

I.2.2.4.2 Détermination de la teneur en tanins

a) Précipitation par le réactif de STIASNY

➤ Principe

Les tanins hydrolysables précipitent à chaud par addition à l'extrait de réactif de STIASNY. En cas de présence de tanins hydrolysables, l'addition de chlorure ferrique à 2% (FeCl_3) sur le filtrat entraîne une coloration bleue noire.

➤ Mode opératoire

A 15 ml de l'extrait, on ajoute 8 ml de réactif de STIASNY. Après un chauffage de 30 minutes à ébullition au bain- marie, la précipitation montre la présence de tanins condensés. A 1 ml du filtrat saturé par l'acétate de sodium est ajouté quelques gouttes de la solution de chlorure ferrique à 2%. L'apparition de coloration bleue-noire indique la présence de tanins hydrolysables non précipités par le réactif de STIASNY.

b) Oxydation des tanins condensés

➤ Principe

Par chauffage en milieu chlorhydrique, les tanins condensés s'oxydent en phlobaphènes colorés en rouge.

➤ Mode opératoire

A 5 ml de l'extrait est ajouté 1ml d'acide chlorhydrique. Le tout est porté à ébullition. L'apparition d'une coloration rouge indique la formation de phlobaphènes.

I.2.2.4.3 Caractérisation des tanins

▪ **Dépôt**

- solution extractive: 20µl
- acide gallique: 20µl

▪ **Eluant**

Acétate d'éthyle, méthanol, eau (40-8-5)

▪ **Révélation**

Après examen sous lampe UV, la plaque est passée à l'étuve à 100-105°C pendant quelques minutes. Ensuite nous avons pulvérisé du réactif FeCl₃.

I.2.2.5 Recherche des hétérosides cardiotoniques

Les hétérosides cardiotoniques constituent des substances très homogènes par leur structure et par leur activité pharmacologiques. Sur le plan chimique, ce sont des O-hétérosides dont la génine est de nature stéroïdique.

➤ **Principe**

La caractérisation des hétérosides cardiotoniques est déterminée par action des dérivés nitrés en milieu alcalin sur l'extrait dégraissé.

Les réactifs sont :

- réactif de BALJET (acide picrique : trinitrophénol) qui donne une coloration rouge orangée stable ;
- réactif de KEDDE (acide dinitro 3-5 benzoïque) qui donne une coloration rouge pourpre stable ;
- réactif de RAYMOND MARTHOUD (dinitrobenzène) qui donne une coloration violette fugace.

➤ **Mode opératoire**

▪ **Dégraissage**

20 ml de l'extrait est mis en contact deux fois de suite avec 4ml d'éther de pétrole pendant 3 mn, nous avons laissé sécher à l'air libre.

▪ **Extraction**

Au résidu obtenu, nous avons ajouté 5 ml de mélange chloroforme /éthanol (4-1 v/v). Après macération pendant 1 heure, la solution est agitée de temps à autre avant d'être filtrée.

Le filtrat est réparti dans 3 tubes à essai. Dans chaque tube, nous avons versé respectivement :

- **tube 1:** 0,5 ml de réactif de BALJET
- **tube 2:** 0,5 ml de réactif de KEDDE
- **tube 3:** 0,5 ml de réactif de RAYMOND MARTHOUD.

Ensuite dans chaque tube, nous avons ajouté 2 gouttes de lessive de soude diluée au 1/5 dans l'alcool à 95°C. Après agitation, nous avons vérifié si le pH est bien alcalin.

Les colorations suivantes ont été observées :

- **tube 1:** la coloration rouge- orangée stable indique la présence d'hétéroside cardiotoniques;
- **tube 2:** la coloration rouge-pourpre indique la présence d'hétérosides cardiotoniques ;
- **tube 3:** la coloration violet- fugace montre la présence d'hétérosides cardiotoniques.

I.2.2.6 Recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées d'origine végétale. Ils présentent des réactions de précipitations avec les réactifs généraux des alcaloïdes.

I.2.2.6.1 Réactions de précipitation

➤ Principe

Les caractérisations générales des alcaloïdes sont des réactions de précipitation. En solution aqueuse acide (pH compris entre 1 et 2), les sels d'alcaloïdes donnent avec les complexes iodés des métaux lourds des précipités colorés caractéristiques.

Les réactifs utilisés sont :

- réactif de BOUCHARDAT (iodo-iodurée) qui donne un précipité brun ;
- réactif de DRAGENDORFF (iodo-bismuth de potassium) qui donne un précipité orange à rouge vermillon ;
- réactif de VALSER MAYER (iodo-mercure de potassium) qui donne un précipité blanc jaunâtre.

➤ Mode opératoire

L'extrait sec est acidifié par 10 ml d'acide sulfurique à 10%, nous avons laissé au repos pendant 30 mn puis filtrés sur papier. Après avoir vérifié que le Ph est compris entre 1-2, l'extrait acidifié est réparti dans trois tubes à essais. Ensuite, nous avons ajouté 2 à 3 gouttes de réactifs de :

- BOUCHARDAT dans le premier tube ;
- DRAGENDORFF dans le second tube ;
- VALSER MAYER dans le troisième.

Il est alors procédé à la recherche la formation des précipités.

I.2.2.6.2 Caractérisation spécifique: identification par CCM

a) Préparation de la solution extractive

Nous avons humecté 1 g de poudre de drogue avec quelques gouttes d'ammoniaque diluée au $\frac{1}{2}$. Après agitation avec 15 ml de chloroforme pendant 10 mn, nous avons filtré en recueillant la solution dans une capsule. Le chloroforme a été évaporé au bain-marie et le résidu repris par 0,5 ml de méthanol.

b) CCM

- Support: Kielselgel GF 254;
- Solvant : chloroforme, diéthylamine (22,5-2,5) ;
- Dépôt : solution extractive : 20 μ l

Cinchonine : 20 μ l

- Révélation :

Après examen sous lampe UV, la plaque est passée à l'étuve durant 10 mn afin d'éliminer totalement la diéthylamine. Nous avons pulvérisé le réactif de DRAGENDORFF convenablement dilué.

II. TOXICITE AIGUE

II.1 Matériels

II.1.1. Matériel animal

Nous avons disposé des rats de souches WISTAR dont le poids varie entre 120 et 190 g répartis en 4 lots de 3 rats. Les rats sont des femelles et ont été fournis par l'animalerie du laboratoire de toxicologie de la faculté de Médecine et de Pharmacie de l'UCAD.

II.1.2 Matériels de laboratoire

- Sonde de gavage ;
- Cages ;
- Gants ;
- Balance ;
- Marqueur ;
- Pots contenant du formol.

II.2 Méthodes

II.2.1 Principe

Il consiste en la détermination de la dose toxique qui tue 50 % des rats soumis à l'action du produit.

II.2.2 Etudes préliminaires

Elles consistent à déterminer les doses maximales qui entraînent 0 % de morts et les doses minimales qui entraînent 100 % de morts.

Nous avons utilisé la méthode par classe de toxicité aigue qui est une alternative développée pour remplacer la DL50. C'est une méthode séquentielle utilisant trois animaux de même sexe par étape (OCDE, 2001).

Ces essais préliminaires seront effectués par voie orale sur 4 lots de 3 rats femelles. Le premier lot est traité à 0,015 g /Kg et les trois autres lots sont traités à 1g/Kg ; 2g/Kg ; 5g/Kg. Nous avons commencé par la dose la plus forte qui est de 5g/Kg et la dose la plus faible qui est de 0,015g/Kg aux deux premiers lots et en fonction des résultats obtenus nous avons ensuite donné les autres doses.

II.2.3 Méthodologie

Les rats sont mis à jeun la veille du gavage à partir de 18 heures. Après administration, les animaux sont observés pour une durée de 15 jours.

C/ RESULTATS

I. RESULTATS DE L'ENQUETE

I.1 Description de la population étudiée

Les résultats de cette étude ont porté sur 101 malades souffrant de la maladie hémorroïdaire dont 60 hommes et 41 femmes d'origines diverses.

Le tableau I donne les données :

Tableau I : données globales de notre échantillon d'étude

Patients Types d'hémorroïdes	Hommes		Femmes		Total	
	Nombre	Taux	Nombre	Taux	Nombre	Taux
Hémorroïdes externes	11	10,9%	7	6,9%	18	17,8%
Hémorroïdes internes	4	4%	5	5%	9	9%
Hémorroïdes internes et externes	45	44,5%	29	28,7%	74	73,2%
Total	60	59,4%	41	40,6%	101	100%

Le cas associant les hémorroïdes externes et internes est beaucoup plus nombreux dans les deux sexes.

I.2 Répartition selon l'âge et le sexe

La répartition de la population étudiée selon leur âge et leur sexe est exprimée dans le tableau II :

Tableau II: Répartition de la population étudiée selon l'âge et le sexe

Sexes	Patient	Age moyen	Age minimum	Age maximum
Femmes	41	39	27	63
Hommes	60	47	32	65

La maladie hémorroïdaire est plus retrouvée chez les hommes d'après notre enquête.

L'âge moyen est plus élevé chez les hommes que chez les femmes de même que l'âge minimal et l'âge maximal mais il n'ya pas une grande différence.

32 ans est l'âge le plus retrouvé chez les femmes et 40 ans chez les hommes.

I.3 Etude analytique

I.3.1 Evaluation du taux de guérison total

Après notre enquête, nous avons procédé au calcul du taux de guérison total selon le nombre total de malades interrogés et les résultats obtenus sont inscrits dans le tableau III :

Tableau III: Evaluation du taux de guérison total

Patients	Guérison		Echec	
	Nombre	Taux	Nombre	Taux
101	69	68,3%	32	31,7%

I.3.2 Résultats selon le type d'hémorroïde

Nous avons évalué les taux de guérison selon le type d'hémorroïde, les résultats obtenus sont dans le tableau IV :

Tableau IV: Répartition du taux de guérison selon le type d'hémorroïde

Type d'hémorroïdes	Total	Guérison		Echec	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Internes	9	6	66,5%	3	33,5%
Externes	18	11	61%	7	39%
Internes, externes	74	52	70,2%	22	29,8%

I.3.3 Répartition du taux de guérison selon le sexe

Les taux de guérison selon le sexe ont été calculés et se trouvent dans le tableau V :

Tableau V: Répartition du taux de guérison selon le sexe

Résultats	Total	Guérison		Echec	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Hommes	60	38	63,3%	22	36,7%
Femmes	41	31	75,6%	10	24,4%

I.3.4 Résultats chez les hommes en fonction du type d'hémorroïde

Les taux de guérison chez les hommes en fonction du type d'hémorroïde sont dans le tableau VI :

Tableau VI: Répartition du taux de guérison chez les hommes en fonction du type d'hémorroïde

Résultats	Total	Guérison		Echec	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Externes	11	5	45,5%	6	54,5%
Internes	4	1	25%	3	75%
Internes, externes	45	32	71,1%	13	28 ,9%

Un seul cas de guérison a été noté pour les hémorroïdes internes chez les hommes.

I.3.5 Résultats chez les femmes en fonction du type d'hémorroïde

Les taux de guérison chez les femmes en fonction du type d'hémorroïde sont inscrits dans le tableau VII :

Tableau VII: Répartition du taux de guérison chez les femmes en fonction du type d'hémorroïde

Résultats	Total	Guérison		Echec	
		Nombre	Taux	Nombre	Taux
Externes	7	6	85,8%	1	14,2%
Internes	5	5	100%	0	0%
Internes, externes	29	20	69%	9	31%

Contrairement chez les hommes, nous n'avons pas eu des cas d'échec chez les femmes pour les hémorroïdes internes et pour les hémorroïdes externes nous avons eu qu'un seul cas d'échec.

II. RESULTATS DU CRIBLAGE CHIMIQUE

II.1 Rendement de l'extraction

Nous étions partis de 30 g de poudre et nous sommes retrouvés avec 6 g d'extrait sec.

$$\text{Notre rendement } R = \frac{6}{30} \times 100 = 20\%$$

II.2 Résultats de la caractérisation chimique de la recette

Les différents tests de caractérisation réalisés ont montré que :

L'extrait de la recette renferme des tanins, des flavonoïdes. Les alcaloïdes, les hétérosides anthracéniques et cardiotoniques n'ont pas été retrouvés.

Les résultats sont illustrés dans le tableau VIII et par les figures 10 et 11

Tableau VIII : Récapitulation des résultats du criblage chimique

Substances chimiques	Anthracènes	Flavonoïdes	Saponosides	Alcaloïdes	Tanins	Cardiotoniques
Résultats	-	+	-	-	+	-

- : absence ; + : présence

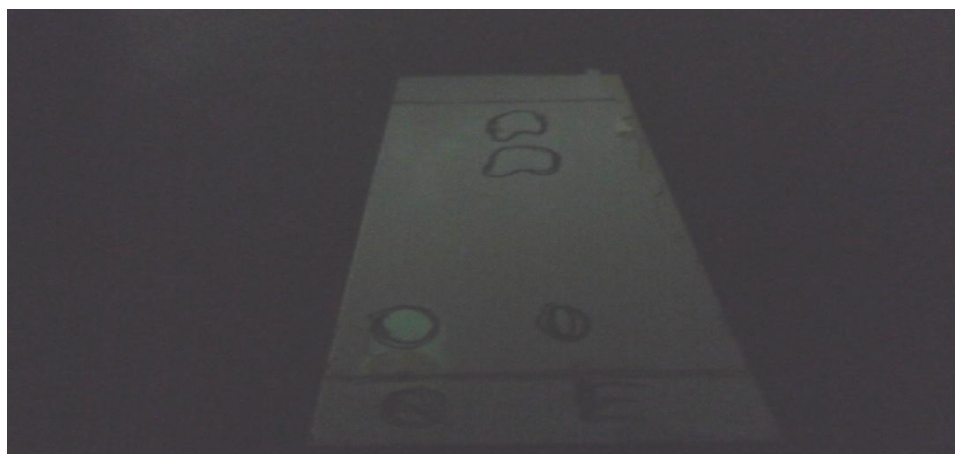


Figure 10: CCM des flavonoïdes

Les Rf sont dans le tableau IX :

Tableau IX: Résultats de la CCM des flavonoïdes

	Extrait	Quercétine
Rf des spots	0,92	0,15
Coloration	Jaune	Jaune

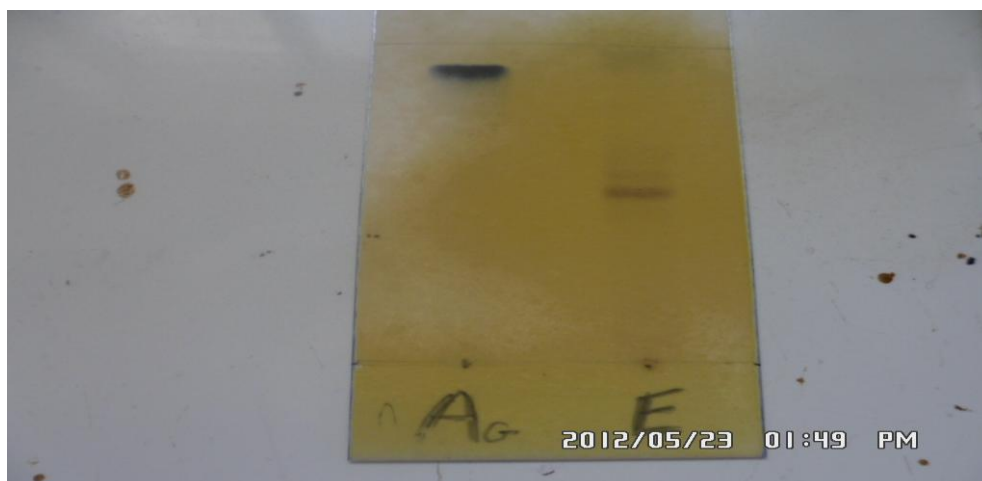


Figure 11: CCM des tanins

AG = acide gallique ; E = extrait

Les Rf sont dans le tableau X.

Tableau X: Résultats de la CCM des tanins

	Extrait	Acide gallique
Rf des spots	0,51	0,90
Coloration des spots	Brun	Brun-noir