possèdent 27, 28 ou 29 atomes de carbone. Tous ces composés naturels ont un hydroxyle 3 β , et presque tous possèdent une ou plusieurs doubles liaisons, habituellement en positions 5, 7 ou 22.

I.3. Les pygmées et leur environnement.

Notre investigation s'est déroulée dans le Territoire de Mambasa, District de l'Ituri, Province Orientale en République Démocratique du Congo.

I. 3.1. Situation géographique et administrative de Mambasa

Administrativement, le Territoire de Mambasa constitue la zone pygmoïde dans le District de l'Ituri au sein de la Province Orientale. Le chef-lieu (Mambasa) qui porte le même nom que le Territoire est situé à 530 km de Kisangani (chef-lieu) de la Province Orientale et ayant une superficie de 36.783 km².

Le Territoire de Mambasa est limité à l'Est par les Territoires d'Irumu et de Djugu ; à l'Ouest par les Territoires de Bafwasende et Wamba ; au Nord par le Territoire de Watsa et au Sud par les Territoires de Beni et Lubero.

Les populations autochtones qui y sont représentées sont les Lese, Bila, Beke, Mbo et Mbute (pygmées).

D'après la classification climatique de Koppen, le Territoire de Mambasa se retrouve en transition entre le climat de forêt dense humide sans saison sèche marquée et le climat des régions de savanes (montagne

de l'est) ; du type Af.

Mambasa est situé géographiquement entre 29° 7' longitude Est et 1° 20' latitude Nord. Son altitude est de 885m, les précipitations annuelles toujours supérieures à 1500m et la température est de l'ordre de 26,5°C.

L'humidité de l'air est élevée toute l'année. Cette humidité relative est fonction de la pluviosité et de la présence des chaînes de montagnes qui se manifestent à ses environs. La conséquence de celui-ci est de régler la transpiration des êtres vivants. L'hygrométrie atteint son maximum la nuit, précisément aux abords du jour et son minimum pendant la journée quand il fait chaud.

Les sols de Mambasa sont formés de sable, argile et limon. Leur aspect est ferrallitique et à leur moindre contact avec les rayons solaires il se produit un phénomène d'altération chimique par latérisation. Ces sols se caractérisent par la profondeur, la pauvreté et le lessivage dû aux eaux des pluies. Le sous-sol contient des matières précieuses en l'occurrence l'or et le diamant qui sont exploitées artisanalement.

La végétation est caractérisée par des forêts denses et ombrophiles, homogènes à dominance de *Gilbertiodendron dewevrei*.

Les pygmées descendent d'une très ancienne race primitive qui a laissé des traces dans de nombreuses contrées de l'ancien monde.

En République Démocratique du Congo, le groupe pygmoïde vit en îlots parmi les bantous, les soudanais ou les nilothiques dans certains Territoires du pays : Kibali Ituri, Tshuapa, Kivu, Sankuru, Tanganyika et lac Mobutu.

Ils seraient les premiers habitants du pays et vivent depuis longtemps en sécurité à la limite de la forêt équatoriale (Kama, cité par Magilu et al, 1996). Les pygmées de race pure ne se rencontrent plus dans la

forêt de l'Ituri suite au métissage avec les autres populations. Sa taille est en moyenne de 1,40 mètre, sa peau est claire, les bras et le torse assez long et les jambes courtes. (Watters cité par Magilu et al, 1996). Ils ont perdu leur langue d'origine et ont adopté celles parlées par les populations vivant à leur proximité.

Ces derniers ne se soignent presque exclusivement que par les plantes et d'autres préparations provenant des ingrédients qu'ils trouvent dans leur environnement.

I.4. Recherches antérieures

Il existe non seulement un nombre assez grand d'études ethnobotaniques sur les plantes soignant la malaria mais aussi une multitude de celles traitant de la lutte contre soit le paludisme ou l'anophèle, ou encore contre le plasmodium, parasite responsable du paludisme.

Celles-ci sont effectuées non seulement à travers le monde mais aussi en République Démocratique du Congo, cas de LACOREN (Laboratoire de Chimie Organique et Energétique) à la Faculté des Sciences de l'Université de Kinshasa et au Laboratoire des Substances Naturelles du Département de Chimie de l'Université de Kisangani, pour tenter d'une part d'avoir une idée précise sur les métabolites secondaires actifs des plantes utilisées pour se soigner : alcaloïdes, terpènes, quinones, et flavonoïdes ; et d'autre part de mieux cerner la nature du parasite, de l'agent causal et du mécanisme de transmission de la maladie, le mécanisme d'interaction des médicaments et enfin trouver les médicaments efficaces mais aussi tester divers candidats vaccins.

Nous citons quelques uns de ces travaux et donnons un petit résumé pour certains d'entre eux :

- Taba et Kayembe (2003)

Ces chercheurs ont mené une étude qui visait à comparer l'activité antiplasmodiale de terpènes isolés des feuilles d'*Ocimum gratissimum* et de *Cassia alata*. Ainsi, 11 terpènes de deux plantes (4 de *Cassia alata* et 7 de *Ocimum gratissimum*) couramment utilisées en médecine traditionnelle en République Démocratique du Congo ont été testés in vitro pour leur activité antiplasmodiale. Tous ces composés se sont révélés actifs à des concentrations diverses.

- Iroegbu et Nkere (2005)

Dans l'étude intitulée "Evaluation of the antibacterial properties of *Picralima nitida* stem bark extracts", les auteurs ont réalisé l'extraction alcoolique des écorces de *Picralima nitida*. Cet extrait a été testé contre le *Staphylocoque aureus*, le *Pseudomonas auriginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella kintambo Human*. Cet extrait a montré une importante activité antibactérienne donnant ainsi une réponse du choix des herboristes sur l'alcool comme solvant dans la plupart des préparations. Ils ont de même mis en évidence les composés phytochimiques ci-après : alcaloïdes, tanins, saponines, terpènes, flavonoïdes, protéines et glucosides

- Menzies , Paterson, Duwiejua et Corbett (2003)

En réalisant différentes études sur les graines de *Picralima nitida* (fam. *Apocynaceae*) ont montré une activité analgésique en utilisant des tissus isolés des rats.

- Duwiejua, Woode et Obiri (2002)

En menant une étude sur le pseudo-akuamigine, un alcaloïde extrait des grains de *Picralima nitida* ont montré une activité anti-inflammatoire et analgésique après des tests effectués sur les rats à qui on a induit les oedèmes et ce en le comparant avec les effets produits par la morphine et l'indométhacine.

- Fakeye et al., (2004)

Dans la recherche dénommée "Antibacterial propertiy of *Picralima nitida* stem bark extract in cream formulations", un extrait méthanolique basic des écorces de *Picralime nitida* a été utilisé dans la formulation d'une crème et testée contre quelques microbes de la peau (*Staphylococcus aureus* and *Microsporum canis*). Quelques variables ont été prises en compte (temps de conservation, concentration de la crème en extrait, nature et concentration de l'humectant). La concentration de l'extrait dans la crème influence beaucoup l'effet de la crème sur les microbes tandis que les autres variables influencent très peu.

- Fakeye, Awe, Odelola, Ola-Davies, Itiola et Obajuluwa (2004)

Ces chercheurs ont mené une étude qui visait à évaluer la profile de toxicité d'une fraction alcaloïdique des écorces de *Picralima nitida* (fam. *Apocynaceae*).

L'évaluation de la toxicité cutanée de la fraction alcaloïdique de l'écorce de tige de *Picralima nitida*, qui a été montré pour avoir l'activité prononcée contre les agents causals des dermatomyosites chez l'homme, a été effectuée chez les animaux.

Les essais intrapéritonéaux aigus de toxicité ont montré une toxicité dépendante de la dose. Il y avait inflammation et nécrose des hépatocytes de foie accompagnés de réduction de compte neutrophilique et d'une augmentation correspondante de compte lymphocytaire. Il n'y avait aucun signe de rougissement ou de l'irritation une fois appliqué dans la conjonctive d'oeil.

Les essais cutanés ont également prouvé que la fraction n'a causé aucune sensibilité, inflammation ou mort dans les modèles animaux utilisés.

- Enomfon, Akpan et Umoh (2004)

Dans leur recherche intitulée: « Inhibitory activity of seed extract from *Picralima nitida* (Staph) on B-D-glucosidase » ont constaté que les extraits d'alcaloïdes de la graine mûre de *Picralima nitida* ont inhibé l'activité de l'enzyme B-D-glucosidase. L'exploitation de ce potentiel peut avoir une valeur immense dans la recherche actuelle de nouveaux médicaments thérapeutiquement actifs avec des effets inhibiteurs effectifs contre l'enzyme β -glucosidase qui est impliqué dans l'indice d'infection de cellules par le VIH.

- Mpiana, (2003) :

Dans son étude intitulée « Contribution à l'étude thermodynamique et cinétique de la complexation de la protohème et la deuterohème avec les antipaludéens à noyau quinoléine » a fait le constat suivant : Les mesures statistiques faites par spectrophotométries UV-Visible tandis que les mesures cinétiques par relaxation chimique par saut de température avec une détection optique ont montré l'existence de complexe protohème -antipaludéen. L'activité de ce dernier et de l'antipaludéen seul a été étudiée *in vitro*.

I.5. La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible

I.5.1. Fondement de la méthode

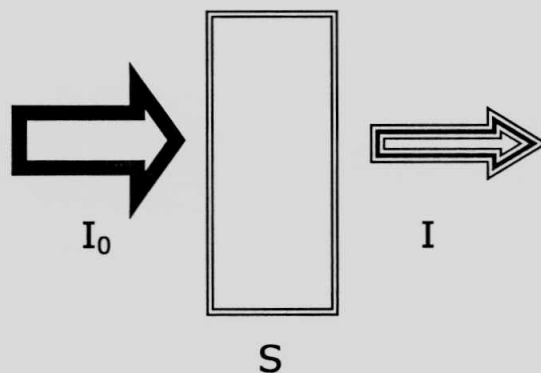
La méthode est basée sur les transitions électroniques provoquées par des photons de longueur d'onde comprise entre 10^3 et 7.10^3 angströms. Ce domaine spectral comprend les régions UV et Visible. Pour les rayonnements UV et Visibles, l'excitation implique la transition d'un électron d'une orbitale moléculaire ou atomique de basse énergie vers une orbitale d'énergie plus élevée.

Il faut noter que l'énergie $h\nu$ d'un photon doit être exactement égale à la différence d'énergie entre les deux orbitales. L'absorption dans le visible est liée à la couleur ; une des propriétés les plus étonnantes des composés chimiques.

I.5.2. Principe de la méthode

Cette méthode repose sur l'atténuation de l'intensité d'un faisceau lumineux monochromatique due à son interaction avec la matière lors de son passage au travers de ce dernier.

Soit un faisceau monochromatique d'intensité I_0 , et intercalons sur son chemin une substance S :



En mesurant l'intensité d'un faisceau transmise I à travers la substance, on remarque que son intensité baisse et ce dernier absorbe.

Pour décrire commodément les propriétés absorbantes d'une espèce, on utilise son spectre d'absorption, c'est-à-dire un graphique d'une fonction d'atténuation d'un faisceau de rayonnement en fonction de la longueur d'onde, de la fréquence ou du nombre d'onde. On emploie couramment deux termes pour mesurer l'atténuation du faisceau, la transmittance et l'absorbance.

L'absorption d'un faisceau lumineux monochromatique dans un milieu homogène et isotrope est proportionnelle à la longueur du trajet optique suivi par cette radiation et la concentration, en solution, ou la pression partielle, en phase gazeuse, des espèces absorbantes.

La loi de Beer-Lambert peut s'exprimer ainsi :

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha \ell C}.$$

Avec :

- α est comme coefficient d'extinction molaire (en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Il dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température.
- ℓ la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuve utilisée (en cm).
- C enfin la concentration molaire de la solution (en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Dans le cas d'un gaz, C peut être exprimée comme une densité (unités de longueur réciproque au cube, cm^{-3}).

Cette équation est très utile pour la chimie analytique. En effet, si ℓ et α sont connus, la concentration d'une substance peut être déduite de la quantité de lumière transmise par elle.

La transmittance T est définie comme la fraction du rayonnement

incident qui est transmise par le milieu. Elle est souvent exprimée en pourcentage :

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

L'absorbance A est le cologarithme de la transmittance :

$$A = - \log T$$

CHAPITRE DEUXIEME : METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE

Nous présentons dans ce chapitre le matériel et la stratégie de recherche qui nous ont conduit à la vérification de nos hypothèses. Il s'agit des techniques de récolte et d'analyse de la graine.

II.1. Matériel

II.1.1. Famille, Genre, Espèce, Noms synonymes et Vernaculaires (Renier, 1948 ; Magilu, Mbuyi et Ndjele, 1996 et Pauwels, 1993)

- Embranchement: *Magnoliophyta (Angiospermes)*
- Classe: *Magnoliopsida (Dicotylédones)*
- Ordre: *Gentianales*
- Famille: *Apocynacée*
- Genre : *Picralima*
- Espèce: *P. nitida*
- Noms vernaculaires: - Mendje (Lese), Ekeke (Bira) en République Démocratique du Congo
 - Akuamma plant (Nigeria)
 - Osi- Lgwe (Nigeria)
 - Ebamen Fong (Cameroun)
 - Ba'ab en Bakwere
 - Olape en Fang (Cameroun)

II.1.2. Description botanique et répartition géographique.

Certains chercheurs comme Magilu, Mbuyi, Ndjele (1996) et Akpan, Ime (2004) considèrent *Picralima nitida* comme un arbuste très

rare à feuilles luisantes 20cm/7cm, nervures 25, pétiole 2cm. La plante contient des gros fruits jumelés ressemblant à des papayes. Les graines sont plates, amères, et nageant dans mucilage. Les fleurs sont en capitule terminal. Corolle, tubes 1cm et lobes 1cm.

C'est une plante qui pousse en Afrique de l'Ouest, au Ghana et au Nigeria. On la rencontre aussi en Afrique Centrale au Cameroun, au Gabon et en République Démocratique du Congo dans la Province Orientale plus précisément à Mambasa, un Territoire situé à 530 km de la ville de Kisangani.

II.1.3. Pharmacologie

Sur le plan pharmacologique, les recherches réalisées par Magilu, Mbuyi et Ndjele, 1996 ; Iroegbu et Nkere, 2005 ; François et al., 2004 ; Nkere et Iroegbu, 2002; Menzies et al., 2003 et Fakeye et al, 2004, affirment que cette plante lutte contre les pathologies suivantes :

- a) La fièvre et la malaria ;
- b) Les vers intestinaux ;
- c) Les asthénies ;
- d) Les douleurs abdominales et articulaires ;
- e) Les indigestions gazeuses ;
- f) La diarrhée ;
- g) La hernie ;
- h) Les maladies de peau ;
- i) Parasitose (Fièvre typhoïde, amibiase).

Il faudrait remarquer que les organes utilisés à cette fin demeurent l'écorce de tronc et la graine.

II.2. Méthodes

II.2.1. Récolte et préparation des échantillons de graines pour analyse chimique

- Récolte du matériel a été faite à Mambassa par les pygmées supervisés par monsieur Augustin, étudiant de l'IBTP Kisangani en congé dans son village natal. Ce matériel a été confirmé à Kisangani non seulement par Mr Kombozi, technicien à l'Herbarium de la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani mais aussi par Mbuyi et Ndjele tous deux professeurs et directeurs du présent travail.
- Préparation : les fruits ont été coupés et les graines obtenus ont été séchés à l'ombre et à la température ambiante (22 à 31 °C) au sein du laboratoire de chimie générale de la Faculté des Sciences . Un séchage spontané bien surveillé pour contourner la fermentation du matériel en évitant la superposition des graines étalées sur la paille.
- Mise en poudre : celle-ci a été réalisée de deux façons : primo à l'aide d'un moulin électrique de marque MF 10 Basic IKA°WERKE de fabrication allemande au laboratoire de Pédologie des Sciences de la Terre à l'Université de Kinshasa et secundo, nous avons utilisé aussi le mortier et le pilon en bois. La poudre délipidée au soxhlet avec l'éther de pétrole et séchée a été gardée au dessiccateur pour les analyses et recherches ultérieures.

II.2.2. Détermination de l'humidité dans la poudre.

Nous avons séché la poudre à 105°C jusqu'à poids constant et avons calculé le taux d'humidité de notre échantillon de la manière suivante :

$$\% \text{humidité} = \frac{P' \times 100}{P}$$

Notons que $P' = P_2 - P_1$, avec :

P_1 : poids du creuset vide

P_2 : poids du creuset + échantillon

P : poids de l'échantillon humide

P' : Poids de l'échantillon anhydre

II.2.3 Détermination de la cendre brute et préparation du minéralisat

La cendre brute est obtenue à partir de l'incinération d'un échantillon dans le four électrique (four à moufle).

Mode opératoire

- Prendre environ 5 grs de poudre d'échantillon finement broyé ;
- Introduire l'échantillon dans un creuset sec et taré ;
- Chauffer le tout jusqu'à la calcination complète puis refroidir ;
- Peser le creuset et son contenu ;
- Calculer le poids de la cendre.
-

$$\% \text{Cendre brute} = \frac{P_2 - P_1}{P} \times 100$$

Légende :

P = Poids de la prise

P_1 = Poids du creuset vide

P_2 = Poids du creuset + la cendre

- Le minéralisat est obtenu en humectant la cendre ainsi obtenue avec quelques millilitres d'eau distillée puis en recueillant le filtrat. C'est ce dernier qui constitue le minéralisat.

II.2.4. Identification et dosage de quelques ions

Pour identifier et doser les quelques ions, nous avons chaque fois précisé les principes et le mode opératoire utiles pour nos investigations.

a) Les nitrites (Dessart, Jodogne et Paul, 1973)

a.1. Principe

En milieu acide le KMnO_4 est décoloré par les ions nitrites, il y a formation d'ions Mn^{2+} incolore suivant la réaction :



a.2. Mode opératoire

Mettre une solution de KMnO_4 acidifiée dans un tube à essai et ajouter progressivement la solution de l'échantillon. S'il y a décoloration de la solution de KMnO_4 , le test est donc positif et dans le cas contraire le test est négatif.

b) Les nitrates (Feigl et al 1966)

b.1. Principe

Les nitrates libérés sous forme de HNO_3 réagissent avec le diphénylamine pour donner le sel de quinoïdimmonium II.

b.2. Mode opératoire :

- Mélanger Quelques grammes de diphénylamine avec l'acide sulfurique concentré jusqu'à dissolution complète (réactif). Ajouter environ un 1 mg de soluté (échantillon) dans 1 ml du réactif.
- Placer environ 0,5 ml de la solution du réactif dans un endroit plat ou dans un tube à essai, et y ajouter l'échantillon.
- L'apparition d'une coloration bleu-violette qui se maintient pendant quelques instants à la surface de séparation de deux liquides indique la présence des nitrates. Ce test peut être aussi applicable pour les ions nitrites.

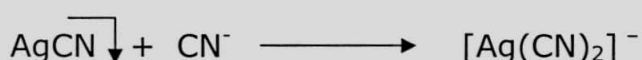
c) Les cyanures (Dessart., Jodogne et Paul. ; 1973)

c.1. Principe

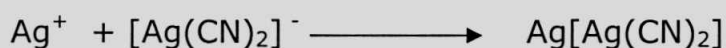
Une solution de cyanure traitée par le nitrate d'argent donne un précipité blanc à la zone de contact de deux solutions. Le précipité est soluble après agitation de la solution à cause de la formation d'un ion complexe argentocyanure dont le sel alcalin est soluble.

c.2. Mode opératoire

- Mettre une solution de l'échantillon dans un tube à essai.
- Ajouter progressivement la solution de nitrate d'argent jusqu'à son excès afin d'observer la formation d'un précipité blanc.



Lorsque la réaction de complexation est terminée, l'addition d'un excès de Ag^+ donne un précipité blanc d'argent.



Le terme du titrage est indiqué par l'apparition d'un trouble dans la solution.

Ainsi, le mode opératoire consiste à mettre une solution de l'échantillon dans un tube à essai. Ajouter progressivement la solution de nitrate d'argent jusqu'à son excès afin d'observer la formation d'un précipité blanc.

d) Ions oxalates (Feigl et al., 1966)

d.1. Mode opératoire

- Placer un peu de fragment d'échantillon dans un tube à essai.
- Ajouter la poudre de diphénylamine (quelques grammes) et bien mélanger.
- Chauffer à la flamme jusqu'à fondre la diphénylamine en présence de l'échantillon.

La présence d'oxalates est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue. Dans le cas contraire, le test est négatif.

e) Dosage du fer (Dessart, Jodogne et Paul, 1973)

e.1. Principe

Retenons que le dosage du fer se fait d'après l'équation suivante :



En fait, c'est une réaction d'oxydo-réduction dans laquelle il y a oxydation du fer selon l'équation :



et une réduction de chrome d'après l'équation :



Le terme du titrage est repéré par un indicateur interne (la diphénylamine) qui produit une coloration bleu-violette dans la solution au point équivalent.

e.2. Mode opératoire

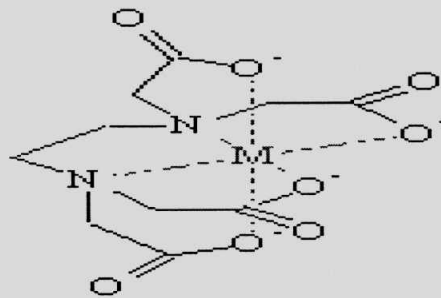
- Prélever 2 ml de l'extrait, y ajouter 2 ml d'une solution du mélange (acide sulfurique concentré/acide phosphorique concentré/eau distillée dans les proportions 1 :1 :5) ;
- La fin du titrage est indiquée par l'apparition d'une coloration bleu-violette qui persiste.
- Le taux de fer est déterminé par l'équation : $\%Fe = V K_2Cr_2O_7 \times 1,675$

$V K_2Cr_2O_7$: volume de $K_2Cr_2O_7$ consommé jusqu'au point équivalent.
1,675 : facteur de correction.

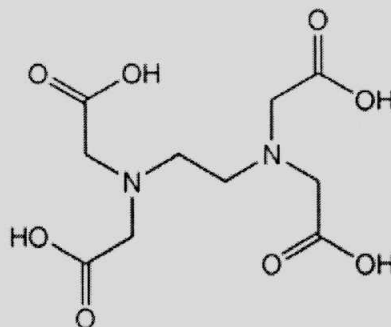
La fin du titrage est indiquée par l'apparition d'une coloration bleu-violette qui persiste.

f) Dosage du calcium (Charlot, 1966)

Le dosage de calcium se fait par méthode complexométrique à l'EDTA



Métal-EDTA



H₄EDTA

f.1. Principe

Le sel disodique de l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA) forme des complexes avec des métaux di- et trivalents, ils donnent avec les ions Ca^{2+} un complexe très stable en milieu alcalin. Le titrage se fait en présence de calcon comme indicateur ; ce dernier fait virer la solution du rouge-violet au bleu à la fin du titrage. Et comme la plupart de ces cations sont aussi complexés dans les mêmes conditions, il est nécessaire de les éliminer du milieu réactionnel.

f.2. Mode opératoire :

- Prélever exactement 1 ml du minéralisât et introduire l'aliquote dans un erlenmeyer de 25 ml puis ajouter 2 ml d'eau distillée. Ajouter successivement 1 ml de NaOH 2N, 3 gouttes de chlorhydrate de triéthanolamine.
- Ajouter lentement la solution de NaOH 2N pour ajuster le pH à 12 (environ 1ml suffit)
- Ajouter 2 gouttes de la solution de calcon (environ une pincée) et la solution prend une coloration rouge-violette ;
- Titrer lentement avec l'EDTA 0,02N jusqu'au virage en bleu.

Le calcul de calcium dans 100grs de M.S. = $V \times N \times 20$, avec :

M.S. = matière sèche

V = volume de l'EDTA utilisé pour le titrage

N = normalité de l'EDTA

20 = facteur de conversion de l'EDTA pour le fer.

g) Dosage de magnésium (Charlot, 1966)

g.1. Principe

Le magnésium peut être dosé par complexation de la somme $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$

Le principe est le même que pour le dosage de l'ion calcium mais

ici le Mg^{2+} est complexé en travaillant à pH 10 que l'on maintient en utilisant le tampon ammoniacal.

g.2. Mode opératoire :

- Pipeter 10 ml de minéralisât,
- Introduire l'aliquote dans un erlenmeyer d'un volume quelconque, puis porter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée ; ajouter successivement 2 ml de KCN 1%, 10 ml de tampon ammoniacal et vérifier le pH et l'ajuster à 10 puis ajouter une pincée de noir ériochrome T. La solution prend une coloration rouge- violette.
- Titrer lentement avec une solution d'EDTA 0,02N jusqu'à l'apparition d'une coloration bleu-franc ou bleu délavé.
- Le calcul de la teneur en magnésium est donné par l'équation :

$$\% \text{ en Mg} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times Fc \times \text{Meq}_{Mg} \times \text{Wech}}{P.a}$$

Avec :

- V_1 = volume total de l'EDTA utilisé pour le dosage de calcium et de magnésium
- V_2 = volume de l'EDTA utilisé pour le titrage de calcium seul
- N = normalité de l'EDTA (0,02N)
- Fc = facteur de conversion
- Meq_{Mg} = milliéquivalent gramme de Mg
- Wech = poids de la matière sèche soit 100grs
- P = poids de l'échantillon pour incinération (1g), A = aliquote

h) Dosage de phosphore (Charlot, 1966)

L'évolution du phosphore a été effectuée par colorimétrie.

h.1. Principe

En milieu acide en présence des ions V^{5+} et Mo^{6+} dans l'acide

phosphorique donne un complexe phospho-vanado-molybdique jaune dont la densité optique est mesurée à 100 nm.

h.2. Mode opératoire :

- Dissoudre 20grs de molybdate d'ammonium dans 200ml d'eau chaude ;
- Laisser refroidir puis redissoudre séparément 1gr de monovanadate d'ammonium dans 10 ml d'eau chaude ;
- Laisser refroidir le tout dans un ballon de 1 litre de solution avec de l'eau distillée.
- Préparer la solution standard 100 ppm en dissolvant 0,439 gr de KH_2PO_4 dans l'eau distillée et diluer à 1 litre. Puis diluer cette solution standard à 25 ppm.
- Prélever 5ml du minéralisât et ajouter 45 ml d'eau distillée pour constituer une solution de 50 ml.
- Ajouter aux échantillons ainsi qu'aux étalons 10 ml du réactif vanadomolybdique ;
- Bien agiter et laisser reposer pendant 10 minutes ;
- Colorimétrer (lire au colorimètre) à 400 nm en se servant d'un tube n° zéro comme témoin.

Calcul:

$$Y = Cx \frac{D.O.Ech \times fd}{D.O.St}$$

Y : nombre de mg de phosphore contenu dans 100 grs de matière sèche de l'échantillon ;

D.O._{Ech} : densité optique de l'échantillon ;

D.O._{St} : densité optique du standard

Fd : facteur de dilution

Cx : concentration du standard

II.2.5. Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux ont été extraits selon la méthode d'extraction en continu par un solvant spécifique se rapportant au principe actif à extraire.

Dans ce présent travail, nous avons utilisé le soxhlet et l'éther de pétrole (fraction de 45 – 60°C) comme solvant.

Mode opératoire d'extraction :

- Prendre 5g de poudre finement moulue et l'introduire dans une cartouche puis la boucher avec l'ouate.
- Déposer la cartouche dans l'extracteur soxhlet dans lequel on y a mis 50ml de solvant.
- Chauffer le ballon jusqu'au point d'ébullition du solvant qui s'évapore puis se condense dans le réfrigérant, puis retombe dans l'extracteur en baignant la cartouche et son contenu.
- Laisser siphonner le solvant baignant la cartouche jusqu'à clarification complète de ce dernier puis arrêter l'opération.
- Pendant le temps d'arrêt, la cartouche doit tremper dans le solvant.
- Enlever la cartouche puis sécher à l'étuve à 105°C et ensuite peser après refroidissement.
- Recommencer l'opération jusqu'à l'obtention du poids constant du matériel contenu dans la cartouche
- Après extraction, le ballon renfermant le mélange solvant-extrait est exposé à une température légèrement inférieure à 70°C pour chasser le solvant d'extraction et garder l'extrait brut.

Il est à noter que le rendement d'extraction s'obtient par le calcul en utilisant la relation suivante :

$$\text{Rdt} = \frac{P'}{P} \times 100$$

Avec :

- Rdt : Rendement ;
- P' : Le poids des lipides totaux ;
- P : Poids de la prise.

Pour les différentes pesées, nous avons utilisé la balance électronique de marque Mettler AE100.

II.2.6. Protéines brutes totales selon Kjeldhal (Audigie et al., 1980)

Les réactifs suivants ont été nécessaires pour le dosage :

- H_2SO_4 conc.
- H_2SO_4 0,01 N
- Acide borique H_3BO_3 4%
- Catalyseur mixte : 80 gr de K_2SO_4 + 2gr de $CuSO_4$ + 2 gr de Se
- Indicateur mixte : vert de bromocrésol (à 1% dans l'eau) et rouge de méthyle (à 0,1% dans l'alcool éthylique) dans les proportions 5 :1

a) Minéralisation

- Introduire dans un ballon Kjeldhal de 250 ml 2,0 gr de poudre séchée, 5 ml d'acide sulfurique concentré et 0,2 gr de catalyseur mixte. Le ballon est ensuite placé en position inclinée sur une calotte sous la hotte ou à l'air libre.
- Chauffer d'abord doucement pendant quelques minutes puis porter à ébullition jusqu'à la coloration brun-verdâtre ;
- Maintenir l'ébullition pendant une demi-heure.
- La durée totale de chauffage varie entre 90 à 120 minutes ;
- Retirer le ballon et laisser refroidir le mélange en vue de le diluer avec 250 ml d'eau distillée.

b) Distillation

- Placer dans un erlenmeyer de 100 ml, 10 ml de la solution d'acide borique et 3 à 4 gouttes d'indicateur mixte. Le bout inférieur du réfrigérant doit plonger dans la solution d'acide borique.
- Introduire ensuite successivement dans l'appareil à distiller 10 ml de minéralisat et 10 ml de NaOH 40% en rinçant chaque fois l'entonnoir par un jet de pissette ;
- Distiller pendant 4 minutes puis baisser l'erlenmeyer de façon à rincer l'extrémité du réfrigérant tout en poursuivant la distillation pendant une minute. La première goutte du distillat marque le début de la distillation.

c) Filtration

Le distillat est titré avec une solution d'acide sulfurique 0,01 N. La fin du titrage est marquée par l'apparition d'une teinte rose. La teneur en azote est donnée par l'expression :

$$\%N = \frac{\text{még.N} \times N_1 \times V_1 \times V_2 \times 100}{P \times V_3} \quad \text{ou } 0,35 V_1$$

Où :

még.N = milliéquivalent d'azote soit $14 \cdot 10^{-3}$ gr ;

N_1 = normalité du titrant (0,01N) ;

V_1 = volume du titrant

V_2 = volume total du minéralisat

P = Poids de l'échantillon sec

V_3 = volume du minéralisat

et le pourcentage en protéines brutes totales est donné par :

$$\%PBT = \%N \times 6,25$$

II.2.7. Screening chimique

En ce qui est du screening chimique, nous avons suivi un certain nombre de procédés dans l'extraction des alcaloïdes, flavonoïdes et leucoanthocyanes, les tanins, les terpènes et stérols, les quinones et les saponines.

Pour les alcaloïdes la méthode utilisée pour leur extraction est une combinaison bien dosée des modes opératoires décrits par Wome, 1985 et Meuwly, 1992, et dont les détails sont repris ci-après :

- 200 grammes de poudre sont épuisés au Soxhlet avec 500 ml d'éther de pétrole 45-60°C
- Le marc1 obtenu est séché à l'air libre puis chauffé à reflux dans 500 ml d'éthanol 96% pendant 4 heures ;
- Après filtration, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite
- Le marc 2 obtenu après filtration est écarté ;
- Le résidu d'évaporation est repris dans l'acide chlorhydrique 0,5 N et le mélange est agité puis filtré ;
- Le filtrat est alcalinisé progressivement avec l'ammoniaque 5% jusqu'à pH 10 puis extrait par plusieurs portions de 30 ml de chloroforme
- La phase organique est évaporée à sec sous pression réduite, et le résidu d'alcaloïdes totaux pesé est placé dans un récipient stérilisé puis conservé au réfrigérateur.

Le schéma d'extraction correspondant au mode opératoire détaillé est le suivant :

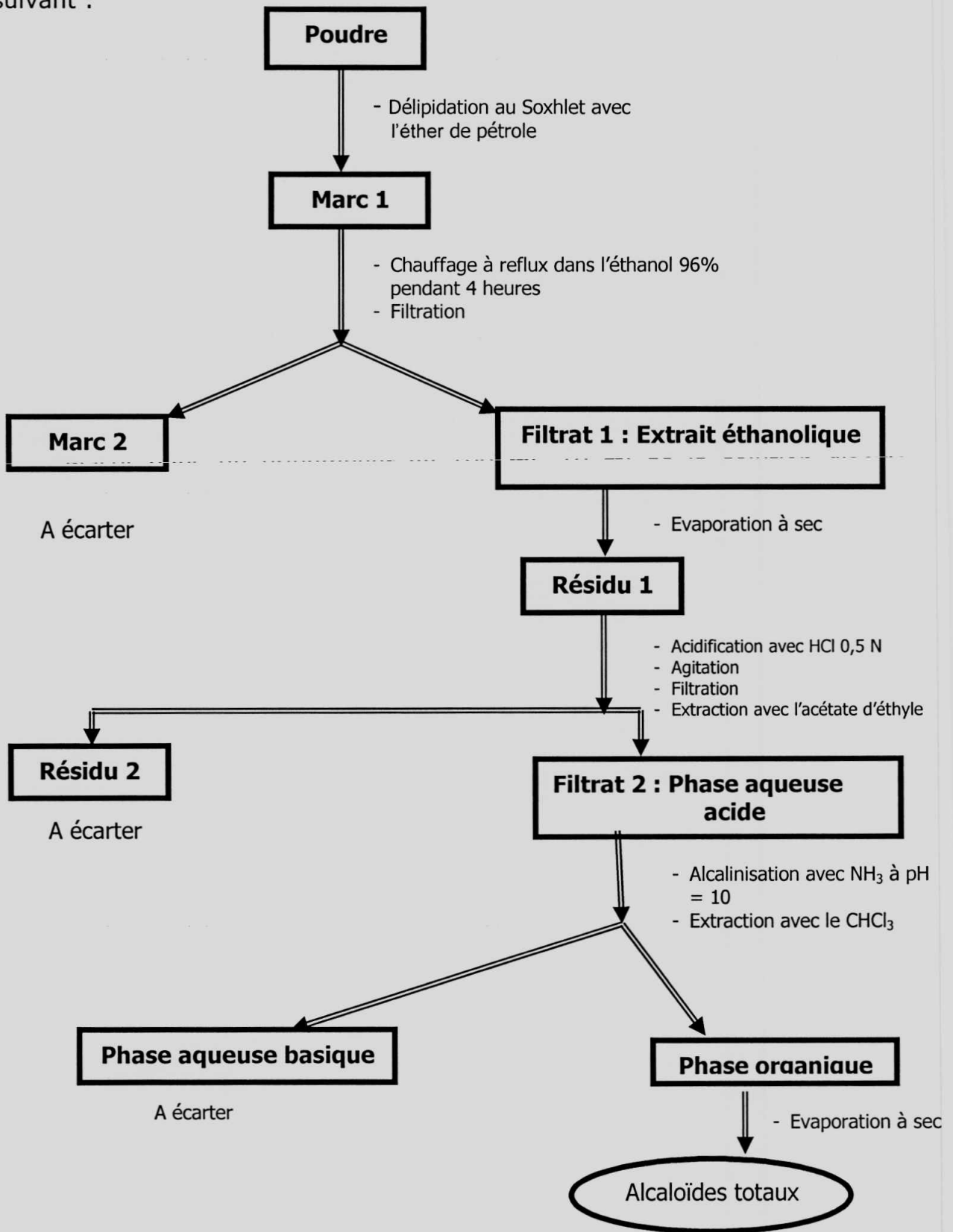


Schéma 1 : Extraction des alcaloïdes

Pour les Tanins, Thomas (1936) et Delaude, (1969) préfèrent utiliser le mode opératoire ci-après : On prélève 5ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai dans lequel on ajoute 1ml de FeCl_3 1%. L'apparition d'une coloration verte ou bleue foncée indique un test positif. Le résultat était positif.

Quant aux Saponines, le procédé de purification que nous avons utilisé se fonde sur les caractéristiques physico-chimiques les plus communes à cette classe de substances, à savoir (Fournet, 1979 et Delaude, 1969) :

- L'insolubilité dans l'éther sulfurique;
- La possibilité de les purifier par dialyse en raison de leur poids moléculaire élevé;
- La formation des complexes équimoléculaires typiques de grande insolubilité avec les 3 bêta hydroxystéroïdes : les digitones.

Le mode opératoire conseillé pour extraire les saponines ou saponosides, qui sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique, caractérisés par leurs propriétés tensioactives principalement la dissolution dans l'eau avec formation des solutions moussantes persistantes, consiste à placer 2ml d'extrait aqueux dans un tube à essai, puis agiter énergétiquement. L'apparition d'une mousse persistante atteste de la présence des saponines.

II.2.8. Analyse chromatographique du totum alcaloïdique de *Picralima nitida*

Pour l'analyse chromatographique du totum alcaloïdique de *Picralima nitida* nous avons utilisé deux techniques : la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne.

II.2.8.1. Chromatographie analytique sur couche mince.

Cette technique nécessite l'utilisation des méthodes et des

matériels appropriés. En ce qui est des matériels, nous avons :

- Feuille d'aluminium 4x10cm, silice 0,25mm
- Cuve de verre
- Eluant : Ethanol- Acétate d'éthyle – Ether de pétrole 2/1/1
- Lampe U.V. de marque P.W. ALLEN & Co. A 425 aux longueurs d'onde 254 et 366 nm.

Mode opératoire :

- Tracer à l'aide d'une tige métallique une ligne horizontale à une extrémité (à environ 1cm du bord de la feuille) ;
- Déposer sur cette ligne une goutte d'échantillon à chromatographier et laisser sécher ;
- Tracer une autre ligne à l'autre extrémité de la feuille ;
- Introduire la feuille d'aluminium verticalement (la ligne de départ orientée vers le bas) dans la cuve contenant l'éluant dont la hauteur n'atteint pas la ligne de départ tracée. Cette cuve étant saturée en vapeur de l'éluant ;
- Développer le chromatogramme ;
- Arrêter le développement lorsque le front du solvant atteint la frontière tracée ;
- Laisser sécher la plaque, ensuite révéler sous une lampe U.V. Encercler les spots.

II.2.8.2. Chromatographie préparative sur colonne.

Pour l'analyse chromatographique préparative sur colonne de *Picralima nitida* il est exigé l'emploi des méthodes et des matériels appropriés. En ce qui est des matériels, nous avons :

- Adsorbant : Kieselgur 100 de 0,2 - 0,5 mm (35 - 70 mesh)

- Lampe U.V. de marque P.W. ALLEN & Co. A 425 aux longueurs d'onde 254 et 366 nm.
- Cuve de chromatographie
- Eluant : Ethanol- Acétate d'éthyle – Ether de pétrole 2/1/1
- Colonne de chromatographie de 40 cm de longueur
- Tubes à essai
- Bêchers
- Baguette
- Pompe

Mode opératoire:

- Préparer dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et de l'éluant ;
- Ajouter par petites quantités l'éluant dans l'adsorbant pour obtenir un mélange suffisamment fluide pour couler facilement dans la colonne ;
- A l'aide d'un entonnoir, verser suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm ;
- Tapoter les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant ;
- Ouvrir le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et poursuivre l'addition du mélange homogénéisé par portions successives en évitant la formation de bulles d'air ;
- Au remplissage de la colonne à la hauteur voulue, laisser décanter l'adsorbant jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide ;
- Ouvrir le robinet pour que l'éluant s'enfonce un peu dans l'adsorbant et, à l'aide d'une pipette, couler l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer, puis ajouter l'éluant ;
- Pendant l'opération, veiller à ce que le niveau de l'éluant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant ;
- A l'aide de la pompe, forcer l'éluant à l'adsorbant un peu plus

rapidement afin de raccourcir le temps d'élution ;

- Recueillir à l'aide des tubes à essai les différentes fractions qui s'écoulent par le robinet ;
- Rassembler en un endroit les fractions correspondantes ou identiques et éliminer celles contenant des mélanges de produits, ceci grâce aux valeurs de Rf données par la C.C.M.

II.2.9. Etude de l'interaction des alcaloïdes fractionnés avec la protohémine (Mpiana, 2003)

Notre étude a été réalisée dans le système eau-éthanol 30%(V /V) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Les matériels requis sont les suivants :

- Balance analytique de marque Mettler AE100 ;
- Différentes verreries ;
- Spectrophotomètre UV-Visible de marque SPECTRUM Sp 1105.
- Extraits alcaloïdiques ;
- Hémine (poudre) ;
- Alcool éthylique ;
- Hydroxyde de sodium pur pour analyse.

Les données expérimentales ont été obtenues par la spectrométrie UV-Visible.

II.2.9.1. Manipulation

Les opérations suivantes ont été réalisées suivant l'ordre ci-après :

- Pesée de l'hémine et des extraits alcaloïdiques ;
- Préparation des solutions des alcaloïdes et d'hémine ;
- Préparation des échantillons à partir de différentes solutions mères par simple dilution ;

- Détermination des domaines d'absorption de l'hémine, des alcaloïdes et des mélanges alcaloïde-hémine.

II.2.9.2. Mode opératoire

a) Pesée des solutés

A l'aide d'une balance analytique peser exactement 0,5000 gr d'hémine ; 0,3097 gr d'alcaloïde A₁ ; 0,5893 gr d'alcaloïde A₂, 0,2768 gr d'alcaloïde A₃ et 0,8066 gr d'alcaloïde A₄

b) Préparation des solutions mères :

- Introduire 0,5000 gr d'hémine et quelques cristaux de NaOH dans un ballon ;
- Ajouter 600 ml de solvant (eau-éthanol 30%) et agiter jusqu'à dissolution complète. On obtient une solution mère d'hémine $8,33 \cdot 10^{-4}$ gr/ml ;
- Dissoudre respectivement les alcaloïdes A₁, A₂, A₃ et A₄ dans 15ml d'éthanol pour chaque extrait ;
- Prendre respectivement les 15ml de chaque solution précédente et les diluer dans 30ml d'eau, on obtient ainsi une solution mère en éthanol 30% pour chaque extrait dont les concentrations respectives sont pour : A₁ 0,006194 gr/ml, A₂ 0,011786 gr/ml , A₃ 0,005536 gr/ml et A₄ 0,016132gr/ml

c) Préparation du solvant :

Prendre 312,5ml d'éthanol à 96% et les déverser dans un ballon jaugé de 1 litre et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. On obtient ainsi 1000ml d'une solution eau-éthanol à 30%.

d) Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés en mélangeant des proportions de différentes solutions mères et du solvant de façon à constituer un volume de 5ml pour chaque échantillon, tout en veillant à ce que seule la concentration de l'hémine reste constante dans tous les échantillons d'une même série.

Les volumes de différents mélanges des constituants ainsi que les concentrations en hémine et en alcaloïdes se trouvent consignés en annexe dans les tableaux 7, 8, 9 et 10.

e) détermination des domaines d'absorption :

- Prélever une solution mère d'hémine et balayer au spectrophotomètre toutes les longueurs d'ondes possibles ;
- Observer les zones où il y a absorption et tirer le spectre ;
- Faire la même chose pour les alcaloïdes et les échantillons contenant le mélange hémine-alcaloïde.

CHAPITRE TROISIEME : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Composition chimique de *Picralima nitida* (stapf) Th. & H. Dur

Dans ce présent chapitre, nous avons procédé à la détermination des taux d'humidité, des lipides, des cendres et protéines bruts ; et les différents éléments chimiques contenus dans les grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur.

En plus, quelques opérations en vue de déterminer la composition chimique de *Picralima nitida* ont été réalisées notamment le screening chimique, le dosage de minéraux et substances toxiques et, enfin, l'isolement, la purification et le dosage des principes actifs majeurs.

III.1. 1. Détermination des taux d'humidité, des lipides, des cendres et protéines bruts

Après analyse au laboratoire, les taux d'humidité, des cendres brutes, des protéines brutes contenus dans les grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur, ont été déterminés et les résultats escomptés sont repris dans le tableau 1:

Tableau 1 : Taux d'humidité, lipides bruts, cendres brutes et protéines brutes des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur.

Taux d'humidité				Cendres brutes			Lipides bruts			Protéines brutes		
Prise d'essai (gr)	Poids sec (gr)	Poids d'eau (gr)	%	Prise d'essai (gr)	Poids de cendres (gr)	%	Prise d'essai (gr)	Poids de lipides (gr)	%	\overline{V} (ml)	%N	%PBT
2,0153	1,8270	0,1883	9,3440	4,0000	0,1290	3,2250	30,0000	2,3080	7,6930	5,43	1,90	11,88

Légende :

\overline{V} = volume moyen du titrant

%N = $0,35 \overline{V}$

%P.B.T. = $6,25 \cdot \%N$

De l'analyse des données contenues dans ce tableau 1, il se dégage les constats selon lesquels pour une prise d'essai de 2,0153 gr de poudre, le taux d'humidité est 9,3440%. En plus, le pourcentage des cendres brutes est de 3.225 % dans la poudre sèche des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th.& H.Dur tandis que, les lipides bruts 7,6930% et les protéines brutes totales 11,88%.

III.1.2. Screening chimique

En ce qui est du screening chimique, les résultats obtenus sont mieux élucidés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Screening chimique brutes des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur.

Substances phytochim Echantillon	Alc			Sap	Ta	Q	Fla	Leu	St & Te
	Me	D	Ma						
Poudre brute	+++	+++	++	+++	+++	-	+	+	-
Tourteau éther de pétrole	++	++	++	++					
Tourteau extrait méthanolique	-	-	-	-					
Extrait méthanolique	+	+	-	++					

Terpènes et stérols : Pas de coloration donc pas de stérols et terpènes.

Légende :

- Alc : alcaloïdes
- Sap : saponines
- Ta : tanins
- Q : quinones
- Fla : flavonoïdes
- Leu : leuco anthocyanes
- St : stérols
- Te : terpènes
- +++ : Quantité abondante
- ++ : Quantité moins abondante
- +
- : substance absente

Le tableau 2 montre que les alcaloïdes, les saponines et les tanins sont présents en quantité abondante, tandis que les flavonoïdes et les leucoanthocyanes se retrouvent en quantités faibles dans l'échantillon. Les quinones, les stérols et les terpènes sont quasiment absents. Ces résultats sont presque identiques avec ceux trouvés par deux chercheurs camerounais. (Nkere et Iroegbu ,2005).

Les recherches des principes actifs dans les tourteaux de graines de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur ont donné les résultats suivants : Le tourteau de l'éther de pétrole contient les alcaloïdes et les saponines tandis que celui provenant de l'extraction par le méthanol ne renferme ni alcaloïdes ni saponines. Cette dernière observation s'explique par le fait que les alcaloïdes et les saponines sont très solubles dans l'alcool tandis qu'ils ne le sont pas dans l'éther de pétrole ce qui prouve leur présence dans le tourteau éthéré. Nous ne sommes pas tombé sur un travail dans lequel les recherches étaient orientées sur les tourteaux.

Les observations faites permettent de comparer le matériel végétal récolté au Congo avec ceux d'autres pays d'Afrique. L'on sait au moins que la composition chimique qualitative des métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, quinones ...) peut varier en fonction de l'écologie (climat, terrain ...), de la situation géographique, de la variété de la plante, de la nature du sol, du moment de récolte et du mode de conservation. (Manske et Holmes, 1953).

III.1.3. Teneur des minéraux dosés dans les cendres et substances toxiques

La détermination de la teneur des minéraux dosés dans les cendres et substances toxiques a donné lieu aux résultats contenus dans le tableau suivant :

Tableau 3. Minéraux dosés dans les cendres et substances toxiques dans la poudre brute des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

	Moyenne en gr x 10 ⁻³	Spot test	Teneur en %
Prise d'essai des cendres	1003		100
Fer	0,117	-	0,0117
Calcium	0,000	-	0,000
Magnésium	1,500	-	0,150
Phosphore	1,003	-	0,100
Oxalates	0	-	0
Cyanures	0	-	0
Nitrates	0	+	0
Nitrites	0	-	0

Légende :

- + : Substance en trace
- : Substance absente
- 0 : Analyse non effectuée

Dans ce tableau 3, il se dégage les résultats d'analyse qualitative et quantitative de quelques minéraux à savoir le fer, le calcium, le magnésium et le phosphore dans les cendres. Le fer qui est un oligoélément montre un pourcentage de 0,0117% qui est dans la marge des taux des oligoéléments (Encyclopédie libre Wikipedia,

(<http://www.wikipedia.org/wiki/oligo%C3%A9/>) : le calcium, le magnésium et le phosphore qui sont eux des macroéléments montrent les taux respectifs suivants : 0,000 % ; 0,150 % ; 0,100 %.

Pour ce qui est des substances toxiques seuls les nitrates sont présents sous forme de trace dans la plante à l'étude. Celle-ci ne contient ni les nitrites, ni les oxalates, ni les cyanures. Etant donné la prescription en *per os* des drogues à base de cette plante et ce en utilisant toutes ses parties constitutives.

III.1. 4. Taux d'alcaloïdes, des saponines, des sapogénines et des tanins

Dans ce point, nous avons isolé, purifié et dosé les principes actifs majeurs contenus dans la graine de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur. A l'issue de nos analyses au laboratoire nous avons eu les résultats mentionnés dans les tableaux ci-après:

Tableau 4. Taux d'alcaloïdes, des saponines, des sapogénines et des tanins des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

Principes actifs	Prise d'essai (gr)	Poids en gr	Rendement en %
Alcaloïdes	30,000	0.677	2.257
Saponines	50,000	3,687	7,374
Sapogénines	2,000*	0,2110	10.550**
Tanins	50,000	10,150	20,301

Légende :

* Prise d'essai de saponines

**Pourcentage de sapogénines dans la prise d'essai de saponines

L'examen du tableau ci-dessus atteste que notre échantillon contient une quantité assez importante de saponines, tanins et d'alcaloïdes totaux. Néanmoins nous nous sommes plus intéressé aux alcaloïdes lesquelles substances ont pris une part très importante dans notre étude.

3,687g des saponines représentant 7,374 % en poids de notre prise d'essai ont été isolées. L'hydrolyse acide de 2,000 gr des saponines ont donné 0,210 gr de sapogénines soit un de rendement 10.550 %.

La méthode utilisée pour isoler les alcaloïdes totaux de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur nous a donné, avec une moyenne de trois essais, un taux d'alcaloïdes de 2.257%.

En comparant ce taux avec celui obtenu, pour les grains de la même plante, par des chercheurs nigériens AKPAN et UMOH (2004) qui ont trouvé 0,012%, notre pourcentage est très élevé. Cette différence peut être due à plusieurs facteurs notamment le milieu où pousse la plante mais aussi les différentes méthodes d'extraction.

Ce taux serait plus élevé si nous disposions des moyens matériels adéquats qui nous éviteraient des pertes dues aux étapes extractions.

Quant aux tanins le taux obtenu est de 20,301% soit 10,150 grs de tanins isolés pour une prise d'essais de 50 grs de poudre.

III.1.5. Valeurs de Rf des spots des alcaloïdes de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

Les différentes valeurs de Rf des spots d'alcaloïdes des graines de *Picralima nitida* figurent dans le tableau ci-après :

Tableau 5 : Valeurs de Rf des spots des alcaloïdes de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur sur couche mince

N° spot	Rf	Observation sous la lampe UV
1	0,38	Tache orange
2	0,55	Tache orange
3	0,70	Tache orange
4	0,87	Tache orange

Pour ce qui est de la chromatographie analytique sur couche mince, le chromatogramme après révélation à la lampe UV, nous avons observé la

présence de 4 taches toutes de coloration orange avec des Rf, respectifs 0.38, 0.55, 0.70 et 0.87 pour ces alcaloïdes.

Le Chromatogramme ci-dessous illustre mieux les spots d'alcaloïdes de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

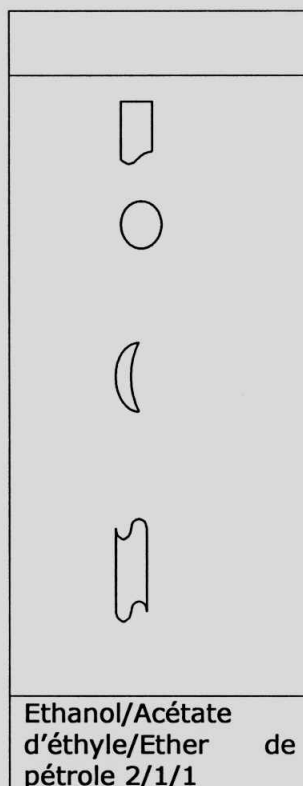


Fig.1 Chromatogramme des alcaloïdes totaux de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

Les quatre spots observés représentent le nombre de constituants que nous avons pu déceler dans le totum alcaloïdique et dont les Rf. sont repris dans le tableau 5.

III.1.6. Caractéristiques macrophysiques des alcaloïdes isolés par chromatographie sur colonne.

Les données relatives aux caractéristiques des alcaloïdes isolés des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur. sont consignés dans le tableau que voici :

Tableau 6. Caractéristiques macrophysiques des alcaloïdes des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur. isolés par chromatographie sur colonne.

Extraits	Poids en gr	Coloration	Texture
A ₁	0,3097	Jaune	Pâte molle
A ₂	0,5893	Jaune-orangé	Pâte molle
A ₃	0,2768	Brune	Pâte molle
A ₄	0,8066	Jaune-orangé	Pâte molle

Nous sommes parti de 2,5000 gr d'alcaloïdes totaux pour aboutir à 1,9824 gr d'alcaloïdes isolés purs représentant 4 alcaloïdes A₁, A₂, A₃ et A₄ accusant les poids respectifs suivants : 0.3097 , 0.5693 , 0.2768 et 0.8066 gr. Ils ont tous la consistance d'une pâte molle et ont les couleurs respectives ci-après : Jaune, jaune-orangé, brune et jaune-orangé. L'alcaloïde A₄ est l'alcaloïde majeur compte tenu de son poids : 0,8066 gr.

III.1.7. Discussion des résultats sur la composition phytochimique de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

Nos résultats sur le screening chimiques qui ont révélé non seulement la présence des principes actifs ci-après : les alcaloïdes, tanins et saponines en quantités considérables tandis que les flavonoïdes et leucoanthocyanes en faible quantité mais aussi l'absence des quinones, stérols et terpènes sont plus ou moins identiques avec ceux de Iroegbu et Nkere (2005) qui ont travaillé sur la même plante.

Aussi, nous avons observé une petite différence au niveau des leucoanthocyanes détectées par nous et non détectées par ces deux chercheurs ; tandis que les terpènes et stérols observés par eux ne l'ont pas été par nous. Les quinones n'ont pas été observées dans les deux recherches.

En ce qui est des résultats sur le tourteau de l'éther de pétrole, nous avons constaté la présence des alcaloïdes et des saponines tandis que celui provenant de l'extraction par le méthanol, ne renferme ni alcaloïdes ni saponines.

Ces résultats obtenus sur la recherche des principes actifs dans les tourteaux de grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur n'ont pas pu être comparés aux résultats d'autres chercheurs par manque de ce type des travaux dans la littérature consultée. Toutefois, ces constatations pourraient s'expliquer théoriquement par le fait que les alcaloïdes et les saponines sont très solubles dans l'alcool tandis qu'ils ne le sont pas ou quasiment pas dans l'éther de pétrole d'où leur présence dans le tourteau étheré.

Les observations faites permettent de comparer le matériel végétal récolté en R.D. Congo avec ceux d'autres pays d'Afrique. On sait néanmoins que la composition chimique qualitative des métabolites secondaires des plantes (alcaloïdes, flavonoïdes, quinones ...) peut varier en fonction de l'écologie (climat, terrain ...), de la variété de la plante, de la nature du sol, du moment de récolte et du mode de conservation. Nous pensons que les écarts des résultats que nous avons observés avec ceux de la littérature s'interprètent de cette manière- là.

L'extraction des principes chimiques majeurs : alcaloïdes, tanins, et saponines a donné respectivement les rendements ci-après : 2.567%, 7.374%, et 10.550%. Tandis que les sapogénines ont montré un rendement de 20.301% à partir de prise d'essai des saponines.

En comparant notre taux d'alcaloïdes totaux avec celui obtenu, pour les grains de la même plante, par des chercheurs nigériens AKPAN et UMOH (2004) qui ont trouvé 0,012%, notre pourcentage est très élevé. Cette différence peut être due à plusieurs facteurs notamment le milieu mais aussi les différentes modes d'extraction; ou encore le mode et les matériels de purification.

Ce taux serait plus élevé si nous disposions des moyens matériels adéquats qui nous éviteraient des pertes dues aux différentes extractions.

Le fractionnement des alcaloïdes par la chromatographie d'absorption sur couche mince et la purification de différentes fractions obtenues par chromatographie d'absorption sur colonne nous ont permis d'obtenir 4 spots représentant 4 alcaloïdes différents A_1 , A_2 , A_3 et A_4 de masses respectives 0.3097, 0.5893, 0.2768 et 0.8066 gr ; et des R_f 0.38, 0,55, 0.70 et 0.87. Les alcaloïdes A_2 , A_4 sont plus abondants que les deux autres. La différence dans la coloration de différentes bandes nous a permis de bien effectuer la séparation.

Pour ce qui est des taux d'humidité, des lipides totaux, des cendres brutes ou encore des protéines brutes aucun des travaux antérieurs exploités n'y a fait mention. Nous n'y avons pas non plus trouvé des détails sur les éléments minéraux. Ceci constitue un apport non moins négligeable dans la connaissance de la plante.

L'analyse qualitative et quantitative de quelques minéraux dont le fer, le calcium, le magnésium et le phosphore dans les cendres signalent la présence du fer, qui est un oligoélément, avec un pourcentage de 0,0117% qui est situé dans la marge des taux des oligoéléments (Encyclopédie libre Wikipedia, <http://www.wikipedia.org/wiki/oligo%C3%A9/>) ; le calcium, le

magnésium et le phosphore qui sont eux des macroéléments montrent les taux respectifs suivants : 0,000 %. 0,150 % ; 0,100 %.

Pour ce qui est des substances toxiques (minérales) seuls les nitrates sont présents en trace dans la plante à l'étude, celle-ci ne contient ni les nitrites, ni les oxalates, ni les cyanures.

Eu égard aux résultats ci-haut et aussi à la prescription en *per os* des drogues à base de cette plante et ce en utilisant toutes ses parties constitutives, nous osons croire que celles-ci ne présentent pas une toxicité certaine. Il y a aussi le fait que la prise de ce médicament est strictement limitée pour un temps court.

Ces résultats sont aussi étayés par ceux de la recherche entreprise par Fakeye et al (2004) sur l'évaluation du profile de toxicité au niveau de la peau et des yeux d'une fraction alcaloïdique des écorces de *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). En effet, une faible toxicité sans conséquences néfastes a été observée et ce en rapport avec la dose employée.

Ceci justifie un peu l'usage et les modes d'emploi (boisson, mastication,...) des recettes médicamenteuses à base de cette plante chez les pygmées de Mambasa en RD Congo.

III.2.0. Interaction des alcaloïdes fractionnés avec la protohémine

Dans ce point, nous avons fait une étude qualitative de l'interaction des alcaloïdes fractionnés avec la protohémine afin de confirmer ou d'infirmier s'il y aurait interaction ou pas entre ces deux entités afin d'élucider le mode d'action des principes actifs présents dans nos grains sur le paludisme.

En effet, l'existence d'une interaction ou pas entre un principe actif et la protohème est un indicateur du mode d'action du principe actif sur le paludisme. (Mpiana, 2003)

La connaissance du mode d'action d'un antipaludéen est très capitale non seulement dans la prescription médicale selon qu'il s'agit d'une prophylaxie ou des soins curatifs, ou encore dans une polythérapie (car on associe les antipaludiques ayant des modes d'action différents) mais aussi dans le cas où il y aurait par exemple des problèmes de résistance.

Cette étude nous a donné les résultats qui sont représentés par les figures 2 à 10.

III.2.1. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine et des alcaloïdes seuls

Après avoir balayé notre solution d'hémine et d'alcaloïdes seuls dans l'alcool à 30% avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible nous avons observé les courbes d'absorption illustrée par les figures 2 à 6 ci-dessous :

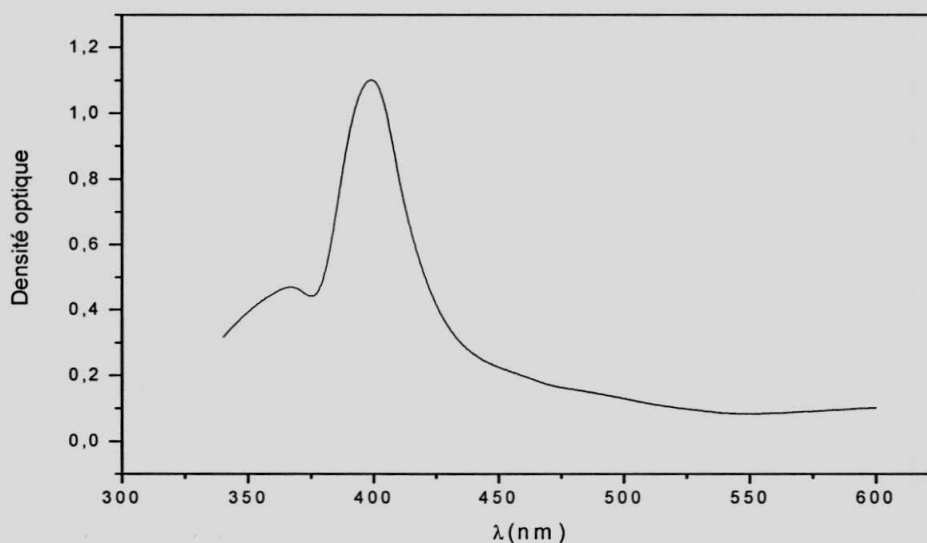


Figure 2. Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine

Il ressort de cette figure 2, que le spectre d'absorption de l'hémine seul. Après avoir balayé notre solution d'hémine avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible nous avons observé que notre solution absorbe à 402 nm comme mentionnée dans la littérature.

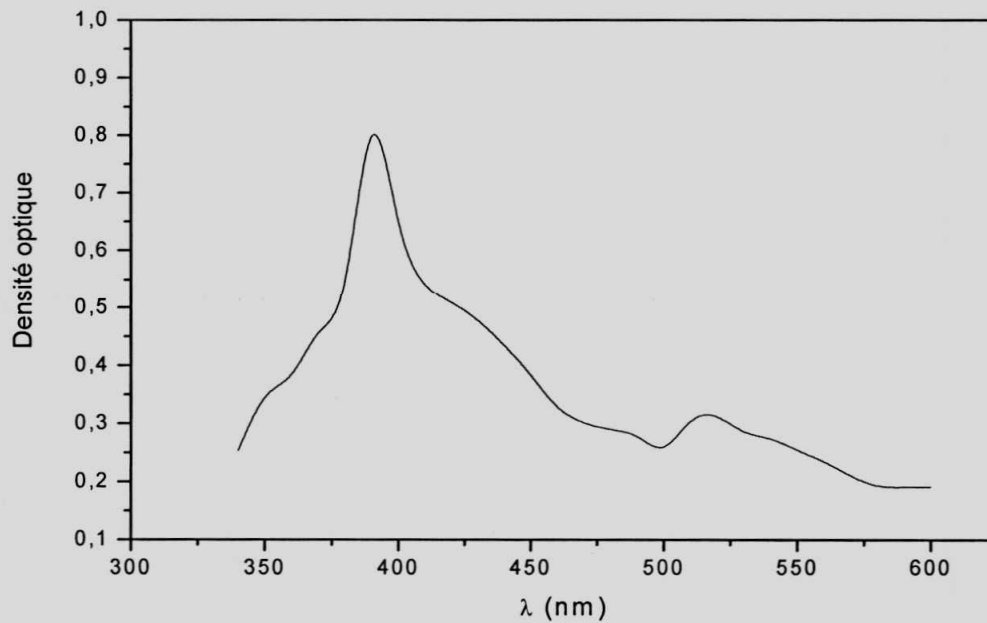


Figure 3 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alkaloïde A₁ λ 390nm

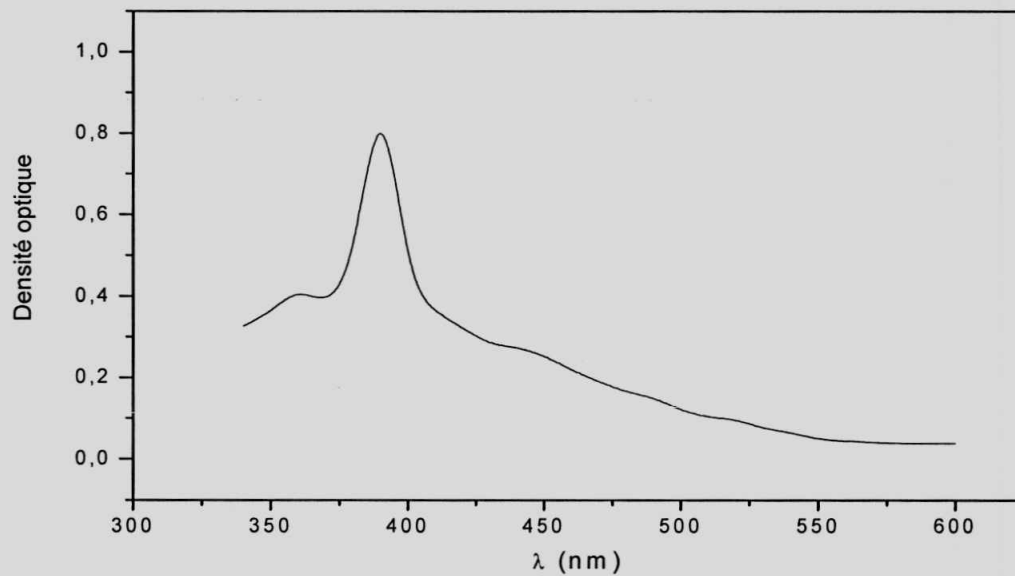


Figure 4 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alkaloïde A₂ λ 390nm.

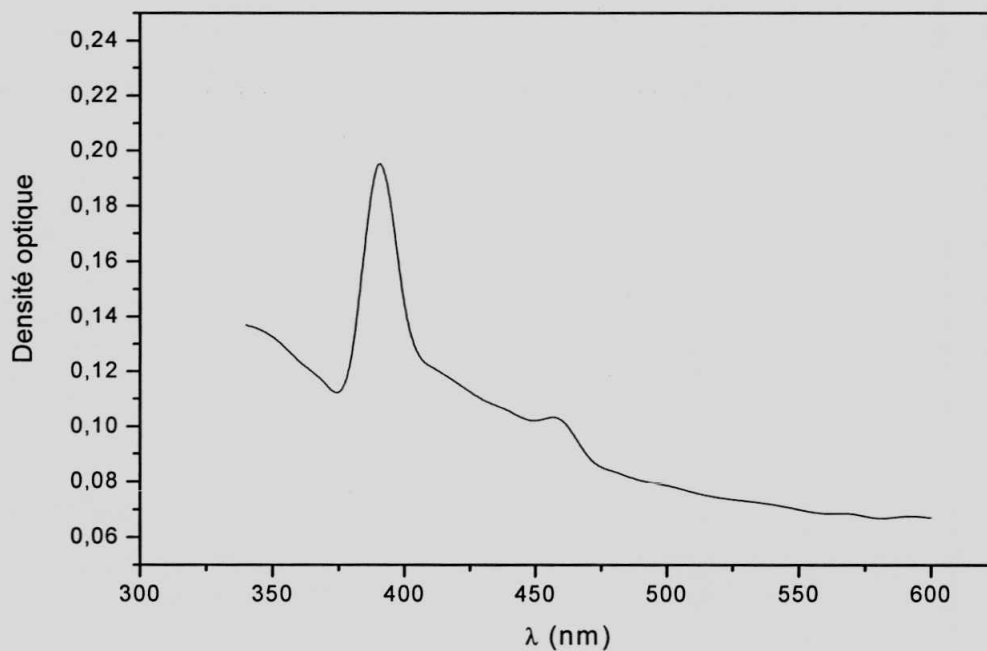


Figure 5 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alkaloïde A₃ λ 390nm

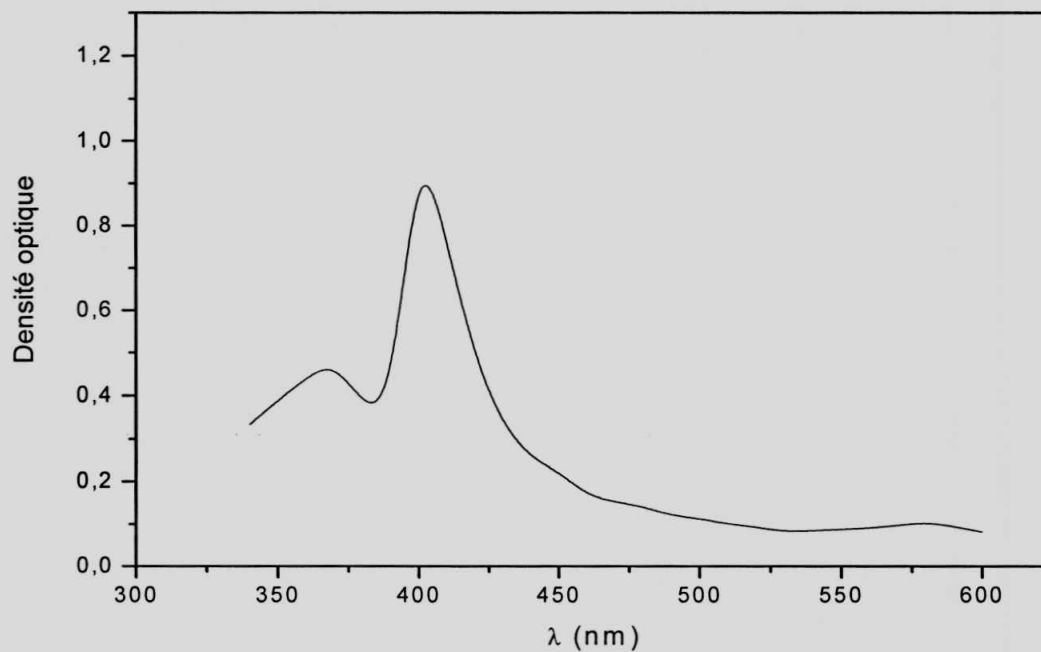


Figure 6 : Spectre d'absorption UV-Visible d'alkaloïde A₄ λ 400nm

Les figures 3 à 6 nous montrent les spectres d'absorption d'alkaloïdes seuls. Après avoir balayé nos solutions d'alkaloïdes avec toutes les

longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible nous avons observé que nos solutions absorbent respectivement à 390 nm pour les alcaloïdes A_1 , A_2 et A_3 , et à 400 nm pour A_4 .

III.2.2. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de L'alcaloïde A_1

Notre solution d'hémine en présence de l'alcaloïde A_1 , balayée avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible, a permis d'observer les courbes d'absorption présentées dans la figure suivante:

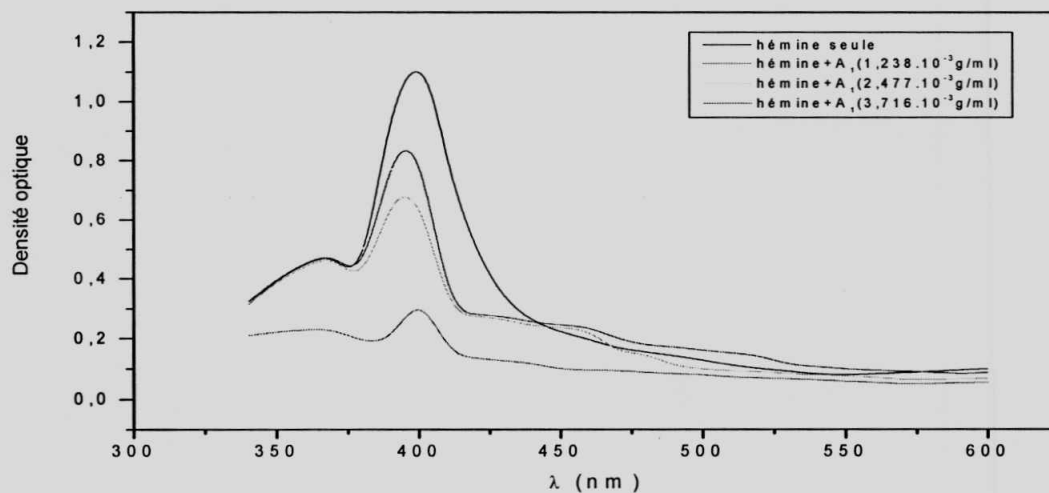


Figure 7. Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A_1

Légende : Courbe 1 représente l'hémine seule ; courbe 2 représente l'hémine avec A_1 de concentration $1,238.10^{-3}$ gr/ml ; courbe 3 représente l'hémine avec A_1 de concentration $2,477.10^{-3}$ gr/ml et courbe 4 représente l'hémine avec A_1 de concentration $3,716.10^{-3}$ gr/ml

III.2..3. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A_2

Les courbes d'absorption présentées dans la figure 8 sont les résultats du balayage de la solution d'hémine en présence de l'alcaloïde A_2 avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible,

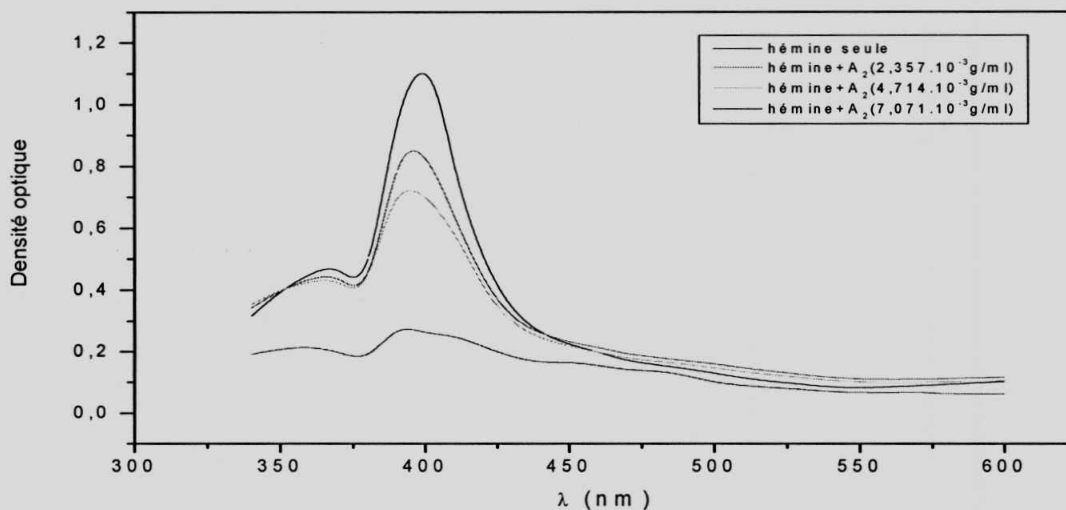


Figure 8. Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alkaloïde A₂

Légende: Courbe noire représente l'hémine seule ; courbe rouge représente l'hémine avec A₂ de concentration $2,357 \cdot 10^{-3}$ gr/ml ; courbe verte représente l'hémine avec A₂ de concentration $4,714 \cdot 10^{-3}$ gr/ml et courbe bleue représente l'hémine avec A₂ de concentration $7,071 \cdot 10^{-3}$ gr/ml.

III.2.4. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alkaloïde A₃

Balayée avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible, la solution d'hémine en présence de l'alkaloïde A₃, a permis d'observer les courbes d'absorption qu'illustre la figure suivante :

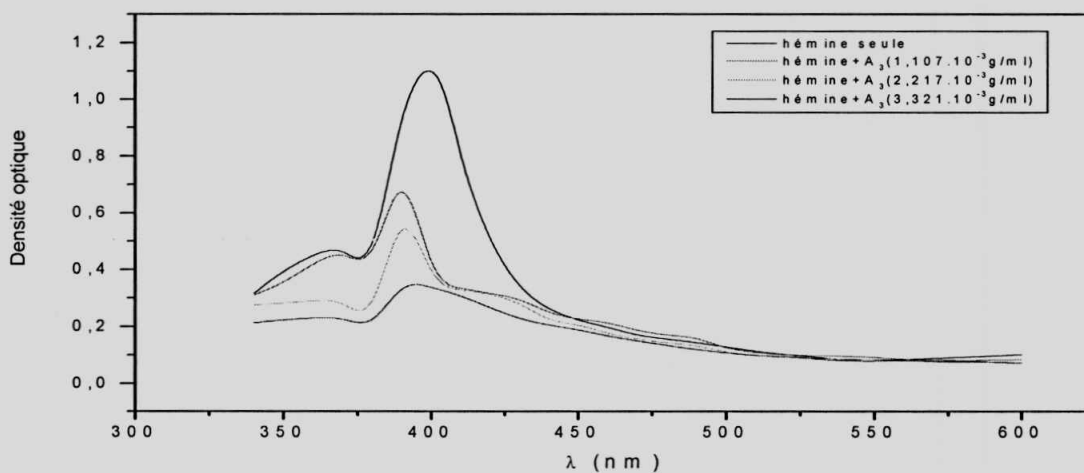


Figure 9. Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alkaloïde A₃

Légende : Courbe noire représente l'hémine seule ; rouge représente l'hémine avec A_4 de concentration $1,107.10^{-3}$ gr/ml ; verte représente l'hémine avec A_4 de concentration $2,214.10^{-3}$ gr/ml et bleue représente l'hémine avec A_4 de concentration $3,321.10^{-3}$ gr/ml

Les figures 7, 8 et 9 montrent une décroissance de l'absorbance de l'hémine lors de l'ajout des alcaloïdes A_1 , A_2 et A_3 à différentes concentrations. Cette décroissance de l'absorbance s'explique par la diminution de la concentration de l'hémine libre en solution, et elle est d'autant plus prononcée lorsque la concentration d'alcaloïdes augmente.

Ces observations sont conformes à la théorie qui stipule que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration, et cette diminution de l'absorbance est une preuve irréfutable de l'interaction hémine-alcaloïde. (Mpiana, 2003).

III.2.5. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A_4

La solution d'hémine en présence de l'alcaloïde A_4 , balayée avec toutes les longueurs d'ondes possibles d'une lumière UV-Visible, nous a permis d'observer les courbes d'absorption suivante :

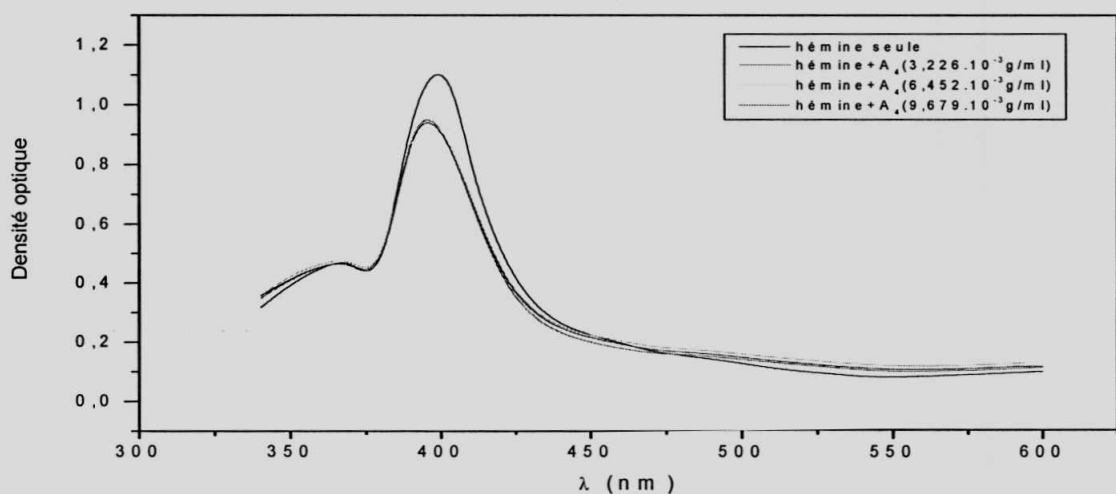


Figure 10. Spectre d'absorption UV-Visible de l'hémine en présence de l'alcaloïde A_4

Légende : Courbe noire représente l'hémine seule ; courbe rouge représente l'hémine avec A₄ de concentration $2,226 \cdot 10^{-3}$ gr/ml ; courbe verte représente l'hémine avec A₄ de concentration $6,452 \cdot 10^{-3}$ gr/ml et courbe bleue représente l'hémine avec A₄ de concentration $9,679 \cdot 10^{-3}$ gr/ml

Cette figure 10 ne montre pratiquement pas la décroissance de l'absorbance lors de l'ajout de l'alcaloïde A₄ à différentes concentrations. Cette observation montre s'explique par le fait que la concentration de l'hémine libre en solution ne diminue pas car il n'y a pas interaction entre celle-ci et l'alcaloïde A₄.

Cette observation est conforme à la théorie qui stipule que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration, et cette constance de l'absorbance est une preuve irréfutable de la non interaction hémine-alcaloïde A₄. (Mpiana ,2003)

III.2.6. Discussion des résultats

L'étude qualitative de l'interaction des alcaloïdes fractionnés avec la protohémine a révélé une certaine réactivité entre les alcaloïdes A₁, A₂ et A₃ avec la porphyrine (hémine) au moyen de la spectrométrie UV-Visible compte tenu de la variation des spectres d'absorption des mélanges réactionnels, diminution de l'absorbance, par rapport à ceux des alcaloïdes et de l'hémine seuls. Ceci montre que les alcaloïdes de *Picralima nitida* *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur suivent un mécanisme similaire à celui suivis par les antipaludiques à noyau quinoléine et l'artémisinine.

Cette affirmation est conforme à la recherche menée non seulement par Mpiana (2003) mais aussi à celles des autres chercheurs cités par ce dernier.

Cette observation nous permet aussi d'affirmer sans peur d'être contredit que les alcaloïdes de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur sont donc schizonticides sanguins et devront être utilisés pour lutter contre le plasmodium.

CONCLUSIONS ET SUGGESTIONS

Notre étude porte la contribution à la caractérisation des principes actifs des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur plante utilisée par les pygmées (Mbuté) pour combattre le paludisme dans le Territoire de Mambasa en République Démocratique du Congo.

Elle se fixe un triple objectif à savoir :

- Déterminer la composition phytochimique des grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur,
- Extraire, isoler et purifier les principes phytochimiques supposés actifs en vue d'apprécier leur action antipaludique;
- Rechercher l'existence des substances toxiques dans les grains de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur

Ainsi, nos hypothèses ont été formulées en ces termes : Partant des résultats de la recherche menée par Magilu & al, (1996) qui a abouti au fait que la consommation des grains du fruit de *Picralima nitida* (Stapf) Th.& H.Dur, un grain trois fois par jour et ce pendant trois jours, par une personne atteinte du paludisme et d'accès de fièvre soulage complètement la personne malade chez le peuple pygmée, nous estimons que :

- Les graines de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur renferment des principes actifs dont les alcaloïdes, les saponines, les quinones, et les terpènes ;
- De ce fait, ces principes actifs possèdent le pouvoir d'inhiber le développement ou de détruire des parasites responsables du paludisme ;
- Enfin, cette graine ne contient pas des substances toxiques.

En vue de vérifier l'atteinte de nos objectifs de la recherche, nous

avons utilisé la démarche méthodologique suivante :

- La récolte du matériel a été faite à Mambassa par les pygmées. Ce matériel a été confirmé à Kisangani par des spécialistes du Département de Phytotaxonomie Végétale et de l'Herbarium de la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani ;
- Quant à sa préparation, notons que les fruits ont été coupés et les grains obtenus séchés à l'ombre et à la température ambiante (22 à 31 °C) au sein du Laboratoire de Chimie Générale de la Faculté des Sciences. Un séchage spontané bien surveillé pour éviter la fermentation du matériel par la superposition des grains étalés sur la paille ;
- Enfin, sa mise en poudre a été réalisée de deux manières : 1° à l'aide d'un moulin électrique de marque MF 10 Basic IKA°WERKE de fabrication allemande au laboratoire de Pédologie des Sciences de la Terre à l'Université de Kinshasa et 2° nous avons utilisé le mortier et le pilon en bois. La poudre délipidée au soxhlet avec l'éther de pétrole et séchée a été gardée au dessiccateur pour les analyses chimiques et recherches ultérieures dont les différents modes opératoires sont mieux détaillés dans le deuxième chapitre.

Les résultats auxquels a abouti notre recherche se résument en ces termes :

Le screening chimique a mis en évidence les principes actifs ci-après : les alcaloïdes, tanins et saponines en quantités considérables tandis que les flavonoïdes et leucoanthocyanes en faible quantité. Les quinones, stérols et terpènes sont quasiment absents.

L'extraction des principes chimiques majeurs: alcaloïdes, tanins ; et saponines et sapogénines a donné respectivement les rendements ci-après : et 2,567%, 7,374%, 10,550% et 20,301%.

Le fractionnement des alcaloïdes par la chromatographie d'absorption sur couche mince et la purification de différentes fractions

obtenues par chromatographie d'absorption sur colonne nous ont permis d'obtenir 4 spots représentant 4 alcaloïdes différents A₁, A₂, A₃ et A₄ de masses respectives 0,3097 ; 0,5893 ; 0,2768 et 0,8066 gr ; et des R_f 0,38 ; 0,55 ; 0,70 et 0,87. Les alcaloïdes A₂, A₄ sont plus abondants que les deux autres. La différence dans la coloration de différentes bandes nous a permis de bien effectuer la séparation. Ce résultat corrobore notre première hypothèse.

Nous avons ensuite fait une étude qualitative de l'interaction des fractions alcaloïdiques avec la porphyrine (hémine) au moyen de la spectrométrie UV-Visible et trois parmi elles, A₁, A₂ et A₃, montrent une certaine réactivité avec celle-ci compte tenu de la variation des spectres d'absorption (diminution de l'absorbance) des mélanges réactionnels par rapport à ceux des alcaloïdes et de l'hémine seuls.

Ceci montre que les alcaloïdes de *Picralima nitida* *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur suivent un mécanisme similaire à celui suivis par les antipaludiques à noyau quinoléine ou par l'artémisinine. (Mpiana, 2003). Ces alcaloïdes sont donc des schizonticides sanguins et devront être utilisés pour lutter contre le plasmodium. Ainsi notre deuxième hypothèse a été confirmée.

Des substances toxiques : Nitrites, nitrates, cyanures et oxalates, seules les nitrates sont décelées à l'état des traces. La consommation des drogues provenant des graines de cette plante ne présente aucun danger d'intoxication pour l'homme si nous nous basons au taux en nitrates que nous avons observé. Enfin, la troisième hypothèse a été confirmée.

En résumé, nous pensons que la présente recherche est une contribution à la caractérisation des principes actifs de *Picralima nitida* (Stapf) Th. & H.Dur en République Démocratique du Congo. Elle ne prétend en aucun cas aborder tous les aspects du problème. Néanmoins, les points que nous n'avons pas abordés constituent des pistes pour des recherches ultérieures notamment la détermination de la stoechiométrie et le mécanisme d'interaction

de l'hémine avec les différentes fractions alcaloïdiques, la préparation des dérivés des principes actifs et la détermination de leur activité *in vitro* sur le plasmodium, etc...

BIBLIOGRAPHIE

- Audigie C., Figarella E. et Zauzain F. (1980). *Manipulation d'analyse biochimique*, Doin Paris, pp 273-277
- Babadi B. (1986). *Cours des Substances naturelles*, Faculté des Sciences UNIKIN, République Démocratique du Congo
- Beaux D., Fleurentin J. et Mortier F. (1997). *Diuretic action of hydroalcoholic extracts of Foeniculum vulgare var dulce (DC) roots in rats*. In *John Wiley and Sons*, V 11(4) pp 320-322
- Brasseur P. (2004). Quelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* en Afrique? in *Med. Trop.*, 64, 437-438.
- Charlot G. (1966). *Méthodes de la chimie analytique. Analyse quantitative minérale*, Masson, Paris. Pp.652-843
- Danis M., Gentilini M.(1985). Chimio prophylaxie du paludisme. Problèmes de résistance. in *Arch. Fr. Pediatr.*; 42 suppl 2:971-975.
- Danis M. (2003). Avancées thérapeutiques contre le paludisme en 2003.in *Méd. Trop.*, 63, 267-270.
- Debacker Marie Josserand (2000). *Paludisme : historique, mythes, croyances et idées reçues*, Thèse d'exercice, Médecine, Paris XII.
- Delaude C. (1969). *Contribution à l'étude de la structure chimique d'une saponine extraite d'une Polygalacée africaine : Securida longependencunculata*, thèse inédite Faculté des Sciences Université de Lège, p.24.
- Dessart, A. Jodogne J.et Paul, J. (1973). *Chimie minérale*, 17^{ème} édition ; Editions A. De Boeck, Bruxelles pp.302-314.
- Dos Santos J.R., et Fleurentin J.(1991). L'ethnopharmacologie : une approche pluridisciplinaire. in *Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs*, Paris - Metz, Eds ORSTOM et Société Française d'Ethnopharmacologie, pp.26-39.

- Duwiejua, M., Woode, E. et Obiri, D.D. (2002). Pseudo akuammigine, an alkaloid from *Picralima nitida* seed, has anti-inflammatory and analgesic actions in rats. In *Journal of Ethnopharmacology* Vol.81 (7) pp.73-79.
- Enomfon J. Akpan et Ime B. Umoh (2004). Inhibitory activity of seed extract from picralima nitida (Staph) on B-D-glucosidase, in *Biochemistry* 16(2): 72-78, Printed in Nigeria.
- Fakeye T.O., Itiola O.A., Georgess A.O., Odelela H.A.(2004). Antibacterial property of *Picralima nitida* stem bark extract in cream formulations, in *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, Volume 42, Numbers 4-5, pp. 274-279(6).
- Fakeye T O, Awe S O, Odelola H A, Ola-Davies O E, Itiola O A, Obajuluwa T. (2004). Evaluation of valuation of toxicity profile of an alkaloidal fraction of the stem bark of *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). In *J. Herb Pharmacother.*; 4:37-45 [[PubMed](#)].
- Fargier J-J., Louis F.J., Duparc S. et Coll. (1999). Essai_comparatif de l'artéméther et de la quinine dans le paludisme grave à *Plasmodium falciparum* de l'adulte et du grand enfant au Cameroun. In *Med. Trop.*; 59: p.151-156.
- Feigl, Ager V. et Oesper (1966). *Spot test in organic analysis*, pp.267, 268. Ed. De Marco, C. & Crifo,
- Fleurentin J. et Pelt J.M. (1990). Les plantes médicinales, in *La Recherche*, 21, 222, 810-818.
- Fleurentin J. et Younos C.(1991). La médecine islamique in *Encyclopédie des Médecines Naturelles (Phytothérapie - Aromathérapie)*, Paris, Eds Techniques, p. 40.
- Fleurentin J. (1993). Les plantes médicinales de la pharmacopée française in *Encyclopédie des Médecines Naturelles (Phytothérapie-Aromathérapie)* Paris, Eds Techniques, D-1, p.10
- Fournet, A. (1978). *Plantes médicinales congolaises*, Limaciopsis. ORSTOM, paris, p.183
- Francois G., Aké Assi L., Holenz J. et Bringmann G. (1996). Constituants of *Picralima nitida* display pronounced inhibitory activities against asexual

erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* in vitro. in *Journal of Ethnopharmacology* 54: pp.113-117

Grenand P., Moretti C., Jacquemin H.(1987). Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Créoles, Palikours, Wayampis. Editions de l'ORSTOM, Paris, Collection mémoires, numéro pp.108-569).

Imbert P., Gendrel D. (2002). Traitement du paludisme chez l'enfant: 2. Paludisme grave. *Med. Trop.*, , 62, pp.657-664.

Iroegbu C.U. et Nkere, C.K. (2005). Evaluation of the antibacterial properties of *Picralima nitida* stem bark extracts. . In *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*, p.182.

Le Bras M., Malvy D. (2004). Le paludisme à l'heure du « Roll Back Malaria ». *Med. Trop.*, 64, pp.576-578.

Magilu M., Mbuyi M.et Ndjele M.B. (1996). Plantes médicinales utilisées par les Pygmées(Mbute) pour combattre le paludisme dans la zone de Mambasa, Ituri, Zaire in L.J.G. van der Maesen et al (eds), *The Biodiversity of African Plants, Kluwer Academic Publisher*. Printed in the Netherlands. pp.741-746.

Makambo L. (2005-2006). *Cours des substances naturelles* inédit, Université de Kinshasa.

Makambo L. (2002). *Notes du cours d'analyse organique*, Troisième graduat, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, Rép. Dém. Congo.

Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M.(2000). Plasmodies.-Malaria. Formes cliniques, diagnostic. *Encycl. Med. Chir.*, Maladies Infectieuses, 8-507-A-20, p.16.

Malvy D., Djossou F., Receveur M.C., Le Bras M.(2000). Plasmodies: traitement, prévention. *Encycl. Méd. Chir.*, Maladies Infectieuses, 8-507-A-25, p.17.

Menzies JR, Paterson SJ, Duwiejua M, Corbett AD. (1998). Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae), In *European Journal of Pharmacology*, Volume 350, Number 1, pp. 101-108(8).

Meuwly D. (1992). *Séparation des alcaloïdes de l'opium par chromatographie sur couche mince*, IPSC Place Château 3, 1005 Lausanne, SUISSE.

- Mpiana T. (2003). *Contribution à l'étude thermodynamique et cinétique de la complexation de la protohème et la deutérohème avec les antipulvéridiques à noyau quinoléine*, thèse inédite Fac des Sciences, UNIKIN.
- Nkere C.K., and Iroegbu, C.U. (2005). Antibacterial screening of the root, seed and stem bark extracts of *Picralima nitida*. In *African Journal of Biotechnology*, *African Journal of Biotechnology*, (Vol. 4) (No. 6) pp.522-526.
- Oleko W. (1997). *Etude de la rémanence du pouvoir pathogène des bactéries du genre Bacillus isolé à Kisangani (Haut-Zaïre) sur les larves de moustiques*. Thèse inédite, pp.1-13.
- Pauwels L. (1993). *Guide des arbres et arbustes de la région de Kinshasa- Brazzaville*, Jardin botanique national de Belgique, Meise, Mars.
- Thomas P. (1936). *Manuel de biochimie*, Masson et Cie, Paris-6^{ème}.
- Renier Matthieu R.P. (1948). Flore du Kwango, Tome 3, Bruxelles.
- Rogier C. (2004). Comment diagnostiquer les accès palustres. *Med. Trop.*, 64, pp.319-320.
- Santos J.R., et Fleurentin J. (1991). L'ethnopharmacologie : une approche pluridisciplinaire. DOS., in *Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs*, Paris - Metz, Eds ORSTOM et Société Française d'Ethnopharmacologie, pp.26-39.
- Taba K.M. et Kayembe S.J.(2003). *Etude comparative de l'activité antiplasmodiale de terpènes isolés des feuilles d'Ocimum gratissimum et de Cassia alata*.
- Fakeye,O.A. Itiola, A.O. Georgess, H.A. Odelela. (2004). Antibacterial property of *Picralima nitida* stem bark extract in cream formulations. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, Volume 42, Numbers 4-5, Numbers 4-5/June-July 2004, pp. 274-279(6).
- Verdrager Jacques. (2005). *L'OMS et le paludisme : mémoires d'un médecin spécialiste de la malaria*. - Ed. L'Harmattan, coll. « Acteurs de la science », Paris.

- Vigneron M.,Deparis X.,Deharo E.,Bourdy G. (2004). Knowledge Attitudes and Practices study applied to antimalarial remedies used in French Guiana. In *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98 (3), p. 351-360.
- Wilcox M.,Bodeker G.,Rasoanaivo P. (2004). Traditional medicinal plants and malaria (*Traditional herbal medicines for modern times*, V4 CRC Press
- Wongsrichanalai C., Wimonwattrawatee T., Sookto P. et Coll. (1999). *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to artesunate in Thailand. *Bull. WHO*; 77: pp.392-398.

WEBOGRAPHIE

- Aubry. 09/04/2005 /<http://medecin-tropicale.free.fr/cours/paludisme.htm>)
- http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_9fr.htm
- <http://www.paludismepasteur.fr/documentation>)
- <http://membres.lycos.fr/lfinot/maladie/palu1.html>)
- <http://www.who.int/medicentre/factsheets/fs094/fr>)
- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme>)
- <http://www.ac-orleans-tours.fr/svt/theme3/plasmo.htm>
- http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1fr.htm
- <http://www.ac-orleans-tours.fr/svt/theme3/plasmo.htm>
- <http://www.wikipedia.org/wiki/oligo%C3%A9/>

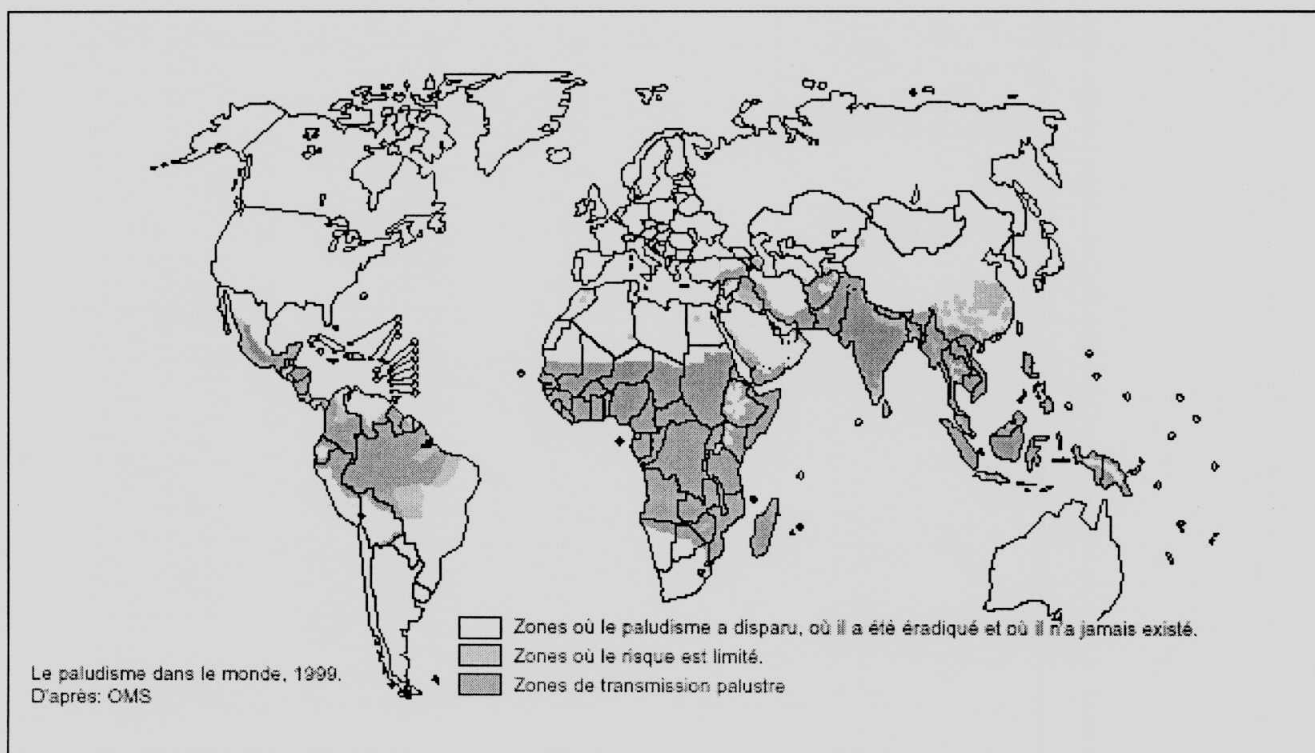
SOMMAIRE

Dédicace	
Remerciements	
I. INTRODUCTION	1
0.1. Problématique	1
0.2. Objectifs de la recherche.....	4
0.3. Hypothèse de recherche.....	5
0.4. Méthodologie de la recherches.....	5
0.5. Délimitation et intérêt du travail.....	6
0.6. Division du travail.....	8
CHAPITRE PREMIER : CONSIDERATIONS GENERALES	9
I.1. Définition des concepts.....	9
I.1.1. Les alcaloïdes.....	9
I.1.2. Les quassinoïdes.....	10
I.1.3. Les quinones.....	10
I.1.4. Les lavonoïdes.....	11
I.1.5. Les triterpènes et les sesquiterpènes.....	11
I.1.6. Les porphyrines.....	11
I.1.7. le paludisme.....	13
I.2. Généralités sur les principes actifs des plantes médicinales.....	17
I.2.1. Les saponines.....	17
1.2.2. Les stérols.....	19
I. 3. Les pygmées et leur environnement.....	19
1.4. Recherches antérieures	21
1.5. La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV-Visible.....	25
I.5.1. Fondement de la méthode.....	25

I.5.2.Principe de la méthode.....	25
CHAPITRE DEUXIEME : METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE.....	28
2.1. Matériel	28
2.1.1. Famille, genre, espèce, noms synonymes et vernaculaire.....	28
2.1.2. Description botanique et répartition géographique.....	28
2.1.3. Pharmacologie.....	29
2.2. Méthodes.....	30
2.2.1. Récolte et préparation des échantillon de raines pour analyse.....	30
2.2.2. Détermination de l'humidité dans la poudre.....	30
2.2.3. Identification et dosage de quelques ions.....	31
2.2.4. Extraction des lipides totaux.....	31
2.2.5. Protéines brutes totaux.....	38
2.2.6. Screening chimique.....	40
2.2.7. Analyse chromatographique du totum alcaloïdique de <i>Picralima nitida</i>	42
2.7.1. Chromatographie sur couche mince analytique (CCM ou TLC).....	42
2.7.2. Chromatographie préparative sur colonne.....	42
2.2.8.Etude de l'interaction des alcaloïde fractionnés avec la protohémine	45
2.2.8.1. Manipulation.....	45
2.2.8.2. Mode opératoire.....	46
CHAPITRE TROISIEME : RESULTATS ET DISCUSSION.....	48
3.1. : Détermination des taux d'humidité, des lipides bruts, des cendres brutes et protéines brutes.. ..	48
3.1.1. Détermination des taux d'humidité, des lipides, des cendres et protéines Bruts.....	48
3.1.2. Screening chimique	50
3.1.3. Teneur des minéraux dosés dans les cendres et substances toxiques.....	51
3.1.4. Taux d'alcaloïdes, des saponines, des sapogénines et des tanins.....	53

3.1.5. Valeurs de Rf des spots des alcaloïdes de <i>Picralima nitida</i>	54
3.1.6. Caractéristiques macrophysiques des alcaloïdes isolés.....	56
3.1.7. Discussion des résultats sur la composition phytochimique de <i>Picralima nitida</i>	56
3.2. Interaction des alcaloïdes fractionnés avec la protohème	59
3.2.1. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hème Et des alcaloïdes seuls.....	60
3.2.2. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hème en présence de l'alcaloïde A ₁	63
3.2.3. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hème en présence de l'alcaloïde A ₂	64
3.2.4. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hème en présence de l'alcaloïde A ₃	65
3.2.5. Analyse du spectre d'absorption UV-Visible de l'hème en présence de l'alcaloïde A ₄	66
3.2.6. Discussion des résultats.....	67
CONCLUSIONS ET SUGGESTIONS.....	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72
ANNEXES	

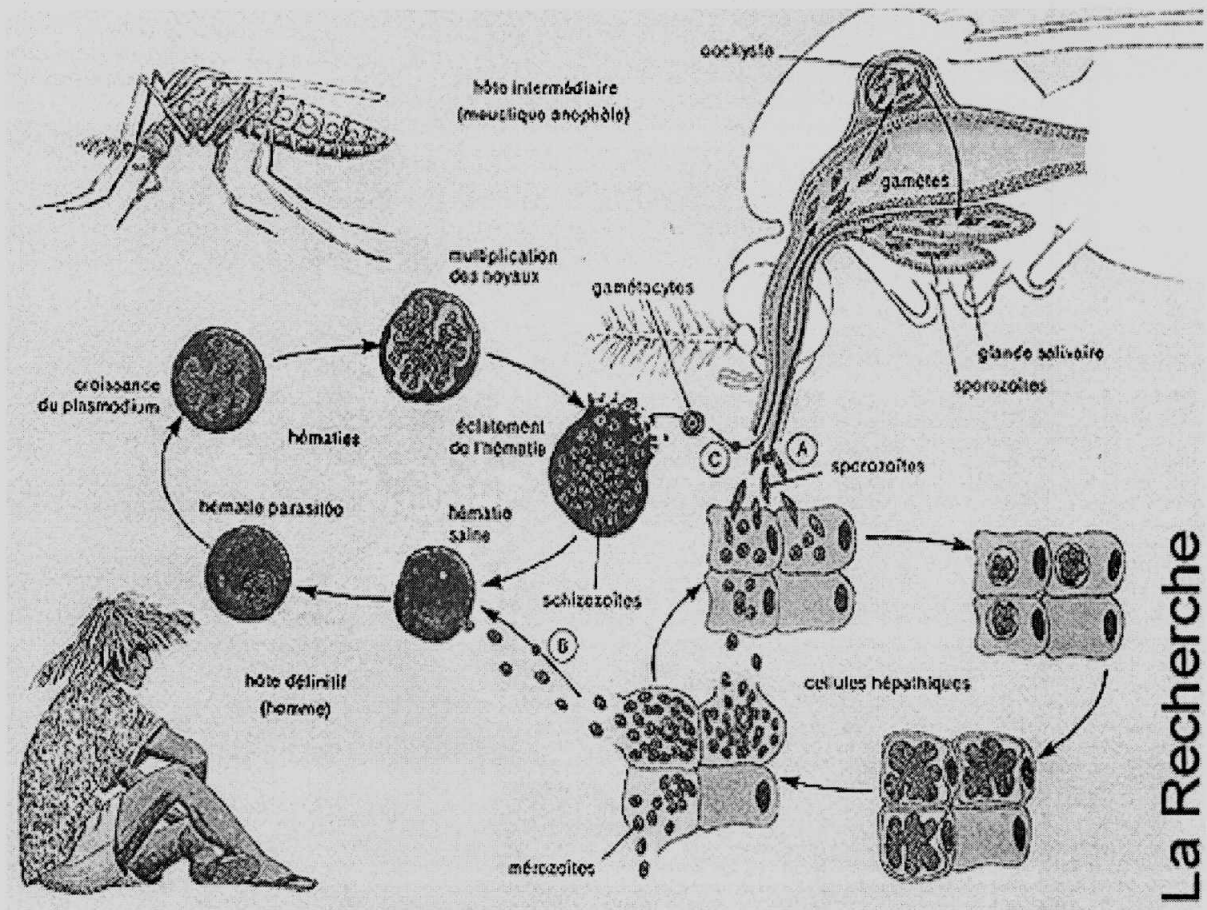
Annexe 1



Ci-dessus: Le paludisme dans le monde. Le paludisme est endémique dans les régions tropicales et subtropicales.

Fig. 7. Répartition géographique du paludisme dans le monde

Annexe 2



La Recherche

Fig. 8. Cycle de développement du Plasmodium, agent du paludisme.

Annexe 3

Tableau 7. Volumes et concentrations en solvant, hémimine et alcaloïde A₁

N° Echantillon	Volume en ml				Concentration (gr/ml)	
	Hémimine	Alcaloïde A ₁	Solvant	Total	Hémimine	Alcaloïde A ₁
1	2	1	2	5	$3,332.10^{-4}$	$1,238.10^{-3}$
2	2	2	1	5	$3,332.10^{-4}$	$2,447.10^{-3}$
3	2	3	0	5	$3,332.10^{-4}$	$3,716.10^{-3}$

Tableau 8. Volumes et concentrations en solvant, hémimine et alcaloïde A₂

N° Echantillon	Volume en ml				Concentration (gr/ml)	
	Hémimine	Alcaloïde A ₂	Solvant	Total	Hémimine	Alcaloïde A ₂
1	2	1	2	5	$3,332.10^{-4}$	$2,357.10^{-3}$
2	2	2	1	5	$3,332.10^{-4}$	$4,714.10^{-3}$
3	2	3	0	5	$3,332.10^{-4}$	$7,071.10^{-3}$

Annexe 4

Tableau 9. Volumes et concentrations en solvant, hémine et alcaloïde A₃

N° Echantillon	Volume en ml				Concentration (gr/ml)	
	Hémine	Alcaloïde A ₃	Solvant	Total	Hémine	Alcaloïde A ₃
1	2	1	2	5	$3,332.10^{-4}$	$1,107.10^{-3}$
2	2	2	1	5	$3,332.10^{-4}$	$2,217.10^{-3}$
3	2	3	0	5	$3,332.10^{-4}$	$3,321.10^{-3}$

Tableau 10 Volumes et concentrations en solvant, hémine et alcaloïde A₄

N° Echantillon	Volume en ml				Concentration (gr/ml)	
	Hémine	Alcaloïde A ₄	Solvant	Total	Hémine	Alcaloïde A ₄
1	2	1	2	5	$3,332.10^{-4}$	$3,226.10^{-3}$
2	2	2	1	5	$3,332.10^{-4}$	$6,452.10^{-3}$
3	2	3	0	5	$3,332.10^{-4}$	$9,679.10^{-3}$

Annexe 5

Tableau 11 : Valeurs de la densité optique et de la longueur d'onde maximale des alcaloïdes de *Picralima nitida* et de leur interaction avec l'hémine.

Echantillons	Concentrations en g/ml	Longueur d'onde en nm	D.O
Alcaloïde A ₁	0,6194.10 ⁻²	390	0,926
Alcaloïde A ₂	1,1786.10 ⁻²	390	0,977
Alcaloïde A ₃	0,5536.10 ⁻²	390	0,235
Alcaloïde A ₄	1,6132.10 ⁻²	400	1,028
Hémine- A ₁	1,238.10 ⁻³	400	0,359
	2,477.10 ⁻³	400	0,699
	3,716.10 ⁻³	400	0,875
Hémine- A ₂	2,357.10 ⁻³	390	0,866
	4,714.10 ⁻³	390	0,827
	7,071.10 ⁻³	390	0,291
Hémine- A ₃	1,107.10 ⁻³	390	0,825
	2,217.10 ⁻³	390	0,673
	3,321.10 ⁻³	390	0,365
Hémine- A ₄	3,226.10 ⁻³	400	0,98
	6,452.10 ⁻³	400	0,975
	9,679.10 ⁻³	400	0,97