

TABLE DES MATIERES

Remerciements	iii
Table des matières	1
Abréviations et sigles.....	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	99
Introduction générale.....	111
Chapitre 1 : Données bibliographiques.....	13
1. Données sur le paludisme en Côte d'Ivoire.....	144
1.1. Généralités sur le paludisme	144
1.2. Physiopathologie du paludisme	155
1.3. Traitements	155
1.3.1. Médicaments sur le marché.....	155
1.3.2. Médicaments traditionnels améliorés (MTA) et évaluation clinique.....	1818
1.4. Cas de la Côte d'Ivoire	18
1.4.1. Côte d'Ivoire : caractéristiques démographiques	1818
1.4.2. Côte d'Ivoire : caractéristiques floristiques.....	19
1.4.3. Prévalence du paludisme en Côte d'ivoire.....	200
1.4.4. Compréhension et prise en charge du paludisme par les tradipraticiens en Côte d'Ivoire	222
2. Médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire : état de la réglementation	244
2.1. Réglementation de la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire	244
2.1.1. Tradipraticiens et pratique de la médecine traditionnelle	244
2.1.2. Produits issus de la médecine traditionnelle	255
2.1.3. Procédures d'enregistrement des produits à base de plantes	27
2.2. Plantes médicinales et produits à base de plantes vendus en Côte d'Ivoire	300
2.2.1. Circuits d'approvisionnement, traitement du matériel végétal, stockage	30
2.2.2. Qualité des médicaments traditionnels	32
3. Plantes médicinales employées comme antipaludiques en Côte d'Ivoire.....	344
3.1. Introduction.....	344
3.2. Enquêtes ethnobotaniques relevées.....	344
4. Conclusion	47
Chapitre 2 : Travaux personnels : Enquêtes ethnobotaniques	48
1. Introduction : contexte de notre travail ethnobotanique.....	49
2. Enquête auprès des vendeuses du marché d'Adjamé (Abidjan).....	500
2.1 Plantes antipaludiques citées.....	500
2.2. Plantes antipaludiques citées : analyse des données	56
2.3. Remarques relatives aux recettes	59

2.4. Activités antiplasmodiales décrites dans la littérature pour les espèces recensées	61
3. Enquête relatives aux produits manufacturés	622
3.1 Produits antipaludiques collectés	633
3.1.1. Produits déclarés suite à l'appel du PNPMT	633
3.1.1.1. Présentation des produits déclarés suite à l'appel du PNPMT	63
3.1.2. Produits collectés dans le commerce.....	667
3.1.2.1. Obtention des produits	667
3.1.2.2. Caractéristiques des produits collectés dans le commerce	68
3.1.2.3. Produits collectés dans le commerce : composition au regard de la tradition.....	72
3.2. Activité antipaludique des produits manufacturés	74
4. Conclusion et perspectives des enquêtes ethnobotaniques.....	77
Chapitre 3 : Travaux personnels – Etude de remèdes à base du fruit de <i>Picralima nitida</i>	800
Introduction.....	81
1. Données bibliographiques relatives à <i>Picralima nitida</i>	82
1.1. Présentation de l'espèce, botanique.....	82
1.2. Emplois	83
1.2.1. Emplois médicinaux.....	83
1.2.2. Emplois non médicinaux	83
1.2.3. Production et commerce international.....	83
1.3. Composition chimique.....	84
1.4. Activités biologiques.....	91
1.4.1. Activités diverses.....	91
1.4.2. Activités antiparasitaires, dont activité antiplasmodiale	92
1.4.3. Données toxicologiques publiées.....	95
2. Etude micrographique du fruit	96
3. Déréplication d'un extrait du fruit de <i>Picralima nitida</i>	1077
3.1. Introduction, méthodologie	1077
3.2. Déréplication de l'extrait L1-1T	109
3.2.1. Données obtenues par analyse en réseau moléculaire	109
3.2.2. Conclusion : composition alcaloïdique de l'extrait L1-1T	1133
4. Analyse comparatives de lots du fruit de <i>Picralima nitida</i>	1144
4.1. Lots de fruit employés	1144
4.2. Comparaison des extraits aqueux de pulpe	11616
4.2.1 Comparaison chromatographique des extraits aqueux	11616
4.2.2 Etude de la variabilité chimique : confirmation par analyse métabolomique.....	1200
4.2.3. Profil alcaloïdique en fonction du degré de maturité du fruit	1244
4.2.3.1. Analyse comparative des extraits de pulpe de fruits mûrs de <i>Picralima nitida</i> obtenus par décoction.....	1244

4.2.3.2. Analyse métabolomique.....	1255
4.2.4. Comparaison avec les péricarpes et les graines.....	12727
4.2.4.1. Profil UHPLC-MS/MS des péricarpes.....	12929
4.2.4.2. Profil UHPLC-MS/MS des graines	1311
4.2.4.3. Ions différenciants	1322
4.2.5. Dosage des alcaloïdes totaux des pulpes.....	1344
4.2.6. Dosage des alcaloïdes majoritaires des pulpes.....	1355
4.2.6.1. Témoins employés.....	1355
4.2.6.2. Paramètres et validation du dosage.....	13636
4.2.6.3. Résultats du dosage.....	13838
5. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des fruits de <i>Picralima nitida</i>	14646
5.1. Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>	14646
5.2. Activité antiplasmodiale <i>in vivo</i>	1499
6. Etude de <i>Picralima nitida</i> : Conclusions et perspectives.....	1511
Conclusion générale.....	1544
Matériel et méthodes.....	156
Matériel et méthodes du Chapitre 2 : Ethnobotanique.....	156
1. Enquête au marché d'Adjame.....	156
2. Collecte et identification des plantes	156
3. Collecte et identification des plantes	156
4. Traitement du matériel végétal	156
5. Réalisation des extraits de recettes, produits	156
Matériel et méthodes du Chapitre 3 : Etude du fruit de <i>Picralima nitida</i>	15757
1. Matériel	157
2. Matériel végétal, lots de fruits	157
3. Extractions	158
4. Analyse chromatographiques CLHP-UV-MS/MS	1622
5. Analyse chromatographiques UHPLC-UV-MS/MS	1633
6. Réseaux moléculaires	1633
7. Etude métabolomique sur les extraits de fruits.....	1644
8. Dosage d'alcaloïdes individuels par CLHP-UV	16565
9. Purification d'alcaloïdes de <i>Picralima nitida</i>	16666
9.1. Extraction.....	166
9.2. Fractionnement et isolement.....	166
9.3. Fractionnement de l'extrait alcaloïdique total de pulpe de fruit de <i>P. nitida</i>	166
10. Produits obtenus :	1721

11. Test d'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i>	175
11.1. Souches W2, ND6	175
11.2. Souche Fcb1.....	175
12. Test d'activité antiplasmodiale <i>in vivo</i>	176
Références bibliographiques	178
Annexes	1922
Annexe 1 : Modalités d'enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments, Côte d'Ivoire (DPML, 2010)	1933
Annexe 2 : Modalités de déclaration des unités artisanales de fabrication de produits de santé, Côte d'Ivoire (DPML, 2010).....	196
Annexe 3 : Modalités d'enregistrement des produits de santé issus des unités artisanales de fabrication, Côte d'Ivoire (DPML, 2010).....	198
Annexe 4 : Formulaire de demande d'une autorisation de commercialisation (AC), Côte d'Ivoire (DPML, 2010).....	2000
Annexe 5 : Recommandations de l'OMS sur les bonnes pratiques relatives aux plantes médicinales (OMS, 2002).....	2022
Annexe 6 : Activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> rapportées pour les plantes relevées lors de l'enquête sur le marché d'Adjamé	2044
Annexe 7 : Travaux personnels : planches d'herbier	206
Annexe 8 : Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS/MS pour les décoctés de pulpe, de péricarpes et de graines des différents lots de <i>P. nitida</i>	20707
A. Pulpes	2077
B. Péricarpes.....	21111
C. Graines	21414
Annexe 9 :	
Communications réalisées au cours de la thèse	2299
Résumé / Abstract	2311

Abréviations et sigles

« ACT » : *Artemisinin Combined Therapy*

AFC : Association française des professionnels de la cueillette de plantes sauvages

AIRP : Autorité Ivoirienne de Régulation Pharmaceutique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CBD : Convention sur la Biodiversité

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI : Côte d'Ivoire

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

CLHP : Chromatographie Liquide Haute-Performance

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CTA : Combinaison thérapeutique à base de dérivés de l'Artémisinine

DAD : DéTECTeur à barrette de diodes (*Diode Array Detector*)

DER : Ratio drogue / extrait (*extract drug ratio*)

DGCCRF : Direction Générale du Commerce, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes

DL₅₀ : dose létale 50 % (dose causant la mort de 50 % des animaux dans une cohorte expérimentale)

DNP : *Dictionary of Natural Products*

DPML : Direction de la pharmacie, du médicament et des laboratoires d'analyse médicale

EC : Energie de collision

EIC : *Extracted Ion Chromatogram* (chromatogrammes d'ions extraits)

EMA : *European Medicines Agency* (Agence européenne du médicament)

ESI : Electrospray ionization

FAO : *Food and Agriculture Organization*

GACP : *Guideline on Good Agricultural and Collection Practice*

GNPS : *Global Natural Products Social Network*

HMPC : *Herbal Medicinal Products Committee*

HR : Haute résolution

IM : Intra musculaire

IV : Intra veineux

LOD : *Limit of Detection* (limite de détection)

LOQ : *Limit of Quantification* (limite de quantification)

MIADB : *Monoterpene Indole Alkaloids Data Base*

MN : *Molecular Networking*

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

MS : *Mass Spectrometry* (Spécrométrie de Masse)

MTA : Médicament traditionnel amélioré

ND : Non déterminé

OMS : Organisation mondiale de la santé

OOAS : Organisation ouest africaine de la santé

PCA : Analyse en Composantes Principales (*Principal Component Analysis*)

Pharm. Eur. : Pharmacopée européenne

PNLP : Programme national de lutte contre le paludisme

PNPMT : Programme national de promotion de la médecine traditionnelle

PVC : *Polyvinyl chloride* (Polychlorure de vinyle)

Q : Quadrupole

QC : *Quality Control* (contrôle qualité)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SYNADIET : Syndicat National des Compléments Alimentaires

TCM : *Traditional and Complementary Medicine* (Médecine Traditionnelle et Complémentaire)

TIC : *Total Ion Count* (Chromatogramme ionique Total)

ToF : *Time-of-Flight* (temps de vol)

Tr : temps de rétention

UEMOA : Union des états monétaires d'Afrique de l'Ouest

IUCN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

UFC : unités formant colonies

UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra-Haute-Performance

UV : ultraviolet

WHO : *World Health Organization* (OMS)

Liste des figures

Figure 1 : Régions du monde où le paludisme est endémique	14
Figure 2 : Cycle parasitaire du <i>Plasmodium</i> (source : CDC, 2020).....	15
Figure 3 : Principaux principes actifs antipaludiques employés en clinique	17
Figure 4 : Carte démographique de la Côte d'Ivoire (54)	19
Figure 5 : Epidémiologie du paludisme en Côte d'Ivoire : admissions à l'hôpital et décès, d'après le World Malaria Report 2018 de l'OMS.....	21
Figure 6 : Prévalence du paludisme en Côte d'Ivoire (EPPA-CI) 2016.....	21
Figure 7 : Lieux de consultation de tradipraticiens en Côte d'Ivoire.....	26
Figure 8 : Proportions de contaminants dans des MTA enregistrés (poudres et liquides).....	33
Figure 9 : Zones des enquêtes ethnobotaniques publiées relevées état d'emplois de plantes comme antipaludiques.....	37
Figure 10 : Pyramide sanitaire de Côte d'Ivoire	49
Figure 11 : Marché de plantes médicinales d'Adjamé	51
Figure 12 : Espèces recensées au marché d'Adjamé : convergence avec la littérature.....	58
Figure 13 : Origine des médicaments traditionnels manufacturés reçus suite à l'appel du PNPMT	63
Figure 14 : Médicaments traditionnels manufacturés reçus à la suite de l'appel du PNPMT	64
Figure 15 : Médicaments traditionnels manufacturés achetés dans le commerce	68
Figure 16 : Espèces constitutives des produits manufacturés du commerce : convergence avec la littérature	73
Figure 17 : Activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> des MTA collectés par le PNPMT : résumé, en % pour 21 produits	77
Figure 18 : <i>Picralima nitida</i>	82
Figure 19 : Chromatogrammes CLHP-UV (254 et 280 nm) et MS (TIC) de l'extrait L1-1T de pulpe de <i>P. nitida</i>	108
Figure 20 : Réseau moléculaire obtenu pour l'extrait L1-1T	110
Figure 21 : Structure de composés de la MIADB ayant donné des matches dans l'analyse par réseau moléculaire ou diastéréoisomères potentiellement présents.....	113
Figure 22 : Chromatogramme CLHP-UV-(MS/MS) des extraits traditionnels (extraits T).....	117
Figure 23 : Chromatogramme CLHP-UV-(MS/MS) des extraits par macération de pulpe à froid (extraits AF)	118
Figure 24 : Chromatogrammes comparés des extraits traditionnels (extraits T) et obtenus par macération de pulpe à froid (extraits AF)	119
Figure 25 : Illustration des 2 profils-types des extraits aqueux obtenus à partir des différents lots de fruit de <i>P. nitida</i> (détail des chromatogrammes à $\lambda = 254$ nm.....	120
Figure 26 : Analyse PCA sur les extraits traditionnels (extraits T) et obtenus par macération de pulpe à froid (extraits AF).....	121
Figure 27 : Analyse PCA sur les extraits aqueux (T traditionnels ; AF macération) : PCA biplot sur PC1, PC2 (nuages de points projetés).....	122
Figure 28 : Heatmap générée par l'analyse PCA pour les extraits aqueux (T traditionnels ; AF macération)	123
Figure 29 : Récapitulatif des chromatogrammes UV à $\lambda = 254$ et 280 nm de l'analyse UHPLC-UV-MS/MS des décoctés de fruits de <i>P. nitida</i> (différents stades de maturité)	124
Figure 30 : Analyse PCA sur les décoctés de pulpe et ions principaux du PCA biplot sur PC1, PC2....	126
Figure 31 : Analyse PCA sur les décoctés de pulpe : Loading plots PC1 / PC2	126
Figure 32 : Analyse des décoctés de pulpe : dendrogramme.....	127
Figure 33 : Analyse PCA sur les extraits de pulpe, de péricarpes et de graines.....	128

Figure 34 : Analyse PCA sur les extraits de pulpe, de péricarpes et de graines : biplot.....	129
Figure 35 : Chromatogrammes-types d'extraits du péricarpe de <i>P. nitida</i> , $\lambda = 280$ nm	130
Figure 36 : Chromatogrammes-types d'extraits de graines de <i>P. nitida</i> , $\lambda = 280$ nm	131
Figure 37 : Heatmap - extraits de pulpes, péricarpes et graines.....	133
Figure 38 : Estimation de la teneur en alcaloïdes totaux, en % m/m de pulpe (poids frais)	134
Figure 39 : Activité antiplasmodiale des extraits aqueux de <i>P. nitida</i> <i>in vitro</i> (% d'inhibition de croissance, <i>P. falciparum</i> Fcb1).....	147
Figure 40 : Activité antiplasmodiale des extraits alcaloïdiques de <i>P. nitida</i> <i>in vitro</i> (% d'inhibition de croissance à 10 µg/mL et en rouge :: IC_{50} (µg/mL) (<i>P. falciparum</i> Fcb1)).....	148
Figure 41 : Evaluation pilote <i>in vivo</i> d'extraits de pulpe et de péricarpe de <i>P. nitida</i> chez la Souris infectée par <i>P. berghei</i>	150
Figure 42 : Mode de préparation de l'extrait traditionnel de pulpe de <i>P. nitida</i>	158
Figure 43 : Schéma d'obtention des alcaloïdes totaux	162
Figure 44 : Schéma d'obtention et de fractionnement de l'extrait alcaloïdique (rappel : les extraits aqueux sont rassemblés).....	167
Figure 45 : Schéma de fractionnement de la fraction F5	167
Figure 46 : Schéma de fractionnement de la fraction F6	168
Figure 47 : Schéma de fractionnement de la fraction F12	168
Figure 48 : Schéma de fractionnement de l'extrait L4EC	169
Figure 49 : Schéma de fractionnement de l'extrait PNG.....	169
Figure 50 : Planche d'herbier de <i>P. nitida</i> , fruit mûr frais [réalisation et photographie : A. Akoubet].	96
Figure 51 : Section longitudinale de fruit mûr de <i>P. nitida</i> ; en bas : graine	97
Figure 52 : Péricarpe séché (a) et graines (b) de <i>P. nitida</i>	97
Figure 53 : Coupe transversale du fruit : fragment d'épicarpe (x 40)	98
Figure 54 : Coupe transversale du fruit : parenchyme mésocarpien (a), sclérenchyme (b), poche sécrétrice (c) (x 40)	99
Figure 55 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Fibres sclérifiées en paquets (a); Faisceaux conducteurs : vaisseaux de bois (b) (x 40)	100
Figure 56 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Parenchyme lacuneux et sclérite (a) ; Cristaux d'oxalate, canaux sécrétateurs et cellules sclérifiées allongées (b) (x 40)	101
Figure 57 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Cellule scléreuse et parenchyme (a) ; sclérites, fibres sclérifiées et cristaux d'oxalates (b) (x 40)	102
Figure 58 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Sclérites (a) ; cristaux d'oxalate (b). (x 40).....	103
Figure 59 : Coupe transversale de graine : fragments de tégument (x 100).....	104
Figure 60 : Analyse microscopique de l'extrait aqueux du fruit (x 40).....	104
Figure 61 : Analyse microscopique de la pulpe du fruit (x 40)	105
Figure 62 : Analyse microscopique de la pulpe du fruit (x 40)	106
Figure 63 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits mûrs (extraits LX-APC)	208
Figure 64 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits immatures (extraits LX-BPC)	209
Figure 65 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CPC)	210
Figure 66 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits mûrs (extraits LX-AEC).....	211
Figure 67 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits immatures (extraits LX-BEC).....	212
Figure 68 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CEC)	213
Figure 69 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits mûrs (extraits LX-AGC)	214
Figure 70 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits immatures (extraits LX-BGC)	215
Figure 71 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CGC)	216

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stratégie thérapeutique de l'OMS pour la prise en charge du paludisme	16
Tableau 2 : Eléments constitutifs du dossier de demande de visa d'enregistrement en Côte d'Ivoire	28
Tableau 3 : Synthèse des données ethnopharmacologiques ivoiriennes relatives au paludisme, relevées dans la littérature récente : plantes citées	38
Tableau 4 : Nombre de citation des familles et espèces relevées par la littérature dans le traitement traditionnel du paludisme en Côte d'Ivoire	45
Tableau 5 : Estimation de la valeur marchande des plantes utilisées contre le paludisme.....	46
Tableau 6 : Résultats de l'enquête sur les recettes antipaludiques au marché de plantes médicinales d'Adjamé	52
Tableau 7 : convergences des citations observées dans l'enquête	56
Tableau 8 : Nombre de citations des espèces dans les recettes recensées.....	60
Tableau 9 : Posologies des médicaments traditionnels manufacturés reçus suite à l'appel du PNPMT	65
Tableau 10 : Conditionnement et informations figurant sur les emballages des médicaments traditionnels manufacturés reçus à la suite de l'appel du PNPMT	66
Tableau 11 : Compositions et posologies des médicaments traditionnels manufacturés du commerce	69
Tableau 12 : Conditionnement et informations figurant sur les emballages des médicaments traditionnels manufacturés du commerce.....	71
Tableau 13 : Activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> des MTA collectés par le PNPMT.....	75
Tableau 14 : Alcaloïdes isolés de Picralima nitida	85
<i>Tableau 15 : Activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> d'extraits de P. nitida.....</i>	93
Tableau 16 : Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> d'alcaloïdes de <i>P. nitida</i>	94
Tableau 17 : DéréPLICATION des alcaloïdes de l'extrait de pulpe de <i>P. nitida</i> (extrait L1-1T).....	111
Tableau 18 : Echantillons de fruits de <i>P. nitida</i> : origines et dates d'obtention	115
Tableau 19 : Alcaloïdes majoritaires dans les décoctés de pulpe de <i>P. nitida</i> en UHPLC-MS/MS.....	125
Tableau 20 : Alcaloïdes majoritaires dans les décoctés de péricarpe de <i>P. nitida</i> en UHPLC-MS/MS	130
Tableau 21 : Alcaloïdes détectés dans les décoctés de graines de <i>P. nitida</i> en UHPLC-MS/MS	131
Tableau 22 : Paramètres du dosage	137
Tableau 23 : Dosage d'alcaloïdes majoritaires dans des extraits traditionnels et par macération de la pulpe de <i>P. nitida</i>	139
Tableau 24 : Dosage d'alcaloïdes majoritaires dans des extraits traditionnels et par macération de la pulpe de <i>P. nitida</i> : analyse pour l'ensemble des lots	145
Tableau 25 : Activité antiplasmodiale des extraits aqueux et alcaloïdiques de <i>P. nitida</i> <i>in vitro</i> (inhibition de croissance, <i>P. falciparum</i> Fcb1).....	146
Tableau 26 : Activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> des alcaloïdes isolés à partir de <i>P. nitida</i> (%) d'inhibition de croissance, <i>P. falciparum</i> Fcb1).....	148
Tableau 27 : Evaluation pilote <i>in vivo</i> d'extraits de pulpe et de péricarpe de <i>P. nitida</i> chez la Souris infectée par <i>P. berghei</i> : parasitémie (%)	150
Tableau 28 : Pertes à la dessiccation moyennes des différentes parties du fruit utilisées.....	158
Tableau 29 : Rendements d'extraction : pulpes du fruit de <i>P. nitida</i>	159
Tableau 30 : Rendements d'extraction : graines et péricarpes de <i>P. nitida</i> (décoctions).....	161
Tableau 31 : Bilan des composés isolés ou en cours d'isolement.....	170

Tableau 34 : Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C du composé 14 (MeOD ; 300MHz) (cf annexes 9)	173
.....
Tableau 35 : Attribution des signaux RMN ^1H et ^{13}C du composé 17 (MeOD ; 300Mz) (cf annexes 9).	174
.....

Introduction générale

Dans ses recommandations relatives à la médecine traditionnelle (TCM : *Traditional and Complementary Medicine*) publiées sous la forme du rapport « *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023* », l'OMS (OMS, 2013) propose 3 grands objectifs à atteindre pour ses Etats-membres au regard de la médecine traditionnelle avec :

- la mise en place d'une politique nationale active et appropriée ;
- le renforcement de l'assurance qualité, de la sécurité, du bon usage et de l'efficacité en régulant les produits, les pratiques et les praticiens ;
- la promotion d'une couverture sanitaire universelle par intégration dans le système de santé.

De nombreux pays se sont inscrits dans cette démarche visant à promouvoir les pharmacopées locales avec un accent particulier mis sur la qualité des produits qui en sont issus et sur le développement d'un système réglementaire. Ainsi, dans son rapport de 2019 sur les médecines traditionnelles et complémentaires, l'OMS relève 109 pays dotés d'une réglementation en 2018 contre 45 en 1999, et rapporte un progrès très net pour la région Afrique, avec 39 pays sur 47 (OMS, 2019). Cependant, il semble que seul un nombre restreint de pays se reposent fortement sur leur médecine traditionnelle a réussi à formaliser ce secteur d'activité à travers une réglementation suffisamment claire et applicable et via une démarche adaptée d'évaluation et de contrôle de la qualité, de l'efficacité et de la sécurité de produits de santé manufacturés, voire des simples chaînes de valeur des plantes médicinales. Il en ressort que sur de nombreux marchés nationaux, notamment en Afrique, on retrouve des produits de santé fabriqués en série ne répondant à aucun cahier des charges garantissant la sécurité du consommateur. En Côte d'Ivoire, si une réglementation est mise en place depuis quelques années, on constate une moindre adhésion des acteurs du secteur (voir plus loin). Le manque de structures dédiées à l'accompagnement des fabricants amène ceux-ci à proposer des produits non contrôlés, mal conditionnés et non documentés à la population.

Ce travail, focalisé sur la prise en charge traditionnelle du paludisme, s'inscrit dans cette démarche, et vise à contribuer à la mise en place d'un dispositif national adapté. Il a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre l'université Félix Houphouët-Boigny à Abidjan (Côte d'Ivoire ; UFR pharmacie, laboratoire de pharmacognosie) et l'université Paris-Saclay (France ; UFR pharmacie, CNRS UMR 8076 BioCIS, équipe « chimie des substances naturelles »), avec le concours d'autres laboratoires et instances, dont le Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT) de Côte d'Ivoire.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante :

Un chapitre introductif, bibliographique, présentera brièvement le paludisme, la réglementation relative à la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire et fera le bilan des plantes employées pour la prise en charge de cette pathologie dans ce pays.

La suite du manuscrit sera consacrée aux travaux expérimentaux réalisés.

Le chapitre 2 s'intéresse à la tradition médicale et à sa valorisation, par une démarche ethnobotanique appliquée :

- Aux conseils pouvant être conférés par des vendeuses de plantes ;
- Aux produits de santé à base de plantes susceptibles d'être dûment enregistrés par les autorités sanitaires ivoiriennes, avec une contribution aux travaux du PNPMT ;
- Aux produits manufacturés déjà commercialisés.

Dans cette partie, on retrouvera essentiellement une analyse des pratiques, qui sera confrontée aux données de la littérature.

Le chapitre 3 est consacré à l'étude chimique et biologique du fruit d'une plante employée de manière convergente pour la prise en charge du paludisme : l'espèce *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand et H. Durand, Apocynaceae à alcaloïdes indolomonoterpéniques. Des données chimiques qualitatives (déréplication, métabolomique) et quantitatives, mais également des données d'évaluation biologique ont été obtenues. L'objectif est d'évaluer le bien fondé de son emploi et de contribuer à la connaissance de sa variabilité chimique, pré-requis à l'établissement de recommandations voire du développement d'un médicament traditionnel amélioré.

CHAPITRE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Données sur le paludisme en Côte d'Ivoire

1.1. Généralités sur le paludisme

Le paludisme, du latin *paludis* (marais), aussi appelé malaria, terme utilisé par les anglophones (de l'italien « *mal'aria* », c'est à dire mauvais air), est une érythrocytopathie due à cinq espèces de protistes du genre *Plasmodium* (*Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*) et transmise par la piqûre d'un vecteur : un anophèle femelle (plusieurs espèces du genre *Anopheles*) (OMS, 2020). L'infection par *Plasmodium falciparum* est potentiellement mortelle sans traitement.

Cette pathologie sévit dans certaines régions préférentielles dans le monde où elle est endémique (87 pays en 2019). Des phénomènes inquiétants de résistance des parasites aux chimiothérapies existent, y compris pour les molécules les plus récemment mises sur le marché.

L'OMS a dénombré 229 millions de cas de paludisme dans le monde en 2019 contre 239 millions en 2010. 94 % de ces cas sont enregistrés en Afrique. Malgré une régression de la maladie, son objectif visant à baisser de 40 % l'incidence et la mortalité en 2020, par rapport aux taux de 2015, n'a pu être atteint (OMS, 2018 ; OMS, 2020).

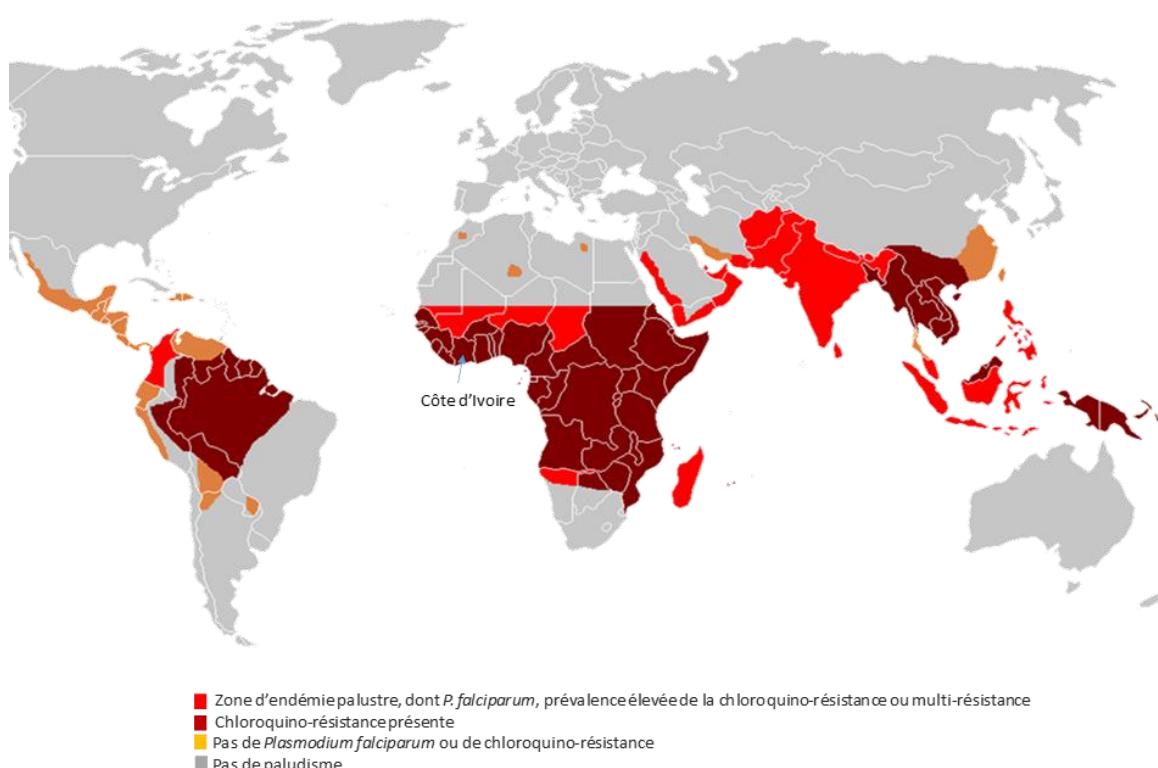


Figure 1 : Régions du monde où le paludisme est endémique

Source : adapté de OMS, 2018.

1.2. Physiopathologie du paludisme

La maladie est caractérisée par le cycle évolutif du *Plasmodium*, subdivisé en une étape chez l'anophèle femelle (phase sporogonique) et deux étapes chez l'homme (phase exo-érythrocytaire et phase érythrocytaire) (figure 2). Cette dernière étape permet la maturation et la multiplication des trophozoïtes à l'intérieur des globules rouges qui finissent par éclater. La destruction massive des globules rouges est à l'origine des signes caractéristiques de la crise de paludisme : anémie, asthénie, fièvre, frissons. Des complications sont possibles, notamment neurologiques, rénales ou pulmonaires. (Académie nationale de pharmacie, 2021 ; CDC, 2020).

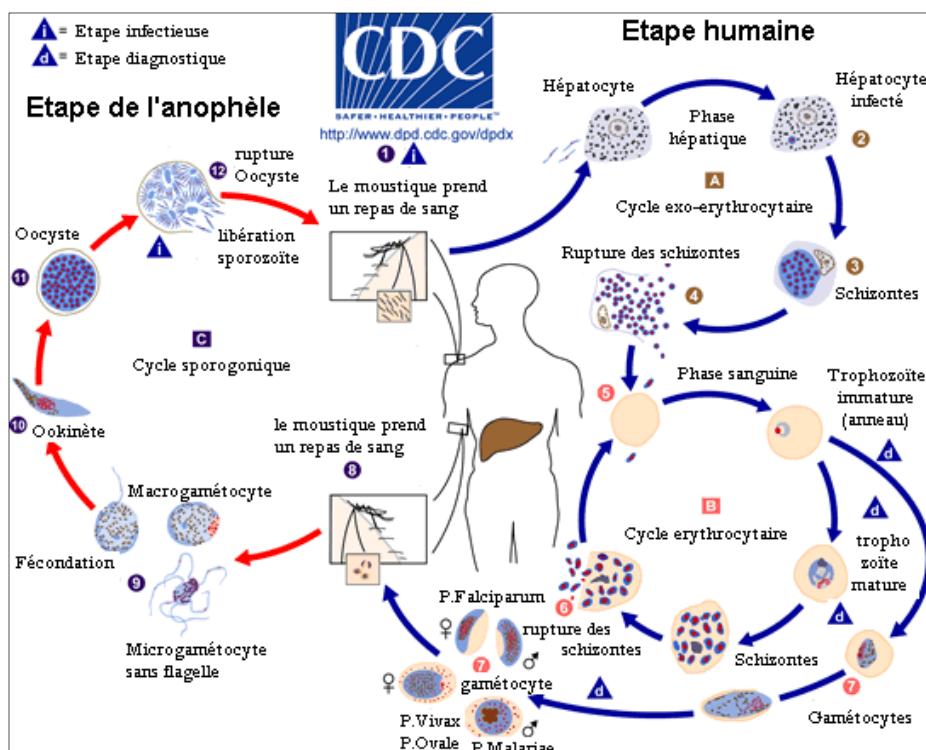


Figure 2 : Cycle parasitaire du *Plasmodium* (source : CDC, 2020)

1.3. Traitements

1.3.1. Médicaments sur le marché

En dépit de l'ancienneté de l'endémie palustre, le traitement du paludisme se heurte encore aujourd'hui au nombre limité de molécules antipaludiques disponibles et efficaces. En effet, depuis la découverte des vertus antipaludiques de l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis* L., Rubiaceae, en Amérique latine) puis la purification de la quinine au 19^e siècle, de celles d'*Artemisia annua* L., (Asteraceae employée en médecine traditionnelle chinoise) et la purification de l'artémisinine (Normile, 2015) à la fin du 20^e siècle (Prix Nobel de médecine attribué à Youyou Tu en 2015), le nombre de molécules antipaludiques mises sur le marché par les firmes pharmaceutiques reste faible (OMS, 2020 ; Newman, 2020).

Les molécules actuellement employées en prophylaxie ou de manière curative sont d'origine naturelles (quinine, totum alcaloïdique du quinquina, artémisinine en Chine), hémisynthétiques (dérivés de l'artémisinine) ou synthétiques (chloroquine, luméfantrine, principalement). Elles ciblent principalement l'hème. La stratégie recommandée aujourd'hui par l'OMS pour un traitement rapide et efficace de cette maladie est basée sur une bithérapie à base d'Artéméther / Luméfantrine (combinaisons thérapeutiques à base d'un dérivé de l'Artémisinine ; « ACT » : Artemisinin Combined Therapy) (OMS, 2015). En 2017 la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) rapportait que les *Plasmodium* résistent à la plupart des antipaludiques utilisés en prévention ou en traitement, avec des cas pour des dérivés de l'artémisinine (SPILF, 2017 ; Noedl, 2008).

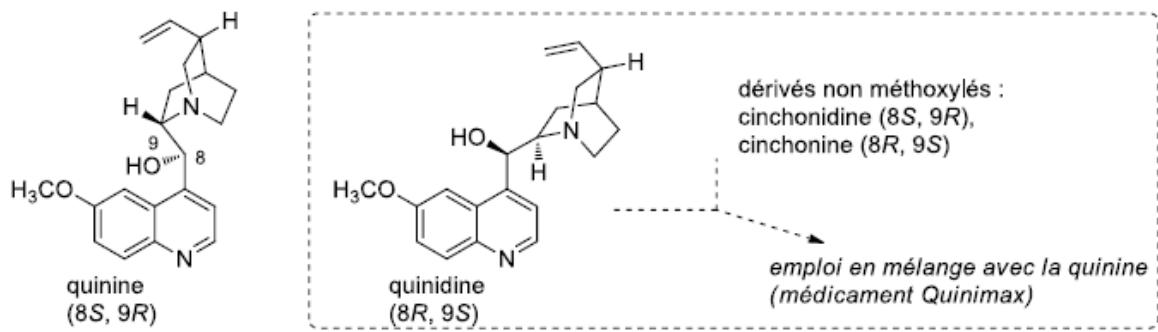
La lutte contre la pathologie est également axée sur la lutte antivectorielle et la protection par des moustiquaires imprégnées d'insecticides.

Tableau 1 : Stratégie thérapeutique de l'OMS pour la prise en charge du paludisme

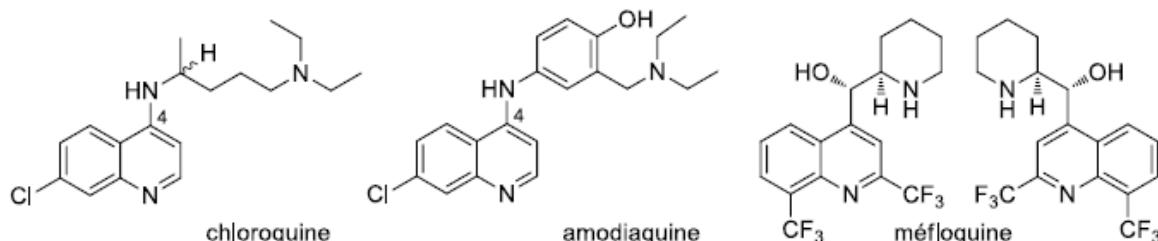
	Molécules	Durée du traitement
Paludisme non compliqué à <i>P. falciparum</i>	Artéméther + Luméfantrine,	3 jours : enfants, adultes (sauf les femmes enceintes au premier trimestre de grossesse)
Paludisme non compliqué à <i>P. falciparum</i> chez les sujets à risque (femmes enceintes au premier trimestre de grossesse)	Quinine + Clindamycine	7 jours
Paludisme sévère	Artésunate en IV ou IM ou Artéméther	au moins 24 heures
	relai par voie orale avec une combinaison à base de dérivés d'artémisinine	3 jours

(Source : OMS, 2015)

alcaloïdes des quinquinas



4-amino-quinoléines



8-amino-quinoléines

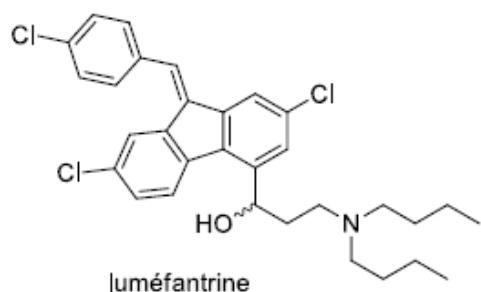
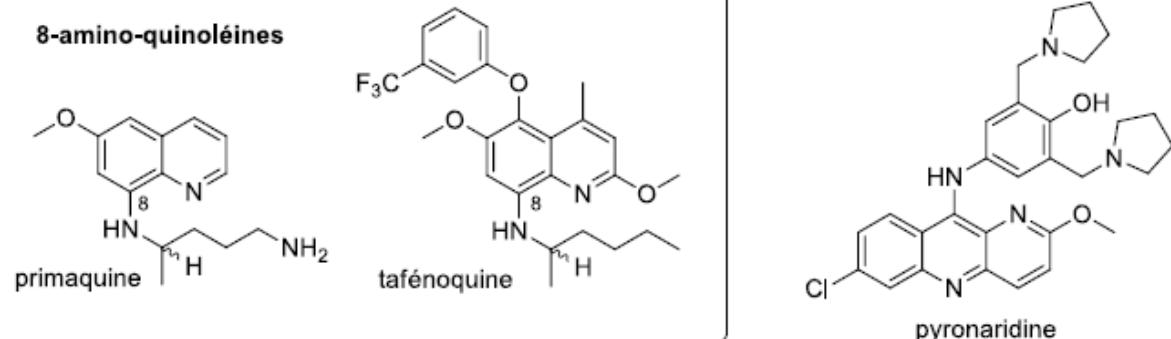


Figure 3 : Principaux principes actifs antipaludiques employés en clinique

Les approches vaccinales existent, notamment le vaccin RTS,S/AS01 pour lequel des données cliniques de phase III sont disponibles. Elles montrent un intérêt potentiel en termes de diminution de mortalité et de réduction d'incidence mais n'offre malheureusement pas de perspectives d'éradication de la maladie (Arora, 2021). Elles ne seront pas discutées ici (OMS, 2021).

1.3.2. Médicaments traditionnels améliorés (MTA) et évaluation clinique

Dans plusieurs pays d'Afrique sub-saharienne, des médicaments traditionnels améliorés (MTA ; définis par l'OMS ; voir plus loin), contenant des plantes ou des extraits de plantes sont enregistrés par les autorités sanitaires pour le traitement du paludisme non compliqué. Le degré de standardisation de tels produits est variable. Les données précliniques relatives à leur sécurité et les données cliniques attestant de leur efficacité sont généralement peu nombreuses. Dans des revues assez récentes, Merlin Willcox a relevé la commercialisation, en Afrique et en Chine, de MTA pour lesquels quelques données cliniques encourageantes existent (Willcox, 2011). Il s'agissait de produits contenant une ou plusieurs plantes. Un produit fabriqué en Chine contenant de la poudre de parties aériennes d'*Artemisia annua* L. (Asteraceae), a montré une diminution de la parasitémie de 70 à 100 % chez 379 patients, en 5 à 7 jours de l'infusé (5 -9 g de feuilles sèches /1 L d'eau / 250 mL trois fois par jour) ; un extrait d'écorce de *Cinchona calisaya* Wedd. (synonyme *Cinchona ledgeriana* (Howard) Bern. Moens ex Trimen, Rubiaceae) dosé à 1,2 g / j a montré une diminution de 92 à 100 % de la parasitémie chez 586 patients; une infusion de poudre de racines de *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr. (Apocynaceae) a montré une diminution de la parasitémie de 100 % chez 58 patients au Ghana; une infusion de poudre de racines de *Cochlospermum planchonii* Hook. F. ex Planch. (Bixaceae) a montré une diminution de la parasitémie de 52 % chez 46 patients au Burkina Faso. Si les données cliniques sont peu nombreuses et de faible méthodologie, les enjeux de leur obtention, combinés à des données relatives à la qualité des produits testés, sont essentiels pour une couverture sanitaire sans perte de chances de populations défavorisées. On notera que certains auteurs proposent des approches d'évaluation s'éloignant des paradigmes usuels (études rétrospectives, considération croisée d'études cas-contrôle) (Simoes-Pires, 2014). On remarquera également une polémique relative à l'emploi et à l'évaluation d'une armoise dépourvue (ou pauvre en) artémisinine : une étude clinique randomisée qui pouvait apparaître comme majeure, évaluant des tisanes d'*Artemisia afra* Jacq. ex Willd. (et / ou *A. annua*) versus l'association amodiaquine-luméfantrine, menée en République Démocratique du Congo chez presque 1000 individus (Munyangi, 2019). Cette étude qui rapportait de meilleurs résultats obtenus pour le traitement à base de l'une ou l'autre des deux espèces d'*Artemisia*, à savoir une meilleure activité antipaludique, une diminution plus rapide de la fièvre, une meilleure réponse pédiatrique et moins d'effets secondaires, a fait l'objet d'une rétractation pour défauts méthodologiques et éthiques (Munyangi, 2020).

1.4. Cas de la Côte d'Ivoire

1.4.1. Côte d'Ivoire : caractéristiques démographiques

La Côte d'Ivoire est un pays francophone d'Afrique de l'Ouest. Elle a pour capitale administrative Yamoussoukro et pour capitale économique Abidjan. Pour une superficie de 322462 km², elle compte 24 294 750 habitants (estimation pour 2017 ; 51,6 % d'hommes, 48,4 % de femmes). La population, à environ 57 % rurale, comptait 42,5 % de moins de 15 ans en 2015. L'espérance de vie était de 60,5 ans chez les hommes et 62,9 ans chez les femmes en 2019. La mortalité infantile est encore importante (58,6 / 1000 naissances à l'âge de 1 an, 79,3 / 1000 à 5 ans) (OMS, 2021). Le PIB (produit intérieur brut) était de 2 276,3 \$ US par habitant en 2019. Les indicateurs économiques et l'espérance de vie sont en nette augmentation depuis les années 2000 (Banque mondiale, 2021).

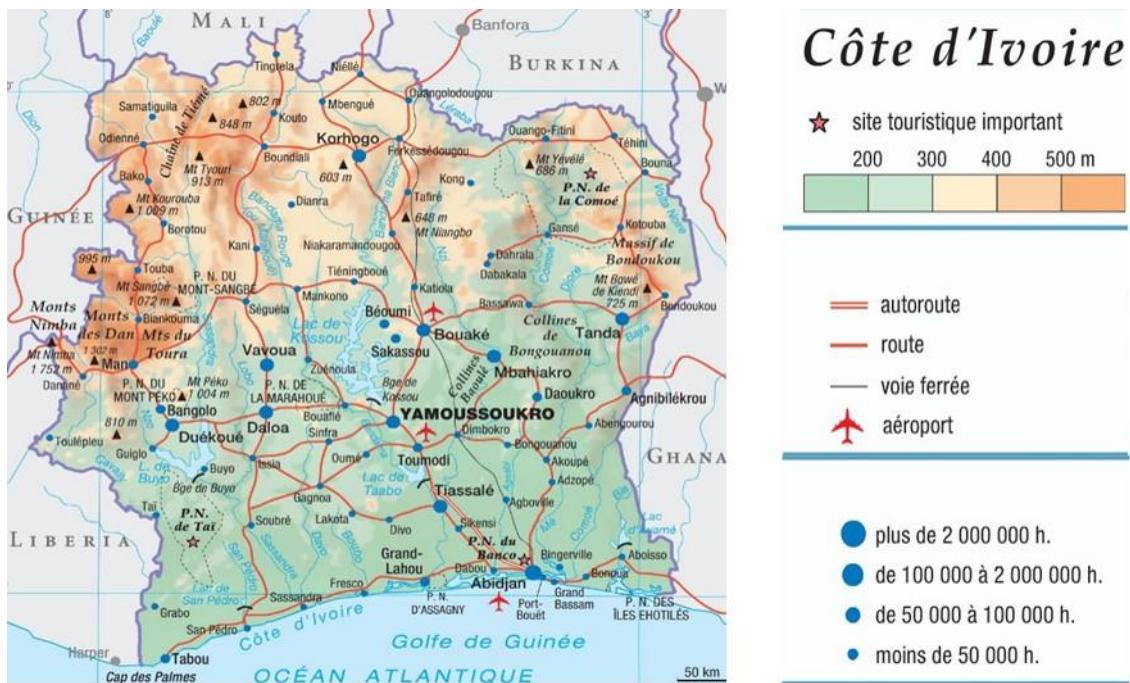


Figure 4 : Carte démographique de la Côte d'Ivoire (Encyclopédie Larousse, site internet consulté le 26/09/2019)

1.4.2. Côte d'Ivoire : caractéristiques floristiques

La flore du pays est diversifiée. Tropicale, elle est caractéristique des savanes arborées ou boisées, des forêts claires et des forêts denses (pour un patrimoine forestier de 6 millions d'hectares en 2007). Elle a fait l'objet de mises au point anciennes (par exemple : thèses de Laurent Aké Assi, 1961, 1982) (Aké Assi, 1961 ; Aké Assi, 1984). Le « 5^e rapport national sur la diversité biologique » de République de Côte d'Ivoire (mars 2014) (République de Côte d'Ivoire, 2014) indique les chiffres suivant :

- Plus de **3790 espèces végétales recensées** (Lichens : nombre d'espèces indéterminé, Bryophytes : 55, Ptéridophytes : 201 ; Gymnospermes : 17 et Angiospermes : 3.517),
- dont 64 endémiques ivoiriennes, 470 endémiques ouest-africaines.

Certaines de ces espèces sont exploitées : d'après ce rapport, on dénombre :

- « 120 taxons alimentaires de cueillette,
- 66 essences forestières exploitées à des fins commerciales,
- 147 taxons de plantes ornementales,
- 367 espèces servant dans divers autres domaines d'activités traditionnelles,
- **Plus de 1500 espèces végétales utilisées à des fins médicinales** » (soit plus de 39 % des espèces recensées),
- « 800 pour tous les autres usages confondus ».

Certaines espèces sont menacées, notamment par leur exploitation à des fins médicinales (y compris des espèces réputées rares) (Anoma, 1989).

Une interrogation du site de l'*International Union for the Conservation of Nature* pour le périmètre de la Côte d'Ivoire indique que, sur 193 espèces végétales dont le statut de conservation a été investigué, 170 sont sans risque grave identifié (« *least concern* »), 3 sont vulnérables, 5 sont à risque (« *endangered* »), 1 à un stade critique, pour 12 sans données (recherche le 24 mai 2021) (IUCN, 2021). Il est probable que beaucoup plus soient en régression ou en danger, notamment en raison de leur surexploitation.

Les plantes médicinales sont principalement récoltées à l'état sauvage : ainsi le « 5^e rapport sur la biodiversité nationale » indique que les producteurs de plantes médicinales constituent un « nouveau corps de métiers » et mentionne dans ses objectifs : « *D'ici à 2020, un système de gestion durable des plantes médicinales et d'autres usages est en vigueur (Objectif 15)* ».¹ Cet objectif est incorporé dans les Stratégie Nationale de la Diversité Biologique (2002), Programme Cadre de Gestion des Forêts (2003), Programme Cadre de Gestion des Aires protégées (1998), Programme de recherche sur la pharmacopée traditionnelle.

Parmi les objectifs spécifiques de ce rapport, on retrouve la connaissance de la situation des taxons concernés, « *en particulier celles utilisées pour les maladies courantes et celles en usage pour plusieurs pathologies* » ; et le fait que, à terme, « *Les plantes indigènes à valeur d'usage et commerciales [soient] cultivées* ».

1.4.3. Prévalence du paludisme en Côte d'ivoire

A l'instar de plusieurs autres pays dans le monde et en Afrique, la Côte d'Ivoire est touchée par l'endémie palustre, qui demeure un problème de santé publique majeur sur le continent et dans ce pays. L'ensemble de la population est à fort risque. Le paludisme constitue ainsi 33 % des motifs des consultations médicales en Côte d'Ivoire. Selon le ministère de la santé et de l'hygiène publique, la lutte contre le paludisme « *est devenue une priorité nationale depuis 2012* » si bien que « *le gouvernement a consenti beaucoup d'efforts* » (PNLP, 2019). La distribution de moustiquaires imprégnées y est gratuite. Des traitements préventifs sont mis en place chez la femme enceinte (OMS, 2020). Cependant, le nombre de cas y a augmenté de 15,8 % entre 2015 et 2018 : la prévalence est actuellement de 300 pour 1000 et plus de 5,895 millions de cas ont été enregistrés en 2019. Ils sont quasiment tous associés à *Plasmodium falciparum*. Malgré la disponibilité relative des médicaments, les autorités sanitaires ne cessent de déplorer un nombre important de décès : au moins 3222 en 2017 (PNLP, 2019) ; 0,416 décès pour 1000 habitants en 2018, d'après l'OMS – soit un nombre théorique d'environ 10.000, pour 3300 décès effectivement relevés par cette agence au cours de cette année (OMS, 2020).

¹ Ce rapport indique également que : « *D'ici à 2020, les connaissances, innovations et pratiques traditionnelles des communautés autochtones et locales qui présentent un intérêt pour la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, ainsi que leur utilisation coutumière durable, sont respectées, sous réserve des dispositions de la législation nationale et des obligations internationales en vigueur, et sont pleinement intégrées et prises en compte dans le cadre de l'application de la Convention, avec la participation entière et effective des communautés autochtones et locales, à tous les niveaux pertinents* ».

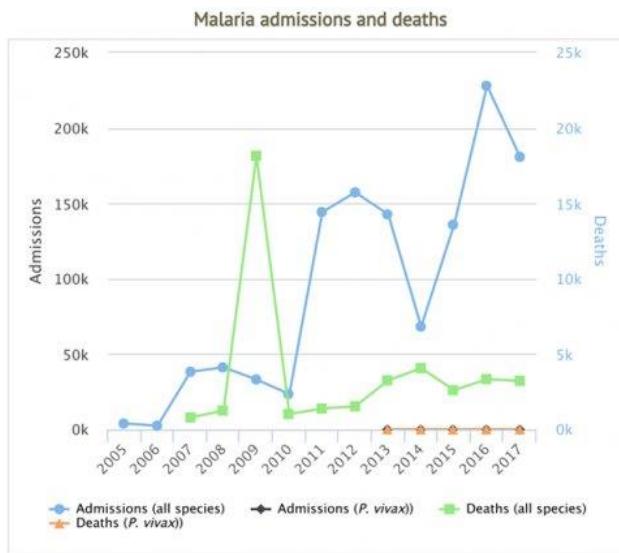


Figure 5 : Epidémiologie du paludisme en Côte d'Ivoire : admissions à l'hôpital et décès, d'après le World Malaria Report 2018 de l'OMS

Source : World Malaria Report 2018 (OMS, 2018)

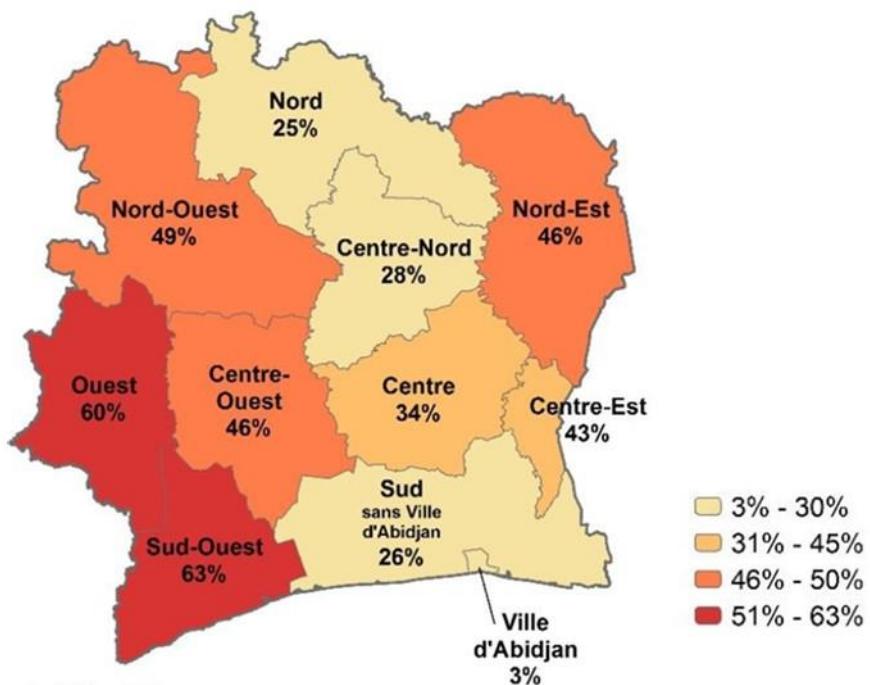


Figure 6 : Prévalence du paludisme en Côte d'Ivoire (EPPA-CI) 2016

Source : INS, Côte d'Ivoire (INS, 2016)

La population ivoirienne a largement recours à la médecine traditionnelle pour la prise en charge de la maladie. Il n'existe pas de données chiffrées claires. L'évaluation du rapport bénéfice / risque de cette pratique est important, en termes de santé publique. En milieu urbain, plusieurs offres thérapeutiques existent : le recours aux tradithérapeutes qui sont susceptibles de fournir les remèdes traditionnels ; l'achat direct de plantes médicinales sur des marchés, les commerçants étant susceptibles de donner des conseils ; le recours à des produits à base de plantes manufacturés, distribués dans des circuits divers. Nous nous intéresserons à ces différentes approches.

1.4.4. Compréhension et prise en charge du paludisme par les tradipraticiens en Côte d'Ivoire

Hérités d'un passé ancestral, la médecine traditionnelle et les produits qui en découlent sont portées par des promoteurs pour la plupart dépositaires de ces savoirs. Ces personnes exerçant la médecine traditionnelle sont qualifiées de « tradipraticiens de santé », définis par l'OMS comme suit : « *Toute personne reconnue par la communauté dans laquelle elle vit, comme compétente pour diagnostiquer des maladies et invalidités y prévalant, dispenser des soins de santé en utilisant des méthodes et des produits traditionnels d'origine végétale, animale ou minérale* » (OMS, 2000). Ces praticiens ont acquis leurs connaissances et leurs savoir-faire à travers l'observation, la révélation spirituelle, l'expérience personnelle, la formation et l'information auprès de leurs prédécesseurs. Bon nombre parmi eux ont un niveau de scolarisation primaire, voir nul. Ceci occasionne un questionnement sur leur perception et compréhension du paludisme, ainsi que sur la prise en charge qui en découle.

Cette problématique a fait l'objet d'une étude spécifique auprès des tradipraticiens ivoiriens, qui mérite d'être détaillée ici : menée en 2011 par Diaby B. et al., elle visait à évaluer les niveaux de connaissance sur le paludisme et les pratiques mises en œuvre (Diaby, 2011). Elle s'est déroulée dans la ville d'Abidjan auprès des tradipraticiens de santé reconnus et recensés par le Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT), possédant un cabinet et traitant le paludisme. L'enquête a porté sur trois paramètres : les caractéristiques socio-démographiques des tradipraticiens, les connaissances sur le paludisme et les pratiques thérapeutiques :

- ❖ Concernant les caractéristiques sociodémographiques des tradipraticiens (60 inclus dans l'étude, dont 10 % de femmes) : l'âge moyen des participants était de 44 ans (27 ans à 62 ans). La tranche d'âge de 36 à 45 ans était la plus représentée (68,3 %), suivie de la tranche 56 à 65 ans (13,4 %). La moyenne d'ancienneté dans l'exercice de cette profession était de 15 ans avec un minimum à 1 an et un maximum à 40 ans. 66,7 % des tradipraticiens de santé enquêtés sont des phytothérapeutes et 25 % des naturothérapeutes ; 8,3 % étaient des spiritualistes.
- ❖ Concernant les connaissances sur le paludisme, les auteurs ont évalué les facteurs de survenue du paludisme perçus par les praticiens, ainsi que les signes leur permettant de diagnostiquer la pathologie. Les étiologies les plus citées par les tradipraticiens de santé étaient la piqûre de moustique (16,7 %), la nourriture (1,7 %), le soleil (1,7 %) et la fatigue (1,7 %). 25 % des tradithérapeutes ont associé la maladie à la fois aux moustiques, au soleil et la fatigue. Les symptomatologies les plus citées étaient la fièvre (100 %), les urines foncées (86 %), la coloration jaune ou pâle des conjonctives (80 %), les vomissements (71,7 %), les nausées (58,3 %) et les douleurs abdominales (48,3 %). Il est intéressant de noter que les praticiens faisaient allusion à différentes formes de manifestation du paludisme. Ils en distinguaient trois : la « forme blanche » qui correspondait au paludisme simple, « la forme jaune/rouge » qui référait à une complication d'ictère et la « forme noire » qui correspondait au paludisme grave.
- ❖ Concernant les pratiques thérapeutiques :
 - Les tradipraticiens enquêtés recevaient les malades impaludés aussi bien en première intention (58,3 %) qu'en deuxième intention (41,7 %) après automédication.
 - 78,3 % d'entre eux pratiquaient un interrogatoire et un examen physique de leurs malades avant de poser le diagnostic.

L'interrogatoire était basé sur la recherche de signes (fièvre, céphalées, courbatures, nausées, vomissements, douleurs abdominales, insomnie, etc.). L'interrogatoire était suivi d'un examen physique (palpation de différentes parties du corps, examen des conjonctives, des paumes des mains ou de la plante des pieds, à la recherche d'une pâleur (« blanc »), l'observation de la coloration rouge ou foncée des urines, et de l'état de conscience avec les notions de cris nocturnes ou de délire).

- Dans 13,3 % des cas ils faisaient une consultation divinatoire.

- ❖ La prise en charge médicamenteuse était dans 95 % des cas à base de plantes et les différentes recettes étaient à base d'écorces, de feuilles et de racines (dont les espèces n'ont pas été précisées). La durée du traitement variait entre 7 et 14 jours pour les cas simples et 14 -37 jours pour les cas graves. Le principal signe de guérison était l'absence de fièvre (58,3 %). 90 % des tradipraticiens de santé enquêtés redirigeaient les cas de paludisme grave vers les structures modernes de santé. 68,3 % des tradipraticiens enquêtés pratiquaient une prophylaxie du paludisme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans (le type de prophylaxie n'a pas été précisé).

Les auteurs ont conclu que la description des tableaux cliniques du paludisme par les tradipraticiens de santé n'est pas très éloignée de celle de la médecine moderne (Diaby, 2011).

Cette enquête nous montre que malgré son caractère non scientifique voire parfois archaïque, la médecine traditionnelle a tout de même des bases de connaissances établies lui permettant de faire face à l'infection palustre. Il existe néanmoins des risques liés au caractère de gravité de la pathologie : fort heureusement ces praticiens ont le bon réflexe d'orienter les cas graves vers des structures modernes pour une prise en charge plus spécifique.

2. Médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire : état de la réglementation

2.1. Réglementation de la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire

Dans son *Rapport sur les médecines traditionnelles et complémentaires dans le monde de 2019*, l'OMS estime que la part de la population ivoirienne ayant recours à de telles approches est de 80 à 99 %. L'agence estime à 20.000 le nombre de tradipraticiens dans le pays – dont 7000 phytothérapeutes, 12000 naturothérapeutes et étonnamment 3500 praticiens revendiquant la pratique de la médecine chinoise. L'agence indique la mise en place d'une politique nationale spécifique en 2007, avec le « *Document Cadre de Politique Nationale en Matière de Médecine Traditionnelle et de Pharmacopée Africaine* », matérialisée par deux textes législatifs fondateurs (OMS, 2019).

2.1.1. Tradipraticiens et pratique de la médecine traditionnelle

L'organisation de la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire est la mission du Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT), établie par l'Arrêté N°409 du 28/12/2001 (République de Côte d'Ivoire, 2001), portant création, organisation et fonctionnement dudit programme. Ce programme a pour objectif d'assurer un bon exercice de la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire :

- améliorer la couverture des besoins sanitaires par l'utilisation effective des médicaments traditionnels ;
- élaborer une stratégie de promotion des médicaments traditionnels et coordonner des activités de recherche ;
- promouvoir la production de ces médicaments.

Ses domaines d'activité peuvent être résumées par les « 8 DAP » :

- Domaine du renforcement institutionnel ;
- Domaine de la réglementation
- Domaine du système d'information et de gestion
- Domaine de la formation
- Domaine de la communication
- Domaine du suivi et de l'évaluation
- Domaine de la recherche
- Domaine du partenariat et de la mobilisation des ressources.

Ce n'est qu'en 2015 que la Côte d'Ivoire s'est dotée de son premier texte de loi (Loi N°2015-536 du 20 Juillet 2015, relative à l'exercice et à l'organisation de la médecine traditionnelle et de la pharmacopée traditionnelles) (République de Côte d'Ivoire, 2015). Cette loi décrit les types de thérapeutes (accoucheuses traditionnelles, naturothérapeutes², phytothérapeutes, psychothérapeutes, herboristes, médico-droguistes³).

² Ils mettent l'accent sur l'hygiène et le régime alimentaire.

³ Ils connaissent et vendent des substances médicinales d'origine végétale, animale et minérale.

Les spiritualistes (qui font appel à des prières et à des pratiques métaphysiques) n'ont pas été retenus. La loi stipule qu'une autorisation d'exercice doit être obtenue. Celle-ci, délivrée par le Ministère de la Santé, est relative à un nombre donné de pathologies qui peuvent être soignées par le praticien en fonction de ses compétences. La loi indique également quels sont les lieux d'exercice reconnus : centres de consultation et de soins traditionnels, herboristeries.

Un décret (Décret N°2016-24 du 27 Janvier 2016 relatif au code d'éthique et déontologie des praticiens de médecine et de la pharmacopée traditionnelle) (République de Côte d'Ivoire, 2016) a été établi pour fixer des bases éthiques à la pratique de la médecine traditionnelle.

2.1.2. Produits issus de la médecine traditionnelle

Outre son objectif de promotion et d'encadrement de la médecine traditionnelle, la loi N°2015-536 était destinée à inciter les fabricants de médicaments à base de plantes à réaliser les analyses nécessaires à la reconnaissance scientifique de leurs produits. Le texte ne fournit pas de détails spécifiques à ce propos. Il stipule cependant qu'un médicament traditionnel, délivré dans une herboristerie ou en pharmacie, doit être conditionné et étiqueté (nom du médicament, nom scientifique des plantes, indication, nom des autres constituants, mode d'emploi, posologie, méthode de conservation, date de péremption, effets indésirables, contre-indications). La reconnaissance d'indications données, la démonstration d'un usage traditionnel, l'évaluation de l'efficacité ou du risque ne font pas l'objet de précision : ce cadre réglementaire reste à construire.

Ce médicament traditionnel, tel que défini par la loi N°2015-536, est fabriqué dans des unités de production agréées. Les exploitations à échelle industrielle ne peuvent concerner que des plantes de culture conformément au code forestier et au code de l'environnement. La procédure d'enregistrement des produits à base de plantes ne figure pas dans cette loi. Une réglementation « grise » existe cependant : elle est présentée en partie 2.1.3. et en annexe.

Il fait l'objet d'un enregistrement et de l'obtention d'une autorisation de commercialisation, tous deux délivrés par la Direction de la pharmacie, du médicament et des laboratoires d'analyses médicales (DPML), devenue récemment Agence Ivoirienne de Réglementation Pharmaceutique (AIRP). Le souci de reconnaissance de leur art et de leurs médicaments pousse les tradipraticiens à se tourner de plus de plus vers les instituts de recherche spécialisés pour remplir les conditions définies par cette agence. Dans cette dynamique, les autorités, représentées par le ministère de la santé et par la DPML (AIRP), poursuivent la réflexion sur la mise en place d'un processus de réglementation, plus précis que les éléments de la loi N°2015-536 du 20 Juillet 2015. Elle prend en compte la définition donnée par l'OMS – notamment par la région Afrique de l'Ouest – aux médicaments traditionnels améliorés (MTA) : 4 catégories sont définies. Ces catégories, reprises en Côte d'Ivoire, sont explicitées plus loin.

Pour une définition légale et réglementaire claire de ces médicaments issus de la médecine traditionnelle, l'apport d'autres systèmes législatifs peut être considéré. Le Dr A. Amari a montré dans une analyse publiée en 2008 que certaines dispositions de la directive européenne 2004/24/CE définissant les médicaments traditionnels à base de plantes dans l'espace européen pouvaient être adaptés à la médecine traditionnelle africaine. Le caractère dérogatoire à une autorisation de mise sur le marché usuel , prenant en compte le caractère traditionnel des produits sans pour autant occulter l'innocuité et la sécurité pour le consommateur, sont en effet des préoccupations partagées par les systèmes de santé africains.

Ce modèle législatif pourrait-être un point de départ pour la réglementation des médicaments issus des pharmacopées traditionnelles africaines (Amari, 2008 ; Amari, 2009) . Cette réflexion doit porter également sur la validation scientifique des performances des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle ainsi que sur l'usage rationnel par les malades (OMS, 2002). En effet, le cadre européen ne couvre que des pathologies relevant de l'automédication et pas de pathologies sévères comme le paludisme. La valorisation de la pharmacopée traditionnelle est de plus une source prometteuse de développement et d'essor de l'industrie pharmaceutique locale. C'est dans cette esprit que plusieurs chercheurs et instituts de recherche Ivoiriens ont initié en 2016 la rédaction d'une pharmacopée nationale nommée « Pharmacopée Ivoirienne » qui décrit 52 plantes couramment utilisées en médecine traditionnelle ivoirienne. Des analyses chimiques et micrographiques accompagnent la bibliographie réalisée sur ces plantes (Pharmacopée Ivoirienne, 2018). Cela montre la volonté d'avancer dans ce processus de reconnaissance et d'amélioration de la qualité des matières premières et des produits.

Toutefois, des méfiances liées aux suspicions de biopiraterie et d'exploitation non éthique des connaissances poussent beaucoup de praticiens à garder le secret sur leurs préparations. De plus l'insuffisance de protection des savoirs traditionnels en matière de pharmacopée rend les autorités impuissantes face à ce risque de piratage. Il est donc nécessaire de créer un cadre réglementaire incluant la protection des droits de propriété intellectuelle, qui soit conforme aux préconisations de la Convention sur la Biodiversité établies par le protocole de Nagoya (2010) (Site de la Convention de la biodiversité, 2021).

On remarque une dynamique spécifique et une modernisation dans le champ de la médecine traditionnelle. Ainsi, les tradipraticiens de Côte d'Ivoire sont réunis au sein de la Fédération des tradipraticiens de santé et naturothérapeutes (FTSN-CI) (PNPMT, 2014) regroupant 15 000 fédérés. D'autre part, les établissements de santé traditionnelle tendent à se moderniser, comme en témoignent les photos ci-dessous.



Figure 7 : Lieux de consultation de tradipraticiens en Côte d'Ivoire

a : Tradipraticien « traditionnel » (source : Tela-botanica.org), b : Cabinet de consultation du tradipraticien « moderne » en Côte d'Ivoire (Photographie de Kablan L.)

Les praticiens, pour s'adapter au monde urbain, préparent des recettes à l'avance pour la vente à un grand public. Ainsi on rencontre des dépôts de vente munis d'étagères pour permettre un rangement répondant aux directives de l'Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (UEMOA) sur l'entreposage des matières premières et des produits finis) (UEMOA, 2010).

2.1.3. Procédures d'enregistrement des produits à base de plantes

La loi de 2015 autorise l'exercice de la médecine traditionnelle sans stipuler de mesures de contrôle spécifiques. L'utilisation et la commercialisation des médicaments traditionnels à base de plantes sont cependant soumises à des exigences relativement strictes (transposition des directives de l'UEMOA). En effet, la DPML, récemment devenue l'AIRP, en charge de la réglementation des produits de santé a établi une procédure d'enregistrement de ces médicaments traditionnels, en fonction de la catégorie à laquelle ils appartiennent, en se fondant sur les préconisations de l'UEMOA (UEMOA, 2012). Ces préconisations ne sont pas communiquées par le PNPMT, mais sont présentées aux exploitants au moment de leurs demandes d'enregistrement, par l'AIRP. Cette procédure avait vocation à être adoptée.

Conditions d'obtention du visa d'enregistrement :

Tout opérateur désireux de faire enregistrer son produit doit se rendre à l'AIRP, qui en a défini les modalités. Le type de visa d'enregistrement délivré sera fonction du statut attribué au médicament traditionnel selon la classification de l'OMS (OMS, 2000) :

- Médicaments de catégorie 1 : Préparés par un tradipraticien pour un malade.

Plantes ou médicaments à base de plantes préparés extemporanément d'après des méthodes traditionnelles. Leur innocuité et leur efficacité sont supposées du fait qu'ils sont utilisés de longue date. Ils ont une durée de conservation relativement courte et sont prescrits et administrés par une personne initiée. Ils ne nécessitent pas l'obtention d'une AMM, l'autorisation officielle d'exercer la médecine traditionnelle comportant celle de fabriquer et de distribuer de tels médicaments.

- Médicaments de catégorie 2 : Issus de la communauté mais ayant des applications commerciales.

Ce sont des MTA (médicaments traditionnels améliorés) manufacturés. Ils doivent faire l'objet d'une commission présidée par l'AIRP. Cette commission comprendra des personnes choisies en raison de leur compétence dans le domaine de la médecine traditionnelle, de la médecine et de la pharmacie, dont l'apport est utile à établir la qualité, la sécurité des médicaments destinés à la mise sur le marché. Le dossier de demande de visa comprendra deux parties : un dossier administratif de demande d'enregistrement et un dossier technique (tableau 2). Il apparaît comme évident que ces exigences ne soient, en l'état, pas accessibles aux acteurs concernés.

Tableau 2 : Eléments constitutifs du dossier de demande de visa d'enregistrement en Côte d'Ivoire

Dossier administratif	Dossier technique
-renseignements administratifs : nom, adresse, site de production, contrôle, conditionnement, - résumé des caractéristiques du produit, - 30 échantillons du modèle destiné à la vente sont adjoints, - reçu de paiement des droits d'enregistrement.	Apporte la preuve de la qualité et de l'innocuité du médicament. Il comporte quatre modules 1- <u>Module pharmaceutique</u> : application des BPF, composition qualitative et quantitative du médicament, description du mode de préparation, contrôle des matières premières, produits intermédiaires et des produits finis, et résultats des essais de stabilité. 2- <u>Module analytique</u> : méthodes d'identification, dosages des éléments actifs. 3- <u>Module pharmacologique</u> : résultats des travaux scientifiques et toute documentation de nature à montrer l'efficacité et l'innocuité du MTA. Du point de vue clinique, la longue durée d'utilisation du produit sera présomption d'efficacité et d'innocuité. A cet effet la preuve d'utilisation communautaire de ce médicament sur une durée de 20 ans au moins devra être apportée (documentation, articles scientifiques...). Selon le dispositif de l'UE, cette durée est de 15 ans dans l'UE et 30 dans l'Europe, pour un usage traditionnel (10 ans pour un usage bien établi). 4- <u>Module toxicologique</u> : comprendra les résultats des essais de toxicité et d'innocuité

(source : DPML, voir annexe 3)

- Médicaments de catégorie 3 : Issus des institutions de recherche et des établissements sanitaires.

Le dossier est sensiblement le même que celui de la catégorie 2, enrichi des résultats de recherche des instituts de recherche dont est issu le médicament, concernant ses propriétés thérapeutiques.

- Médicaments de catégorie 4 : Proviennent de pays extérieurs à l'Afrique.

Ce doit être un médicament à base de plantes. Les molécules responsables de son activité biologique peuvent être connues ou non. Les étiquettes doivent porter : les indications spécifiques d'administration ; l'identité(s) des matériaux de la (des) plante(s) médicinale (s) utilisée(s) et de tout excipient du pays d'origine. Les éléments à fournir sont : Données sur l'innocuité et l'efficacité du médicament ; Certificat de vente libre délivré par le pays d'origine ; Recommandation ou certificat du laboratoire de contrôle qualité du pays de destination ; Données sur les essais pré-cliniques et cliniques dans les pays d'origine ; Données sur les essais pré-cliniques et cliniques dans les pays de destination ; Recommandation ou certificat délivré(e) sur le médicament à l'autorité de contrôle pharmaceutique par le Conseil des tradipraticiens ; Certificat délivré au postulant par l'Autorité de contrôle pharmaceutique.

Le dossier est le même que celui des spécialités pharmaceutiques et est régi par les dispositions du décret n°669 du 21 Décembre 1994 sur l'enregistrement des médicaments en Côte d'Ivoire.

Procédure de demande d'enregistrement

L'opérateur pourra faire une demande d'enregistrement de son médicament, qui sera fonction de la catégorie à laquelle il appartient.

S'il est de la catégorie 1, il fera une demande d'enregistrement de médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments suivant les modalités définies [annexe I], car selon les travaux de Amari (Amari, 2008) pour ces médicaments, l'autorisation d'exercer la médecine traditionnelle comporte l'autorisation de les fabriquer et les distribuer.

Si le MTA est de la catégorie 2, l'exploitant fera au préalable une déclaration de son unité artisanale de fabrication suivant les modalités définies (annexe 2) et ensuite il fera une demande d'enregistrement de produits de santé issus des unités artisanales de fabrication suivant les modalités définies (annexe 1) suivie d'une demande d'autorisation de commercialisation (AC) via le formulaire dédié (annexe 4). Les médicaments à base de plantes en Côte d'Ivoire sont pour l'heure classés dans les deux premières catégories, à cause des exigences des dernières catégories auxquelles les opérateurs n'arrivent pas à répondre. Selon le directeur du PNPMT, le Docteur Kroa, en 2013 lors d'un recensement, 132 médicaments étaient classés dans la catégorie 1 contre 324 dans la catégorie 2. Aucun n'était classé dans les catégories 3 et 4 (Kroa, 2016)

Cependant, il n'y avait que 3 phytomédicaments issus de la pharmacopée ivoirienne dûment enregistrés en 2018 et 2 compléments alimentaires.

Une adaptation des préconisations pour les MTA de catégorie 2, conforme aux capacités des tradipraticiens requéreurs, est envisagée. Elle sera rédigée avec notre concours après la soutenance de cette thèse.

2.2. Plantes médicinales et produits à base de plantes vendus en Côte d'Ivoire

La vente de plantes médicinales est très développée en Côte d'Ivoire (Piba, 2015) ; malheureusement aucune réglementation ne régit le traitement ou la qualité de ces plantes soumises à la vente dans un but thérapeutique. On verra dans la partie « travaux personnels » des illustrations relatives à ce propos.

2.2.1. Circuits d'approvisionnement, traitement du matériel végétal, stockage

Les plantes médicinales, auparavant gérées par des personnes identifiées dans les communautés restreintes comme étant détentrices du savoir traditionnel, connaissent depuis quelques années un intérêt général. De plus, l'autorisation d'exercice obtenu suite à la loi N°2015-536 du 20 Juillet 2015 en Côte d'Ivoire a suscité, outre l'intérêt des tradipraticiens, celle d'opérateurs divers investis dans la mise à disposition à grande échelle des produits issus de la pharmacopée. Ce nouveau secteur d'activité, très sollicité en raison du coût abordable des remèdes, exige une disponibilité quotidienne des plantes. Autant l'utilisation traditionnelle communautaire était basée sur des plantes directement accessibles pour des préparations extemporanées, autant la transposition à une échelle plus large exige un traitement particulier. En effet, les plantes sont d'origines diverses, souvent plus ou moins lointaine (nord de la Côte d'Ivoire, « V baoulé » au centre, forêt classée de Yapo-Abbé au sud) de leur lieu de commercialisation. Elles nécessitent théoriquement de bonnes conditions de transport, de traitement et de stockage afin d'en conserver les vertus thérapeutiques et de garantir la qualité et l'innocuité pour le consommateur. Les circuits relevés, que nous avons pu observer au cours de notre propre enquête, peuvent être comparés à ceux décrits par Booker *et al.* dans une revue sur les chaines de valeur publiée en 2012 dans le *Journal of Ethnopharmacology* (Booker, 2012). On se situe ici dans une chaîne de type « marché local » ou « marché national », pour lesquelles les bonnes pratiques de collecte ou de fabrication sont inexistantes ou faibles. A notre connaissance, il n'existe pas de charte ou de formation des cueilleurs, comme cela peut être observé en France, par exemple (AFC, 2020). Outre des risques liés à la collecte et au transport, on constate malheureusement que sur ces marchés de plantes médicinales aucune attention particulière n'est appliquée. Les opérateurs stockent leurs végétaux comme ils peuvent. Il n'existe pas de données claires sur la culture de plantes médicinales en Côte d'Ivoire (le pays étant, par ailleurs, exportateur), même si on a vu en partie 1.4.2 qu'il s'agissait d'une priorité dans le cadre adopté de la conservation de la biodiversité. Là encore, il ne semble pas exister de définition de bonnes pratiques par les acteurs de la filière, ni de formation spécifique.

Une enquête visant à évaluer les conditions de traitement et de stockage des plantes médicinales a été réalisée sur les marchés du district d'Abidjan par l'équipe de K.B. Kouamé en janvier 2017 (Kouame, 2017). L'auteur a choisi trois communes d'Abidjan (Abobo, Adjame et Yopougon) car elles constituent à la fois les principales entrées Ouest et Nord et les points de ravitaillement des marchés du district d'Abidjan, en plantes médicinales. Les marchés où l'on retrouvait le nombre le plus élevé de commerçants ont été retenus. Trois marchés ont été enquêtés dans les communes d'Abobo et d'Adjame, contre quatre dans la commune de Yopougon d'Août à octobre 2015. Les informations recueillies ont porté sur : le statut sociodémographique des commerçants, les modes d'approvisionnements en plantes médicinales, les conditions de stockage, la commercialisation des plantes médicinales dans ces marchés. Cette enquête a été menée en se référant aux recommandations de l'OMS sur les bonnes pratiques relatives aux plantes médicinales (OMS, 2003)

(Annexe 5). Elle a regroupé 350 informateurs : majoritairement des femmes (98,9%), vivant en couple et à faible revenu. 62,7 % des répondants étaient analphabètes. L'âge des commerçants varie entre 30 et 60 ans, avec une forte proportion de personnes de plus de 40 ans, lesquelles ont en général plus de connaissances sur les vertus des plantes médicinales. Ce savoir est généralement acquis via une expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. L'auteur rapporte que les vendeuses se ravitaillent principalement chez des grossistes (86 %) qui eux-mêmes s'approvisionnent dans les différentes forêts et savanes de la Côte d'Ivoire. Elles n'ont en général aucune information sur les conditions de récolte et de transport des plantes qu'elles revendent, ce qui est conforme à d'autres enquêtes telles que celle de M. Adiko en 2014 (Adiko, 2014). L'auteur indique que les grossistes n'ont aucun instrument pour contrôler l'humidité et la température au cours du transport. Ce manque de prise de précautions pourrait s'expliquer par le fait que ces personnes n'ont pas de compétences dans le domaine. La date et le lieu de récolte des plantes ne sont en général pas connus. Sur les 350 commerçants enquêtés, seulement 15,4 % avaient des critères de base pour le choix de la matière première végétale livrée. Parmi ces critères, on retrouve les caractères organoleptiques (couleur, aspect physique, odeur), pour lesquels l'odeur est à 81,8 % le moyen d'appréciation de l'état de dégradation de la matière végétale, la couleur à 10,9 % et l'aspect physique à 7,3 %. Le second critère de choix était la présentation de la matière première (organe entier, découpé, écrasé) ; 81,8 % des femmes reçoivent la matière brute non découpée. Le troisième critère était l'absence d'impuretés (sables, particules de verre, moisissures ou signe de dégradation). Pour ce critère la majorité des femmes (92,7 %) ont noté la présence de sable. Pour le dernier critère qui était l'absence d'insectes, aucune n'a mentionné une éventuelle contamination.

Sur les lieux de commercialisation, les constations de K. B. Kouamé sont les suivantes : les stands visités étaient aérés et des parasols assuraient la protection des organes contre la lumière et la chaleur ou servaient d'abris pour les commerçants eux-mêmes. Il n'y avait pas de relevé de température et d'humidité dans la zone de stockage (Kouamé, 2017).

Il rapportait aussi que 73 % des femmes ne respectent aucune règle d'hygiène spécifique. 74 % des commerçants ne lavent jamais le matériel utilisé pour recouvrir les stocks. Quant à l'hygiène de la zone de stockage, seulement 46,3 % des femmes font du nettoyage. Une fois sur les étals, tous les organes de plantes sont entreposés sur les mêmes étals sans séparation. Aucune mesure de protection contre les contaminants (insectes, animaux.) n'est appliquée. Les vendeurs n'utilisent pas de produits de fumigation ou de pesticides au cours de l'entreposage. En fin de journée, 98,9 % des commerçants recouvrent leurs stocks. Les matières utilisées sont des sacs de jute (2,3 %) ou des sachets en polyéthylène (97,7 %). L'auteur a noté dans l'environnement immédiat des étalages la présence de boue (9,1 %) et d'ordures (23,1 %). Dans 77,1 % des cas, les poussières occasionnées par la circulation de véhicules parviennent à l'étalage des vendeuses. Les lieux de ventes sont accessibles aux rongeurs (Kouame, 2017). Les matières végétales proposées par la majorité des commerçants étaient des drogues végétales brutes (feuilles, écorces de racines ou de tiges) et des poudres, à l'état frais ou sec. La mise en vente de remèdes prêts à l'emploi (tels que des décoctés et macérats) est possible. Pour la quantité des organes achetés pour la revente, elle varie d'un à dix sacs (sacs dits de 25 Kg, unité utilisée par les grossistes), avec une forte proportion pour deux sacs (44,6%) achetés. 99,7% des commerçants ne parviennent pas à écouter la quantité quotidienne reçue. La durée de stockage était en moyenne de trois mois (pour 55,1 % des répondants). Certains organes végétaux étaient présents dans les étalages depuis deux ans. Nos propres constatations, au cours de notre enquête ethnobotanique, sont proches.

L'intérêt croissant des populations pour la médecine traditionnelle a amené certains marchands à proposer des remèdes préparés à l'avance ou encore des produits manufacturés, dont nous avons vu que l'enregistrement était théoriquement obligatoire. De tels marchands vendant de façon informelle des MTA – correspondant à la catégorie 2 de l'OMS évoquée plus haut – sont nombreux (lieux de passage, grands carrefours, aux gares routières...). Ceci sera également illustré plus loin. On peut voir l'évolution de la mentalité des tradipraticiens et des herboristes ainsi que la volonté d'entrer dans un cadre « formel » de l'exercice de leur art. Toutefois, le manque de réglementation précise relative aux matières premières et produits issus de la pharmacopée ivoirienne occasionne certaines libertés dans le traitement et la vente des matières premières et des recettes traditionnelles. On rappellera que le domaine de la pharmacie en Europe est soumis aux règles de bonnes pratiques de culture et de collecte publiées par l'EMA (« *Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for starting Materials of Herbal origin* ») (EMA / HMPC, 2006). L'OMS a également émis des recommandations sur les bonnes pratiques relatives aux plantes médicinales. Pour d'autres secteurs de transformation et de vente de plantes médicinales en Europe, des règles relatives aux aliments ou des cahiers des charges spécifiques s'appliquent (on pourra se référer aux textes applicables aux compléments alimentaires indiqués par la Direction Générale du Commerce, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF, consulté en 2021) ou par le Syndicat national des compléments alimentaires (SYNADIET), en France (SYNADIET, consulté en 2021). Ces textes imposent en particulier des bonnes pratiques d'hygiène ainsi que l'application des principes dits « HACCP » (*Hazard Analysis and Critical Control Point* - Système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques), utilisés également dans le Codex Alimentarius (FAO / OMS, consulé en 2021).

2.2.2. Qualité des médicaments traditionnels

En 2016, Kroa et ses collaborateurs ont rapporté que sur 456 médicaments traditionnels dispensés dans les centres de médecine traditionnelle, seulement 6 % avaient fait l'objet de contrôles, et les 94 % restant n'avaient jamais été testés (Kroa, 2016). Sur les 6 % contrôlés (pour leur activité, leur toxicité et/ou leur qualité), 79 % avaient été testés au Ghana, contre 21 % en Côte d'Ivoire car ce pays ne dispose pas d'institut spécialisé dédié à la médecine et à la pharmacopée traditionnelle. Au vu de ce constat désolant, certaines équipes de recherche apportent leur contribution à l'évaluation des médicaments traditionnels. C'est le cas de Coulibaly B. et son équipe qui en 2018 ont entrepris d'évaluer la qualité microbiologique des médicaments traditionnels améliorés vendus dans six communes de la ville d'Abidjan (Coulibaly, 2018). Après avoir recensé les MTA dans les centres de médecine traditionnelle et les unités de production, ils ont obtenu, de 20 praticiens, 38 échantillons dont 19 sous forme liquide et 19 sous forme de poudre. Ils ont procédé à la recherche de contaminants microbiologiques, à savoir la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les coliformes totaux, les salmonelles, *Staphylococcus aureus*, les levures et les moisissures.

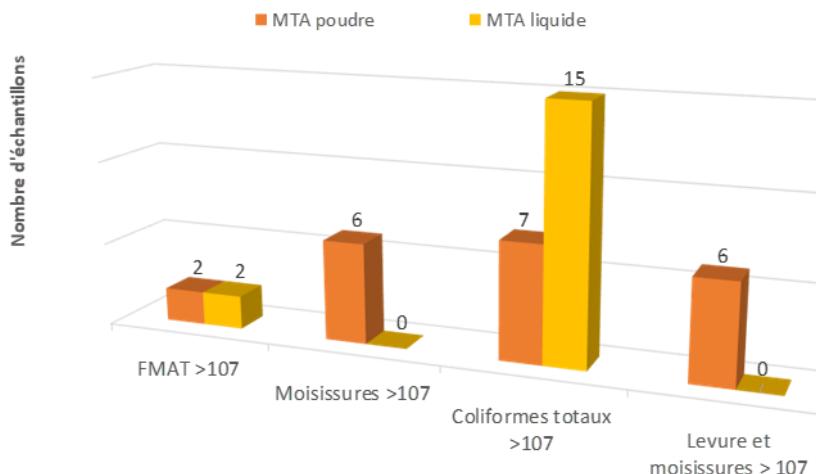


Figure 8 : Proportions de contaminants dans des MTA enregistrés (poudres et liquides)
 (Données tirées de Kroa *et al.*, 2008)

Des FMAT et coliformes ont été retrouvés dans tous les MTA à des teneurs supérieures à 10^7 UFC /g. Les moisissures et levures étaient retrouvées dans les formes poudre et absents des formes liquides. Quant aux *S. aureus* et salmonelles, ils étaient absents. Les auteurs ont conclu que les contaminations étaient supérieures au seuil d'acceptabilité. En effet selon la Pharmacopée européenne, le nombre de germes aérobies viables totaux ne doit pas excéder 10^3 unités formant colonies (UFC) /g pour les poudres et 10^2 /mL pour les préparations aqueuses. Les moisissures et levures ne doivent quant à elles pas excéder 10^2 /g pour les poudres et 10^1 /mL pour les formes liquides (Pharmacopée Européenne, 10e éd., 2021).

Ces constats sont similaires à ceux d'autres auteurs de ceux observés ailleurs en Afrique, mais aussi à l'importation en Europe (Ghisleni, 2016 ; Kneifel, 2002). Ils renvoient aux chaines de valeurs moyennes à longues faiblement contrôlées évoquées par Booker *et al.* (Booker, 2012).

3. Plantes médicinales employées comme antipaludiques en Côte d'Ivoire

3.1. Introduction

En Côte d'Ivoire, de nombreux travaux rapportent le savoir ethnobotanique des populations. Une partie de cette littérature est relativement ancienne, et offre une perspective historique. Dans le cadre des travaux de l'Office de la Recherche Scientifique d'Outre-Mer, J. Kerharo et A. Bouquet publient en 1950 le fruit de travaux ethnobotaniques dans « Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire – Haute-Volta (aux Editions Vigot Frères) , avec 46 espèces employées dans des fièvres, environ 120 pour des « propriétés fébrifuges » ou dans les « courbatures fébriles » (Kerharo, 1950). Dans le cadre des activités de l'ORSTOM (Office de la recherche scientifique et technique outre-mer) en 1974, Bouquet a continué à recenser, avec Debray, les plantes médicinales utilisées en Côte d'Ivoire. Ce recensement a porté sur les zones frontalières de la Guinée (Odienné-Touba) et du Ghana (pays Abouré, Agni), ainsi qu'aux secteurs de Sassandra-Divo (sud), du Baoulé forestier, proche de la Comoé et des Lagunes (Bouquet, 1974) (voir figure 9). De nombreuses espèces appartenant à des familles variées ont ainsi été citées dans la prise en charge de maladies diverses, dont le paludisme. L'utilisation de ces plantes par les populations est liée non seulement à la disponibilité des espèces végétales mais également aux connaissances ancestrales s'y rapportant et à leur réputation. Ainsi nous retrouvons des utilisations variées selon les régions, mais il existe de nombreuses convergences d'utilisation. Une revue de la littérature nous a permis de recenser les plantes les plus communément utilisées dans le nord, le centre et le sud de la Côte d'Ivoire pour traiter le paludisme. Ces données pourront être comparées à notre propre travail d'enquête.

3.2. Enquêtes ethnobotaniques relevées

Dans leurs enquêtes publiées en 1950 et 1974, Bouquet, Debray et Kheraro citent, spécifiquement dans le traitement des accès palustres (la nomenclature botanique utilisée est celle des auteurs) :

- *Annona anenaria* Thonn. (Annonaceae) (cité en 1950),
- *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae) (en 1950),
- *Cassia occidentalis* L. (Fabaceae) (en 1950),
- *Markkamia lutea* K. Schum. et *M. tomentosa* K. Schum. (Bignoniaceae) (cité en 1974),
- *Morinda confusa* Hutch., *M. longiflora* G. Don., *M. geminata* DC. (Rubiaceae) (en 1950),
- *Olax subscorpioides* Oliv. (Olacaceae) (en 1974),
- *Ouratea* sp. (*O. schoenleiniana* Gilg.) (Ochnaceae) (en 1950),
- *Picralima nitida* Th. et Hél. Dur. (Apocynaceae) – dans les ictères, mais avec une référence aux travaux d'Aubréville signalant un emploi dans le paludisme (en 1950),
- *Sarcocapnos esculentus* Afz. (Rubiaceae) (en 1950),
- *Trichilia emetica* Vahl. (Fabaceae) (en 1950),
- *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae), en association à *Pseudarthria alba* A. Chev. (Fabaceae), ou à *Vernonia nigritiana* (en 1950).

Les espèces proposées dans les états fébriles n'ont pas été rapportées ici.

Nous avons relevé onze enquêtes récentes en Côte d'Ivoire :

Au Nord

Pour la région du nord, l'équipe de Koné rapportait en 2004 des résultats d'une étude réalisée dans la région de Ferkessédougou auprès des guérisseurs locaux (Kone, 2004). L'utilisation des plantes y est particulièrement importante car les médicaments modernes sont trop couteux pour la population locale. 97 plantes citées par les guérisseurs comme ayant un effet curatif contre les maladies d'origine microbienne ont été collectées et identifiées. Parmi ces plantes, six sont utilisées traditionnellement pour traiter le paludisme.

En 2006 Ambé et son équipe ont enquêté dans la région nord-ouest, dans la zone des savanes aux alentours de la ville de Séguéla, dans la zone appelée « savanes guinéennes préforestières », plus précisément dans le petit village de Kénègbé qui compte environ 300 habitants d'ethnie Dioula (Ambe, 2002). Dans cette zone à végétation variée (forêt dense et forêt claire), les auteurs ont interrogé les villageois sur la signification littérale et l'étymologie des dénominations locales des plantes médicinales (en langue Dioula). Les concepts descriptifs utilisés sont principalement l'usage potentiel, l'allure générale ou encore l'écologie de la plante. Des similitudes d'approche avec d'autres groupes ethniques ont été mentionnées. Concernant la désignation du paludisme, les symptômes étaient relativement bien connus. Quatre plantes ont été citées pour le traitement de cette maladie.

En 2013, Dro s'est orienté non loin des frontières du Mali et du Burkina Faso dans les zones non protégées et les forêts villageoises des savanes du Nord. Il a établi une liste de 11 plantes citées comme ayant un intérêt en médecine traditionnelle. L'étude a consisté à inventorier ces plantes *in situ*, afin d'en évaluer l'abondance et la régénération pour une gestion durable et rationnelle des plantes médicinales. Deux plantes avaient des indications contre le paludisme et étaient fortement représentées dans la région (Dro, 2013).

Au centre

Pour la région du centre, Bla et ses collaborateurs ont publié en 2015 une enquête ethnopharmacologique portant spécifiquement sur l'usage traditionnel des plantes antipaludiques dans la région de Toumodi, plus précisément dans le village de Moronou qui compte 4000 habitants d'ethnie Baoulé. La population est essentiellement constituée de cultivateurs. Pour cette enquête 9 tradithérapeutes dit « guérisseurs » se sont soumis à un entretien semi structuré. Vingt-six plantes ont été répertoriées (Bla, 2015).

L'équipe de Koulibaly s'est quant à elle rendue en 2016 dans la ville de Daloa. Cette ville de la région du centre-ouest renferme plusieurs groupes ethniques, toutefois dominés par l'ethnie autochtone Bété. Les auteurs ont visité la ville et les 6 villages environnants. Une enquête a été réalisée auprès de 270 personnes de plus de 25 ans ; il s'agissait de tradipraticiens, de herboristes et de personnes ayant bénéficié de soins de santé traditionnels. L'entretien était semi-directif, mené à partir d'un questionnaire afin de lister les plantes utilisées dans la prise en charge des affections les plus courantes. Au total 38 affections ont été citées. Le paludisme était la plus citée (fréquence de citation de 71 %), suivi de la fièvre typhoïde. Dix-neuf plantes étaient employées pour traiter le paludisme (Koulibaly, 2016).

Au Sud

Pour la région du Sud-est, N'Guessan a publié en 2009 une enquête ethnopharmacologique spécifiquement relative au paludisme, dans 16 villages du département d'Agboville, dont la population est composée essentiellement des ethnies Abbey et Krobou, très généralement agriculteurs. Soixante guérisseurs ont été interrogés suivant un entretien semi structuré. Ils ont rapporté 57 espèces et 51 recettes antipaludiques (N'Guessan, 2008, N'Guessan, 2009).

Une autre enquête relative au paludisme, menée à Agboville par Kipré *et al.* en 2017 a permis d'interroger 25 tradipraticiens grâce à une fiche d'enquête : 57 espèces végétales ont également été répertoriées dans l'indication (Kipré, 2017).

Pour la région du sud-ouest, Soro et son équipe ont rapporté en 2014 des travaux réalisés dans la forêt marécageuse de Port Gauthier située dans la zone côtière. Une enquête ethnobotanique a permis d'interroger 200 personnes issues des populations riveraines autochtones d'ethnies Godié et Neyo, et d'allochtones Baoulé sur l'utilisation traditionnelle des espèces végétales de cette forêt : 20 espèces ont été recensées parmi lesquelles 11 avaient un usage médicinal, dont 3 étaient utilisées pour traiter le paludisme (Soro, 2014).

Pour la région du sud forestier, Sylla et son équipe rapportent en 2018 les résultats d'une étude ethnobotanique menée entre novembre 2014 et janvier 2015 dans la région des lagunes, dans 10 communes du district autonome d'Abidjan. Ils ont interrogé au total 46 tradithérapeutes et 37 herboristes, choisis dans les 10 communes de façon aléatoire avec l'aide du PNPMT : 54 plantes à visée antipaludique ont été recensées (Sylla, 2018).

A l'Est

Pour la région de l'est du pays, les travaux de Béné en 2016 rapportent les résultats d'une enquête ethnobotanique réalisée dans le district du Zanzan, plus précisément dans le département de Transua faisant frontière avec le Ghana (Béné, 2016). L'objectif de l'étude était de répertorier les plantes médicinales utilisées par les Brong (ethnie locale) : 3 communes rurales et 7 villages ont été visités et les herboristes rencontrés ont été interrogés : 94 plantes ont été inventoriées. La prise en charge du paludisme représentait 32 % des pathologies énumérées pour 30 espèces employées.



Figure 9 : Zones des enquêtes ethnobotaniques publiées relevant état d'emplois de plantes comme antipaludiques. (Carte du monde, site internet consulté le 26/09/2019).

Les plantes citées dans ces enquêtes sont recensées dans le tableau 3 suivant : elles sont au nombre de 156. Les plantes marquées d'un astérisque figurent à la pharmacopée ivoirienne (19 d'entre elles). Les plantes indiquées dans des cases grisées figurent dans notre propre inventaire et ont été mises en herbier dans le cadre de notre travail personnel (22 drogues végétales). Leguminosae est un synonyme de Fabaceae (auxquelles sont rattachées les anciennes Mimosaceae, Cesalpiniaceae). Compositae est un synonyme d'Asteraceae. Sont relevées : les emplois comme antipaludique (notés « P ») ; le cas échéant : l'existence d'autres indications thérapeutiques (notées « A », pour « autres »).

Tableau 3 : Synthèse des données ethnopharmacologiques ivoiriennes relatives au paludisme, relevées dans la littérature récente : plantes citées

Sources : Ambe, 2002 ; Béné, 2016 ; Bla, 2015 ; Dro, 2013 ; Kipre, 2017 ; Koné, 2004 ; Koulibaly, 2016 ; N'Guessan, 2008 ; N'Guessan, 2009 ; Soro, 2014 ; Sylla, 2018.

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Abrus precatorius</i> L.*	Fabaceae (Leguminosae)	1	1	P										
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.*	Asteraceae (Compositae)	1					P							
<i>Adenia cissampeloides</i> (Planch. ex Hook.) Harms	Passifloraceae	1		P										
<i>Adenia lobata</i> (Jacq.) Engl.*	Passifloraceae	2		P	P									
<i>Agave decipiens</i> Baker	Asparagaceae	1			P									
<i>Ageratum conyzoides</i> (L.) L.	Asteraceae (Compositae)	2	2		P		A	P	A					
<i>Alchornea cordifolia</i> (Schumach. et Thonn.) Müll.Arg.	Euphorbiaceae	6	3	P	P	P	A	A	P	A			P	
<i>Alstonia boonei</i> De Wild. *	Apocynaceae	7		P	P		P	P	P				P	P
<i>Alternanthera pungens</i> Kunth*	Amaranthaceae	1	1				P					A		
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Bromeliaceae	1			P									
<i>Annikia polycarpa</i> (DC.) Setten & Maas ex I.M.Turner*	Annonaceae	2		P	P									
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	2			P								P	
<i>Annona senegalensis</i> Pers.	Annonaceae	2	3						P	A	A	A	P	
<i>Anogeissus leiocarpa</i> (DC.) Guill. & Perr.	Combretaceae	3	1							P	A		P	P
<i>Anthocleista djalonensis</i> A.Chev.	Gentianaceae	3		P					P				P	
<i>Anthocleista nobilis</i>	Gentianaceae	1											P	
<i>Anthonotha macrophylla</i> P.Beauv.	Fabaceae (Leguminosae)	1		P										
<i>Asclepias curassavica</i> L.	Apocynaceae	1					P							
<i>Aspilia africana</i> (Pers) CD. Adams	Asteraceae (Compositae)	1											P	

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Azadirachta indica</i> A.Juss.	Meliaceae	6	P	P		P	P		P				P	
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad.	Poaceae	3	2	P	P		A	A					P	
<i>Bauhinia reticulata</i> DC.	Fabaceae (Leguminosae)	1											P	
<i>Bauhinia thonningii</i> Schum.	Fabaceae (Leguminosae)	2	2								A	A	P	P
<i>Bidens pilosa</i> L.*	Asteraceae (Compositae)	1	1		P		A							
<i>Bobgunnia madagascariensis</i> (Desv.) J.H.Kirkbr. & Wiersema	Fabaceae (Leguminosae)	2										P		P
<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Nyctaginaceae	1	1		P		A							
<i>Bombax buonopozense</i> P.Beauv.	Malvaceae	2		P					P					
<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	Nyctaginaceae	1			P									
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth	Phyllanthaceae	1	1							A			P	
<i>Carapa procera</i> DC.	Meliaceae	1	1							A			P	
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	4	1		P		P A P						P	
<i>Cascabela thevetia</i> (L.) Lippold	Apocynaceae	1					P							
<i>Cassia sieberiana</i> DC.	Fabaceae (Leguminosae)	2										P	P	
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	Apocynaceae	2	1		P		A					P		
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M.King & H.Rob.*	Asteraceae (Compositae)	1	1		P		A							
<i>Chrysophyllum africanum</i> A. DC.	Sapotaceae	1			P									
<i>Cissus doeringii</i> Gilg & M.Brandt	Vitaceae	1										P		
<i>Cissus smithiana</i> (Baker) Planch.	Vitaceae	1							P					
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle *	Rutaceae	1			P									
<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Rutaceae	1			P									
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	1			P									
<i>Cnestis ferruginea</i> Vahl ex DC.	Connaraceae	1										P		

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail	
<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook. f. ex Planch.	Bixaceae	3	1						P			P	A	P	P
<i>Cochlospermum tinctorium</i> Perr.ex.A. Rich.	Bixaceae	1												P	
<i>Cocos nucifera</i> L.	Arecaceae	1			P										
<i>Cola gigantea</i> A. Chev.	Malvaceae (ex-Sterculiaceae)	1		P											
<i>Combretum micranthum</i> G. Don	Combretaceae	2		P										P	
<i>Combretum molle</i> R. Br. Ex G. Don.	Combretaceae	2	1										A	P	P
<i>Cordia vignei</i> Hutch. et Dalziel	Boraginaceae	1			P										
<i>Crossopteryx febrifuga</i> (Afzel. ex G.Don) Benth.	Rubiaceae	2	1						P		A			P	
<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	1			P										
<i>Cucumis sativus</i> L.	Cucurbitaceae	1			P										
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae	2	1		P		A							P	
<i>Diospyros mespiliformis</i> Hochst.ex A.DC.	Ebenaceae	1	1							A				P	
<i>Entada abyssinica</i> A. Rich	Fabaceae (Leguminosae)	1											P	A	
<i>Entada africana</i> Guill. & Perr.	Fabaceae (Leguminosae)	1												P	
<i>Entada mannii</i> (Oliv.) Tisser.	Fabaceae (Leguminosae)	1		P											
<i>Entandrophragma</i> sp.	Meliaceae	1		P											
<i>Erythrococca anomala</i> (Juss. ex Poir.)	Euphorbiaceae	1		P											
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh	Myrtaceae	1												P	
<i>Ficus exasperata</i> Vahl	Moraceae	2	1	P	P		A								
<i>Ficus polita</i> Vahl	Moraceae	1			P										
<i>Fleroya ledermannii</i> (K.Krause) Y.F.Deng	Rubiaceae	1		P											
<i>Funtumia elastica</i> (Preuss) Stapf	Apocynaceae	1			P										
<i>Griffonia simplicifolia</i> (DC.) Baill.	Fabaceae (Leguminosae)	1		P											

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Guiera senegensis</i> J.F. Gmel	Combretaceae	2										P	P	
<i>Gymnanthemum coloratum</i> (Willd.) H.Rob. & B.Kahn	Asteraceae (Compositae)	2		P									P	
<i>Gymnosporia senegalensis</i> (Lam.) Loes.	Celastraceae	1	1									P A		
<i>Harrisonia abyssinica</i> Oliv.	Rutaceae	1	1				P A							
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.*	Hypericaceae	4		P	P				P				P	
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae	1			P									
<i>Hoslundia opposita</i> Vahl. *	Lamiaceae	4	1	P			P A		P				P	
<i>Hymenocardia acida</i> Tul.	Phyllanthaceae	2	1									A	P	P
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	Lamiaceae	1							P					
<i>Icacina mannii</i> Oliv.	Icacinaceae	1		P										
<i>Ipomea asarifolia</i> (Desr.) Roem. & Schult.	Convolvulaceae	1											P	
<i>Ipomoea pileata</i> Roxb.	Convolvulaceae	1			P									
<i>Irvingia gabonensis</i> (Aubry-Lecomte ex O'Rorke) Baill.	Irvingiaceae	1		P										
<i>Jatropha curcas</i> L.	Euphorbiaceae	3	2	P	P		A			A			P	
<i>Jatropha gossypiifolia</i> L.	Euphorbiaceae	1	1		P					A			A	P
<i>Khaya senegalensis</i> (Desv.) A.Juss.	Meliaceae	1	1										A	P
<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth.	Bignoniaceae	1	1	P									A	
<i>Landolphia heudelotii</i> A.DC.	Apocynaceae	1		P										
<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	1										P		
<i>Lippia muliflora</i> Moldenke	Verbenaceae	2	2				A		P	A			P	
<i>Mangifera indica</i> L.	Anarcadiaceae	6		P	P		P P		P				P	
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	2		P			P							

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Margaritaria discoidea</i> var. <i>fagifolia</i> (Pax) Radcl.-Sm.*	Phyllanthaceae	1	1						P	A				
<i>Mikania cordata</i> (Burm.f.) B.L.Rob.	Asteraceae (Compositae)	1		P										
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	Rubiaceae	2											P	P
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	4	1	P	P		A						P	P
<i>Momordica foetida</i> Schumach.	Curcubitaceae	1		P										
<i>Monodora tenuifolia</i> Benth.	Annonaceae	1		P										
<i>Morinda lucida</i> Benth.	Rubiaceae	6	2	P	P	P	A	P	P			A	P	
<i>Morinda morindoides</i> (Baker) Milne-Redh.	Rubiaceae	1						P						
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae	3	1	P				P	A	P				
<i>Musa x paradisiaca</i>	Musaceae	2	1		P		A	P						
<i>Myrianthus arboreus</i> P.Beauv.	Urticaceae	1		P										
<i>Nauclea xanthoxylon</i> (A.Chev.) Aubrév.	Rubiaceae	1			P									
<i>Newbouldia laevis</i> (P.Beauv.) Seem.	Bignoniaceae	1	1		P		A							
<i>Ocimum americanum</i> L.	Lamiaceae	1	1					P	A		A			
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	1	1				P	A						
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lamiaceae	4	2	P	P		A	P	A	P				
<i>Olax subscorpioidea</i> Oliv.	Olacaceae	3	1	P					P			A	P	
<i>Opilia amentacea</i> Roxb.	Opiliaceae	1	1						P			A		
<i>Oxyanthus unilocularis</i> Hiern	Rubiaceae	1		P										
<i>Parkia bicolor</i> A.Chev.	Fabaceae (ex-Fabaceae (Leguminosae))	1		P										
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	4	2	P		P	A			A			P	P
<i>Pavetta crassipes</i> K. Schum.	Rubiaceae	1										P		
<i>Pericopsis laxiflora</i> (Baker) Meeuwen	Fabaceae (Leguminosae)	2	1						P		A			P
<i>Periploca nigrescens</i> Afzel.*	Apocynaceae	3	1	P	P		A							P

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguissan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. et Thonn.	Phyllanthaceae	6	2	P	P		P	A	P				P	
<i>Phyllanthus muellerianus</i> (Kuntze) Exell	Phyllanthaceae	1	1									P	A	
<i>Picralima nitida</i> (Stapf) T. Durand et H.Durand	Apocynaceae	2			P									P
<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn.	Fabaceae (Leguminosae)	1	2							A		A		P
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	1	1	P				A						
<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel.	Apocynaceae	3		P	P								P	
<i>Ricinodendron heudelotii</i> (Baill.) Heckel*	Euphorbiaceae	1	2		P	A	A							
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	2	1				P	A						P
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E. A. Bruce	Rubiaceae	6	1	P	P	P		P		A		P	P	
<i>Scaphopetalum amoenum</i> A. Chev.	Malvaceae	1			P									
<i>Secamone afzelii</i> (Roem. & Schult.) K.Schum.	Apocynaceae	1			P									
<i>Securidaca longipedunculata</i> Fresen	Polygalaceae	1	3							A	A	A	P	
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	Fabaceae (Leguminosae)	4	2	P	P		P	A		A			P	
<i>Senna hirsuta</i> (L.) H.S.Irwin & Barneby	Fabaceae (Leguminosae)	1								P				
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Fabaceae (Leguminosae)	3	2	P	P		A			A			P	
<i>Senna siamea</i> (Lam.) H.S.Irwin & Barneby	Fabaceae (Leguminosae)	4		P	P		P	P						
<i>Senna tora</i> (L.) Roxb.	Fabaceae (Leguminosae)	1					P							
<i>Solanum americanum</i> Mill.	Solanaceae	1											P	
<i>Solanum distichum</i> Schumach. & Thonn.	Solanaceae	1	1				P	A						
<i>Solanum torvum</i> Sw.	Solanaceae	1	1				P	A						
<i>Spathodea campanulata</i> P.Beauv.	Bignoniaceae	3	1	P			P	A		P				
<i>Spondias mombin</i> L.	Anarcadiaceae	3	1	P			A	P		P				
<i>Struchium sparganophora</i> (L.) Kuntze	Asteraceae (Compositae)	1	1		P		A							
<i>Strychnos spinosa</i> Lam.	Loganiaceae	1	1									P	A	

Espèces	Familles	Paludisme	Autre	Agboville Kipre 2017	Agboville Nguessan 2008	Forêt Yapo Soro 2014	Transua Béné 2016	Daloa Koulibaly 2016	Toumodi Bla 2015	N-Kenegbe Ambé 2006	N-Savanes Dro 2013	N-Ferke Koné 2004	Abidjan Sylla 2018	Abidjan ce travail
<i>Tapinanthus bangwensis</i> (Engl. & K.Krause) Danser	Loranthaceae	1	P											
<i>Tectona grandis</i> L. f.	Lamiaceae	2	1	P	P			A						
<i>Terminalia glaucescens</i> Planch. ex Benth.	Combretaceae	1							P					
<i>Terminalia ivorensis</i> A.Chev.	Combretaceae	1		P										
<i>Terminalia laxiflora</i> Engl.	Combretaceae	1											P	
<i>Terminalia mantaly</i> H.Perrier	Combretaceae	1			P									
<i>Theobroma cacao</i> L.	Malvaceae	1	1		P		A							
<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl) A. Gray	Asteraceae (Compositae)	1					P							
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume*	Cannabaceae (anc.- Ulmaceae)	5		P			P		P				P	P
<i>Trichilia emetica</i> Vahl	Meliaceae	1	1									A	P	
<i>Trichilia monadelpha</i> (Thonn.) J.J.de Wilde	Meliaceae	1		P										
<i>Turraea heterophylla</i> Sm.	Meliaceae	1							P					
<i>Uapaca guineensis</i> Müll.Arg.	Phyllanthaceae	1		P										
<i>Uraria picta</i> (Jacq.) DC.	Fabaceae (Leguminosae)	1							P					
<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	Asteraceae (Compositae)	4	1	P			P	A					P	P
<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake	Asteraceae (Compositae)	2	1							A			P	P
<i>Vismia guineensis</i> (L.) Choisy*	Hypericaceae	1												P
<i>Vitellaria paradoxa</i> C.F.Gaertn.	Sapotaceae	2								P			P	P
<i>Vitex doniana</i> Sweet	Lamiaceae	1							P					
<i>Ximenia americana</i> L.	Olaraceae	1	1			A						A	P	
<i>Zanthoxylum gelletii</i> De Wild. *	Rutaceae	1	1	P										

Ces espèces se répartissent dans 49 familles, regroupées dans le tableau 4 suivant.

Tableau 4 : Nombre de citation des familles et espèces relevées par la littérature dans le traitement traditionnel du paludisme en Côte d'Ivoire

Familles	Espèces	Citations
Amaranthaceae	1	1
Anarcadiaceae	2	9
Annonaceae	4	7
Apocynaceae	10	22
Arecaceae	1	1
Asparagaceae	1	1
Asteraceae (Compositae)	11	16
Bignoniaceae	3	5
Bixaceae	1	5
Boraginaceae	1	1
Bromeliaceae	1	1
Cannabaceae (ex-Ulmaceae)	1	5
Caricaceae	1	4
Celastraceae	1	1
Combretaceae	8	13
Connaraceae	1	1
Convolvulaceae	2	2
Cucurbitaceae	4	7
Ebenaceae	1	1
Euphorbiaceae	7	16
Fabaceae (Leguminosae)	20	29
Gentianaceae	2	4
Hypericaceae	2	5
Icacinaceae	1	1

Familles	Espèces	Citations
Irvingiaceae	1	1
Lamiaceae	7	14
Loganiaceae	1	1
Loranthaceae	1	1
Malvaceae	6	6
Meliaceae	7	12
Moraceae	2	3
Moringaceae	1	3
Musaceae	2	2
Myrtaceae	2	2
Nyctaginaceae	2	2
Olacaceae	2	4
Opiliaceae	1	1
Passifloraceae	2	3
Phyllanthaceae	6	12
Poaceae	2	5
Polygalaceae	1	1
Rubiaceae	9	21
Rutaceae	5	5
Sapindaceae	1	3
Sapotaceae	2	3
Solanaceae	3	3
Urticaceae	1	1
Verbenaceae	2	3
Vitaceae	2	2
49 familles	158 taxons	198 citations

Les familles les plus représentées en nombre d'espèces sont les Fabaceae (Leguminosae) (12,6 %), les Apocynaceae (6,3 %), les Asteraceae (Compositae) (6,9 %), ce sont aussi les plus citées. Les Euphorbiaceae et les Phyllanthaceae qui y étaient rattachées sont également nombreuses.

Ces résultats concordent avec ceux de Kipré qui a rapporté les Fabaceae (8,80 %), les Euphorbiaceae, les Rubiaceae (7 %), Apocynaceae et Meliaceae (5,30 %) comme familles dominantes à Agboville (Kipré, 2017). Ouattara *et al.* (53) ont retrouvé à Divo, les Apocynaceae (25 %), les Euphorbiaceae (8,92 %) et les Rubiaceae (8,33 %) (Ouattara, 2006). D'autres auteurs tels que N'Guessan, Béné et Bla ont relevé les Euphorbiaceae comme famille la plus employée (N'Guessan, 2008 ; Béné, 2016 ; Bla, 2015). On notera que certains de ces inventaires sont antérieurs au reclassement des Phyllanthaceae hors du groupe des Euphorbiaceae. Ces résultats s'expliqueraient partiellement par le fait que ces familles font

partie, du point de vue génétique et spécifique, des plus importantes de la flore ivoirienne (Ambé, 2006).

En résumé l'emploi de 156 espèces a été relevé. 7 ont des relevés très convergents (plus de 5 citations sur 11 enquêtes). Les plus citées étaient : *Alstonia boonei* (Apocynaceae), suivie de *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Mangifera indica* (Anacardiaceae), *Phyllanthus amarus* (Phyllanthaceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Sarcocephalus latifolius* (Rubiaceae), et *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae). Plus de la moitié des espèces (59 %) étaient originaires de la région sud du pays.

Remarque : plantes répertoriées par la Pharmacopée Ivoirienne

Au sein de cet inventaire, 18 plantes (soit 11,6 %) sont répertoriées dans la pharmacopée ivoirienne. Il s'agit d'*Abrus precatorius* L. (Leguminosae), *Acanthospermum hispidum* DC. (Compositae), *Adenia lobata* (Jacq.) Engl. (Passifloraceae), *Alstonia boonei* De Wild. (Apocynaceae), *Alternanthera pungens* Kunth (Amaranthaceae), *Annickia polycarpa* (DC.) Setten & Maas ex I.M.Turner (Annonaceae), *Bidens pilosa* L. (Compositae), *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (Compositae), *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (Rutaceae), *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae), *Hoslundia opposita* Vahl. (Lamiaceae), *Margaritaria discoidea* var. *fagifolia* (Pax) Radcl.-Sm. (Phyllanthaceae), *Paullinia pinnata* L. (Sapindaceae), *Periploca nigrescens* Afzel. (Apocynaceae), *Ricinodendron heudelotii* (Baill.) Heckel (Euphorbiaceae), *Trema orientalis* (L.) Blume (Ulmaceae), *Vismia guineensis* (L.) Choisy (Hypericaceae), *Zanthoxylum gelletii* De Wild. (Rutaceae) (Pharmacopée Ivoirienne, 2018).

Remarque : valeur marchande

Une étude menée en 2015 par S. Piba dans la forêt classée de Yapo-Abbé a évalué la disponibilité et la valeur marchande de plantes à usage médicinal. Dix espèces principales ont été inventorierées. Ce sont : *Annickia polycarpa* (anc. *Enantia polycarpa*), *Landolphia owariensis*, *Khaya ivorensis*, *Alstonia boonei*, *Piper guineense*, *Uapaca esculenta*, *Ricinodendron heudelotii*, *Salacia nitida*, *Manniophyton fulvum* et *Landolphia hirsuta*, dites souvent employées dans le paludisme (Piba, 2015). La valeur marchande rapportée par ces auteurs des plantes antipaludiques de notre inventaire bibliographique figure dans le tableau 5 suivant :

Tableau 5 : Estimation de la valeur marchande des plantes utilisées contre le paludisme

Espèce	Partie	Maladies traitées	Mode de préparation	Estimation de la valeur (Francs CFA)
<i>Adenia lobata</i>	Tiges	Paludisme	Décocté	1500F le sac, un mètre de tige à 10 F
<i>Alstonia boonei</i>	Ecorces	Paludisme	Décocté, macéré / vin de palme	3000 F le sac de 25 kg
<i>Annickia polycarpa</i>	Ecorces	Paludisme	Décocté, macéré	5000 F le sac de 25 kg
<i>Anthocleista vogelii</i>	Ecorces	Paludisme	Décocté	3500 F le sac de 25 kg
<i>Harungana madagascariensis</i>	Ecorces	Fièvre typhoïde	Décocté	1750 F le sac de 25 kg
<i>Landolphia hirsuta</i>	Ecorces	Fièvre typhoïde, paludisme	Décocté	3000 F le sac de 25 kg

<i>Manniophyton fulvum</i>	Tiges	Fièvre typhoïde, Paludisme	Décocté	5000 F le sac de 25 kg
<i>Terminalia ivorensis</i>	Ecorces	Paludisme	Décocté	5000 F le sac de 25 kg
<i>Uapaca esculenta</i>	Ecorces	Plaie de ventre, fièvre typhoïde	Décocté	3000 F le sac de 25 kg
<i>Xylopia aethiopica</i>	Fruit	Adjuvant		4000 F le sac de 25 Kg

(Source : Piba S., 2015)

Parmi les plantes citées pour le traitement du paludisme, certaines sont utilisées pour d'autres indications. En effet 43 % des espèces citées étaient utilisées par les informateurs dans le traitement des pathologies diverses telles que les douleurs (dentaires, articulaires, abdominales...) ou d'autres pathologies infectieuses.

Il doit être remarqué qu'une large partie des travaux d'ethnobotanique ivoirienne, notamment des 20 dernières années, constitue une littérature « grise » (mémoires de master, manuscrits de thèse), qui n'a pas pu être prise en compte, à l'exception d'une thèse.

Enfin, on soulignera des convergences d'usages avec des relevés ethnobotaniques de pays limitrophes à la Côte d'Ivoire (le Ghana, par exemple) (Komlaga, 2015). Nous n'avons pas jugé utile de proposer ici une comparaison formelle.

4. Conclusion

La Côte d'Ivoire est un pays où le paludisme sévit largement, et où les populations ont toujours recours aux plantes médicinales.

Notre revue de la littérature ethnobotanique montre des familles préférentiellement utilisées dans la prise en charge du paludisme (Fabaceae, Apocynaceae, Asteraceae) avec des espèces faisant l'objet de convergence d'usages notables : *Alstonia boonei* (Apocynaceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Mangifera indica* (Anacardiaceae), *Phyllanthus amarus* (Phyllanthaceae), *Sarcocephalus latifolius* (Rubiaceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae)... Ces plantes sont souvent également citées dans le traitement des douleurs, ce qui pourrait justifier leur emploi en raison d'activités autres qu'antiplasmodiales. Cependant, la littérature relative aux activités pharmacologiques de ces plantes suggère bien une activité antiparasitaire possible.

La grande richesse floristique de la Côte d'Ivoire est largement exploitée, et les autorités comme les acteurs de santé contribuent à une formalisation des pratiques traditionnelles. La mise en place de produits manufacturés à base de plantes y est possible. Cependant, on a pu constater ici que le cadre employé n'était pas facilement utilisable par les fabricants potentiels. Cet aspect est abordé dans le chapitre suivant.

Dans le cadre du développement de médicaments à base de plantes, on a vu que la définition de la tradition d'usage était importante. Cet élément fait l'objet principal du chapitre suivant, en complément du relevé bibliographique proposé plus haut.

Chapitre 2 : Travaux personnels : Enquêtes ethnobotaniques

1. Introduction : contexte de notre travail ethnobotanique

Le travail que nous avons initié s'inscrit dans 2 grands axes de santé publique ivoiriens :

- celui de la lutte contre le paludisme et
- celui de la promotion de la pharmacopée traditionnelle locale.

En Côte d'Ivoire la politique sanitaire est basée sur la médecine moderne. C'est un système de santé « de type pyramidal », comprenant une offre publique de soins, une offre privée de soins et une administration sanitaire (PNDAP, 2016).

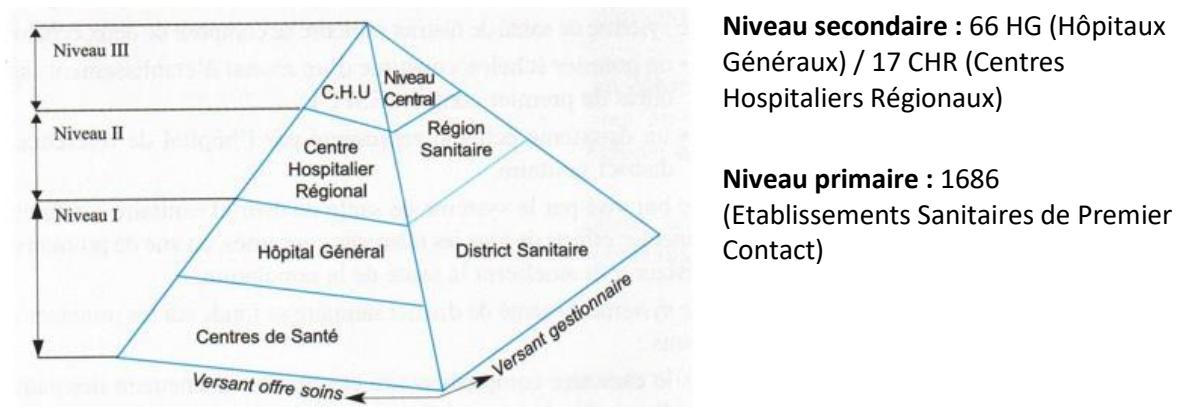


Figure 10 : Pyramide sanitaire de Côte d'Ivoire

(Source : PNDAD, 2016)

Niveau secondaire : 66 HG (Hôpitaux Généraux) / 17 CHR (Centres Hospitaliers Régionaux)

Niveau primaire : 1686 (Etablissements Sanitaires de Premier Contact)

Malgré la prise en charge proposée par le système sanitaire, nous constatons qu'une grande partie de la population reste attachée à la médication traditionnelle à laquelle elle a recours en première intention. En effet, les plantes médicinales sont très accessibles aussi bien géographiquement (dans les cours des maisons, sur des terrains vagues ou sur les marchés) que financièrement (entre 20 centimes et 1 euro le traitement). Les populations démunies préfèrent donc l'utilisation des plantes, beaucoup moins contraignante, plutôt que d'avoir à affronter les longues files d'attente des centres de santé déjà très engorgés et se retrouver avec une ordonnance onéreuse difficile à honorer.

Vu l'engouement croissant des populations pour la pharmacopée locale, il était opportun de se pencher sur la problématique de la médication par la médecine traditionnelle, afin d'approfondir la connaissance des plantes et recettes utilisées pour traiter le paludisme, ainsi que les préparations originales qui en découlent, même si des données publiées existent déjà.

C'est dans ce cadre que nous avons entrepris cette enquête qui s'est déroulée du mois d'Aout 2016 au mois d'Aout 2017. Elle est divisée en trois volets :

1. Enquête ethnobotanique au marché de plantes médicinales d'Adjame (Abidjan),
2. Enquête réalisée auprès des tradipraticiens et fabricants de recettes traditionnelles antimalariques en Côte d'Ivoire, par l'intermédiaire d'un appel à valorisation du PNPMT,
3. Collecte de phytomédicaments standardisés à visée antipaludique disponibles dans le commerce, auprès d'herboristes divers.

Une comparaison avec les données de la littérature est proposée. Les plantes employées dans les recettes et produits ont fait l'objet d'une mise en herbier des parties aériennes. Les formules proposées au PNPMT (volet 2) et les MTA du marché ont fait l'objet d'une analyse de leurs caractéristiques commerciales et réglementaires. Leurs extraits ont été évalués *in vitro* sur les souches 3D7 (chloroquino-sensibles) et Fcb1, W2 (chloroquino-résistantes) de *Plasmodium falciparum*.

2. Enquête auprès des vendeuses du marché d'Adjame (Abidjan)

2.1 Plantes antipaludiques citées

Dans presque tous les marchés de la ville d'Abidjan, on retrouve au minimum un étal de plantes médicinales et de produits naturels, proposés généralement par des femmes ayant reçu ces connaissances de leur famille ou de leur village. Il existe également des marchés spécifiques de plantes médicinales : ceux d'Abobo, d'Adjame et de Yopougon Siporex, qui sont approvisionnés en plantes très variées provenant des différentes régions de la Côte d'Ivoire. Ces produits sont directement accessibles à la population sous le seul conseil de ces vendeuses, avec un risque potentiel d'erreurs. Fort de ce constat, nous avons voulu réaliser une enquête dans un marché de plantes médicinales, dans l'un des plus grands marchés de la ville d'Abidjan, pour recenser les plantes les plus citées actuellement dans la prise en charge du paludisme. Cette enquête permettra d'établir une liste de plantes faisant l'objet d'une convergence d'utilisation avec la littérature. Elle pourra être comparée, au même titre que les données de la littérature, aux produits manufacturés actuellement commercialisés.

Le marché d'Adjame parce qu'il représente au mieux le caractère cosmopolite de la ville d'Abidjan, regroupant diverses ethnies et nationalités, ainsi qu'un mélange de cultures et de connaissances traditionnelles. De plus le fort taux de fréquentation de ce marché nous permet d'obtenir des résultats à priori représentatifs des plantes les plus demandées.

L'enquête a permis de relever, en termes d'approvisionnement et d'organisation des étals, des éléments déjà constatés dans la littérature et présentés plus haut. Le stockage et la présentation sont réalisés dans des conditions assez sommaires – généralement à même le sol. Les sacs en plastique sont souvent employés.



Figure 11 : Marché de plantes médicinales d'Adjamé

a : grossiste de plantes médicinales ; **b** : vendeuse de plantes médicinales ; **c** : étal de plantes médicinales, marché de « quartier rouge » à Adjamé, **d** : stock de plantes médicinales recouverts de sacs, Marché d'Adjamé (Abidjan) [Photographies de Akoubet A. au cours de l'enquête]

Quatorze vendeuses proposant des recettes antipaludiques ont été interrogées. Elles étaient âgées de 20 à 60 ans (39,1 ans en moyenne). Toutes sont analphabètes et les plus jeunes n'avaient qu'une connaissance très sommaire des plantes qu'elles vendent. Ce type de profil correspond à celui usuellement relevé, par exemple par Adiko (Adiko, 2014).

L'interrogatoire a porté sur les plantes proposées pour la prise en charge du paludisme. Les vendeuses, qui connaissaient la pathologie, ont indiqué les plantes et leur mode de préparation. Au terme de cette enquête 14 recettes ont été présentées par ces vendeuses. Toutes étaient à consommer par voie orale. Alternativement, sur interrogatoire spécifique, des emplois en bain ou en purge ont pu être cités. Quatre recettes étaient constituées d'une seule plante et 10 constituées de 3 plantes au moins (jusqu'à 7 plantes), pour 25 espèces au total. Les feuilles étaient systématiquement employées, sauf pour *Picralima nitida* (fruit frais). Les espèces relevées et les associations sont présentées dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : Résultats de l'enquête sur les recettes antipaludiques au marché de plantes médicinales d'Adjamé

Recette n°1 (plantes fraîches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	Kôgbêbrou (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	Trô n'di (Baoulé)	Feuilles	
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Cannabaceae	Ensien (baoulé)	Feuilles	
<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake	Compositae /Asteraceae	Abôwi (Baoulé)	Feuilles	
<i>Vismia guineenesis</i> (L.) Choisy	Hypericaceae	Soungalani brou missemen (malinké)	Feuilles	
Recette n°2 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC) Guill. et Perr.	Combretaceae	Krêkêtè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Bauhinia reticulata</i> DC.	Leguminosae /Fabaceae	Gnamanbourou (malinké)	Feuilles	
<i>Cassia sieberiana</i> DC.	Leguminosae /Fabaceae	Sindjan misseni djamba (malinké)	Feuilles	
<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.f. ex Planch.	Bixaceae	Tribala (malinké)	Feuilles	
<i>Combretum molle</i> R.Br. ex G.Don	Combretaceae	Kongôkôroni (malinké)	Feuilles	
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	kongbè (malinké)	Feuilles	
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	Rubiaceae	Djoun (malinké)	Feuilles	
Recette n°3 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC) Guill. et Perr.	Combretaceae	Kêrêkêtè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Hymenocardia acida</i> var. <i>mollis</i> (Pax) Radcl.-Sm.	Phyllantaceae	Kongnondougougbo (dioula)	Feuilles	
<i>Pericopsis laxiflora</i> (Baker) Meeuwen	Fabaceae	Kolokolo (dioula)	Feuilles	
<i>Periploca nigrescens</i> Afzel.	Apocynaceae	Ngalaman (malinké)	Feuilles	
<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn.	Leguminosae /Fabaceae	Soungbanfi (dioula)	Feuilles	

Recette n°4 (plantes fraîches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Entada africana</i> Guill. & Perr.	Leguminosae /Fabaceae	Samanèrè (bambara)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	Rubiaceae	Djoun (dioula)	Feuilles	
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Djoulasongalani (dioula)	Feuilles	
Recette n°5 (plantes fraîches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Combretaceae	Kérékêtè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	Koungbè (malinké)	Feuilles	
<i>Ipomea asarifolia</i> (Desr.) Roem. & Schult	Convolvulaceae	Folokofalaka (bamanan)	Feuilles	
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Térégué (dioula)	Feuilles	
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	Gbôbrou (dioula)	Feuilles	
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	Soungbabourou (malinké)	Feuilles	
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E.A.Bruce	Rubiaceae	Bati (sénoufo)	Feuilles	
<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	Compositae /Asteraceae	Sokôosafinin (malinké)	Feuilles	
Recette n°6 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Combretaceae	Krêkêtè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	Rubiaceae	Djoun (dioula)	Feuilles	
<i>Pericopsis laxiflora</i> (Baker) Meeuwen	Leguminosae / Fabaceae	Kolokolo (dioula)	Feuilles	
<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn.	Leguminosae / Fabaceae	Soungbanfi (dioula)	Feuilles	
Recette n°7 (plantes fraîches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Combretaceae	Krêkêtè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad.	Poaceae	Bambou commun de Chine (français)	Feuilles	
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	Kongbè (yiribékôro) (malinké)	Feuilles	
<i>Ipomea asarifolia</i> (Desr.) Roem. & Schult	Convolvulaceae	Folokofalaka (bamanan)	Feuilles	
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Térégué (dioula)	Feuilles	

<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn.	Leguminosae / Fabaceae	Soungbanfi (dioula)	Feuilles	
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	Soungbabourou (malinké)	Feuilles	
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E.A.Bruce.	Rubiaceae	Bati (senoufo)	Feuilles	
<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	Compositae / Asteraceae	Sokôosafinin (malinké)	Feuilles	
Recette n°8 (plantes fraîches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Alstonia boonei</i> De Wild.	Apocynaceae	Emien (baoulé)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Gymnanthemum coloratum</i> (Willd.) H.Rob. & B.Kahn	Compositae / Asteraceae	Kongokô safinin	Feuilles	
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	Kourousamanbrou	Feuilles	
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume.	Cannabaceae	Ensien (boualé)	Feuilles	
<i>Vismia guineensis</i> (L.) Choisy	Hypericaceae	Soungalani brou missemen (malinké)	Feuilles	
Recette n°9 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Bauhinia thonningii</i> Schum.	Leguminosae / Fabaceae	Nyamata (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Cassia sieberiana</i> DC.	Leguminosae / Fabaceae	Sindian (malinké)	Feuilles	
<i>Combretum molle</i> R.Br. ex G.Don	Combretaceae	Kongôkôroni (malinké)	Feuilles	
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	Rubiaceae	Djoun (dioula)	Feuilles	
Recette n°10 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	Koungbè (malinké)	Feuilles	Décoction du mélange de plantes (une botte de chaque plante)
<i>Hymenocardia acida</i> Tul.	Phyllanthaceae	Kongnondougougbô (dioula)	Feuilles	
<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn.	Leguminosae / Fabaceae	Soungbanfi (dioula)	Feuilles	
Recette n°11 (plante sèche)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Bobgunnia madagascariensis</i> (Desv.) J.H.Kirkbr. & Wiersema	Leguminosae / Fabaceae	So iri (malinké)	Feuilles	Décoction
Recette n°12 (plante sèche)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Combretaceae	Krêkêtè (malinké)	Feuilles	Décoction

Recette n°13 (fruit frais)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Picralima nitida</i> (Stapf) T.Durand & H.Durand	Apocynaceae	Diabètifla (dioula)	Fruit	1) Décoction : fruit entier découpé (avec péricarpe et graines) (plutôt en traitement du diabète) <i>ou</i> 2) Macération d'eau dans le fruit coupé en 2, débarrassé de ses graines, pendant 1 nuit
Recette n°14 (plantes sèches)	Famille	Nom vernaculaire (vendeuses)	Parties utilisées	Mode de préparation
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	Koungbè (malinké)	Feuilles	Décoction

La recette n°13, dans son second mode de préparation, a fait l'objet d'une étude spécifique, présentée dans la suite de ce manuscrit.

2.2. Plantes antipaludiques citées : analyse des données

La convergence des citations par les vendeuses a été analysée et est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7 : convergences des citations observées dans l'enquête

Famille	Espèce / drogue végétale	Préparation	Emploi	Nb de citation plantes	% citation famille
Apocynaceae	<i>Alstonia boonei</i> De Wild. / feuille	Décoction / Infusion	Voie orale / Bain / Purge	1	1,8 %
	<i>Picralima nititda</i> (Stapf) T.Durand & H.Durand / fruit frais	Décoction / macération	Voie orale	1	1,8 %
	<i>Periploca nigrescens</i> Afzel. / feuille	Décoction / pétrissage	Voie orale / Bain / Purge	1	1,8 %
Bixaceae	<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.f. ex Planch. / feuille	Décoction	Voie orale	1	1,8 %
Cannabaceae	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %
Combretaceae	<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel / feuille	Décoction	Voie orale	6	11,1 %
	<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr. / feuille	Décoction	Voie orale	6	11,1 %
	<i>Combretum molle</i> R.Br. ex G.Don / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %
Compositeae / Asteraceae	<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %
	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile / feuille	Décoction	Voie orale / purge / bain	2	3,7 %
Convolvulaceae	<i>Ipomoea asarifolia</i> (Desr.) Roem. & Schult / feuille.	Décoction / macération	Voie orale	1	1,8 %
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L. / feuille	Macération	Voie orale	3	5,5 %
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> L. / feuille	Décoction	Voie orale	1	1,8 %
Hypericaceae	<i>Vismia guineensis</i> (L.) Choisy / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %
Leguminosae / Fabaceae	<i>Cassia sieberiana</i> DC. / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %
	<i>Bauhinia thonningii</i> Schum. / feuille	Décoction	Voie orale	1	1,8 %

Famille	Espèce / drogue végétale	Préparation	Emploi	Nb de citation plantes	% citation famille	
	<i>Bobgunnia madagascariensis</i> (Desv.) J.H.Kirkbr. & Wiersema / feuille	Décoction	Voie orale	1	1,8 %	
	<i>Pericopsis laxiflora</i> (Baker) Meeuwen / feuille	Décoction	Voie orale	2	3,7 %	
	<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn. / feuille	Décoction	Voie orale	4	7,4 %	
Phyllanthaceae	<i>Hymenocardia acida</i> Tul. / feuille	Décoction	Voie orale	3	5,5 %	5,5
Poaceae	<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad. / feuille	Décoction	Voie orale	1	1,8 %	1,8
Rubiaceae	<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze / feuille	Décoction	Voie orale	4	7,4 %	11,1
	<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E.A.Bruce / feuille	Décoction	Voie orale / bain	2	3,7 %	
Sapindaceae	<i>Paullinia pinnata</i> L. / feuille	Décoction / macération	Voie orale / bain	3	5,5 %	5,5

Les familles les plus représentées étaient les Combretaceae (25,9 %), les Fabaceae (Leguminosae) (18,5 %), les Rubiaceae (11,1 %), les Compositeae (Asteraceae) (7,4 %), les Phyllanthaceae, Cucurbitaceae, Apocynaceae et Sapindaceae (5,56 %). Ces résultats concordent avec ceux ramenés par l'enquête de Sylla à Abidjan, où les familles les plus représentées étaient les Rubiaceae (9,3 %), les Combretaceae, Fabaceae (Leguminosae), Meliaceae (7,4 %), les Asteraceae (Compositeae), Phyllanthaceae et Apocynaceae (5,6 %) (Sylla, 2018). Ces résultats sont en accord avec l'analyse des données de la littérature générale présentée plus haut, avec comme familles les plus représentées les Fabaceae (Leguminosae) (10,6 %), les Apocynaceae (8,1 %), les Rubiaceae (7,7 %), les Asteraceae (Compositeae) (5,9 %) et les Euphorbiaceae (5,9 %).

Une comparaison des espèces avec celles recensées récemment par Sylla dans la ville d'Abidjan met en évidence 15 espèces en commun, soit 50 % des espèces recensées dans notre étude (Sylla, 2018). Il s'agit d'*Alstonia boonei*, *Anogeissus leiocarpa*, *Bauhinia thonningii*, *Cassia sieberiana*, *Cochlospermum planchonii*, *Combretum molle*, *Guiera senegalensis*, *Hymenocardia acida*, *Mitragyna inermis*, *Momordica charantia*, *Paullinia pinnata*, *Sarcocephalus latifolius*, *Trema orientalis*, *Vernonia amygdalina*, *Vernonia colorata*.

Une représentation graphique de ces convergences est proposée ci-dessous :

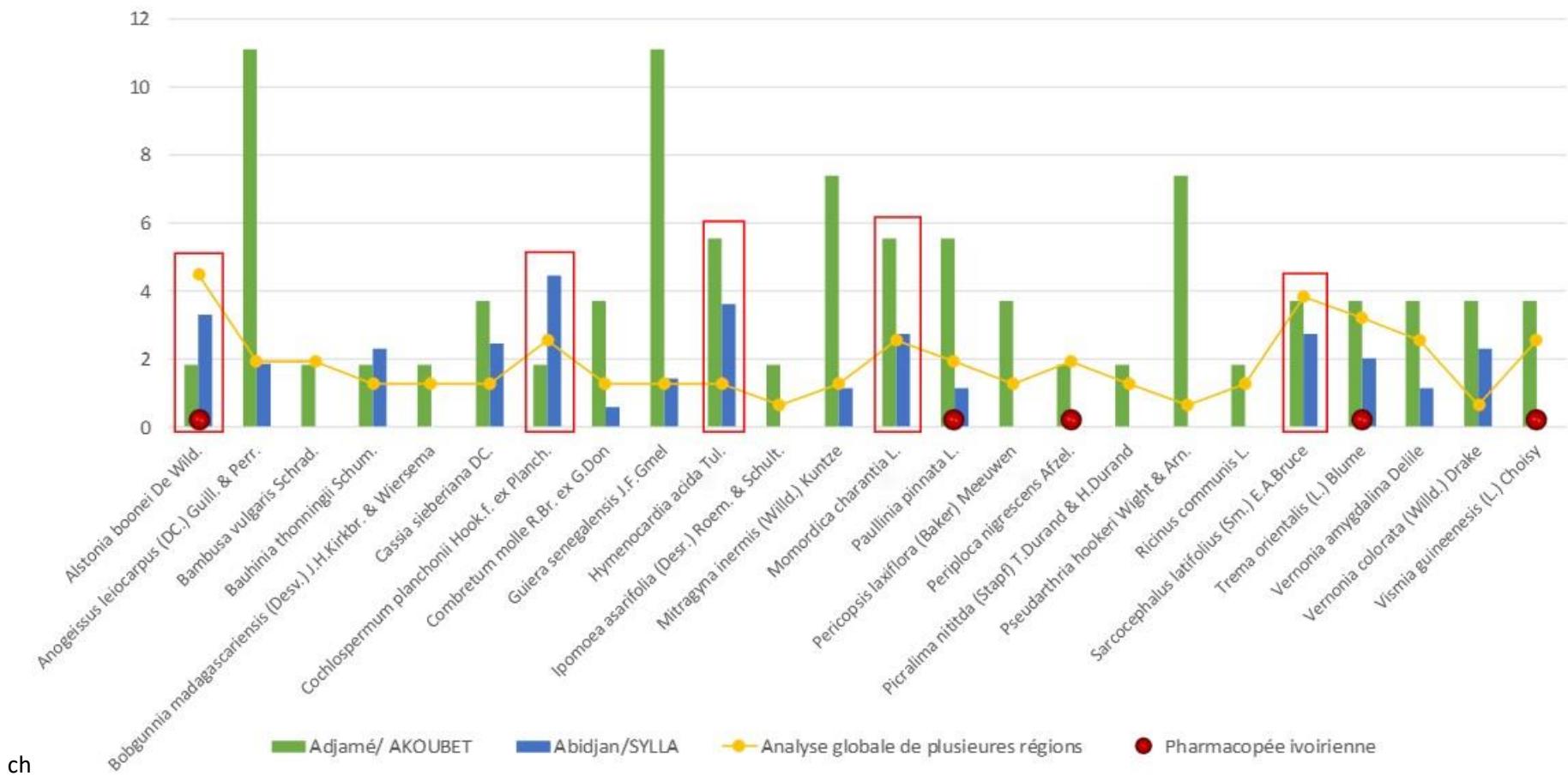


Figure 12 : Espèces recensées au marché d'Adjamé : convergence avec la littérature

Parmi les espèces retrouvées, 5 font l'objet de spécification dans l'ouvrage « La pharmacopée ivoirienne » et peuvent être considérées comme des plantes médicinales majeures dans le pays. Il s'agit d'*Alstonia boonei*, *Paullinia pinnata*, *Periploca nigrescens*, *Trema orientalis*, *Vismia guineensis*.

Sur les 14 recettes recensées au marché d'Adjame, dix étaient plurispécifiques (soit 71,4 %), constituées d'au moins trois plantes. Ces chiffres concordent avec ceux de Sylla *et al.*: les plantes recensées intervenaient dans 104 recettes médicamenteuses dont 22,1 % étaient monospécifiques et 77,9 % plurispécifiques (Sylla, 2018). Ces résultats confirment ceux de Kipré *et al.*, réalisés dans le département d'Agboville. Ces auteurs ont enregistré 62 % de recettes plurispécifiques. Selon eux, ces associations de plantes permettent de renforcer l'activité antiplasmodiale (Kipré, 2017). Contrairement aux résultats obtenus dans notre travail, ceux obtenus par Ouattara *et al.* à Divo et par Bla *et al.* à Toumodi ont indiqué que les recettes monospécifiques étaient majoritairement représentées avec respectivement des proportions de 87,5 % et 69,2 %. Ces derniers auteurs soutiennent que cette prépondérance est à l'avantage des patients car les associations de plantes mal assorties sont parfois dangereuses (Ouattara, 2006 ; Bla, 2015). Pour la majorité des recettes que nous avons recensées, la drogue était constituée par les feuilles (soit 92,3 %) : seul *Picralima nitida* était cité pour son fruit frais. Les travaux de Sylla *et al.* ont montré une plus grande diversité avec comme drogue les feuilles (68,89 %), les racines (13,96 %), les écorces de tiges (11,92 %), et la plante entière (3,79 %), les graines (1,16 %) ou la sève (0,29 %). Béné a rapporté comme parties des plantes utilisées les feuilles (y compris les rameaux feuillés) en majorité avec 63,96%. L'étude de Bla *et al.* a montré que parmi les diverses parties de plantes (écorces de racine et de tige, feuilles, rameaux feuillés) utilisées, les feuilles étant majoritaires (61,53 %) (Béné, 2016 ; Bla, 2015 ; Sylla, 2018).

La majorité des recettes étaient des décoctions préparées avec une botte de chaque plante (entre 100 et 200 g par botte) pour 1,5 litre d'eau, la référence étant en général une bouteille d'eau minérale de 1,5 L. La posologie était en général d'un verre (environ 200 mL) trois fois par jour. Seule la préparation à base de *Picralima nitida* était une macération, à raison d'un verre deux fois par jour. Sylla *et al.* rapportaient la décoction (76,97 %), la macération (18,09 %) et l'infusion (4,94 %). Chez Béné *et al.* également, la technique la plus employée est également la décoction (Béné, 2016).

2.3. Remarques relatives aux recettes

On peut constater une certaine similitude dans la composition des recettes. Les recettes n°1 et n° 8 ont 4 plantes en commun : *Vismia guineensis*, *Vernonia colorata*, *Trema guineensis* et *Paullinia pinata*. Les recettes n°5 et n°7 ont également 4 plantes en commun : *Guiera senegalensis*, *Anogeissus leiocarpus*, *Momordica charantia*, *Nauclea latifolia*. Les recettes n°3 et n°6 aussi ont 4 plantes en commun : *Anogeissus leiocarpus*, *Pseudarthria hookeri*, *Hymenocardia acida*, *Pericopsis laxiflora*.

Tableau 8 : Nombre de citations des espèces dans les recettes recensées

Plantes les plus citées dans les recettes	Recettes n°	Fréquence relative d'utilisation des plantes %	Convergence avec Sylla (Sylla, 2018)	Convergence avec N'Guessan (N'Guessan, 2009)
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr. (Combretaceae)	2, 3, 5, 6, 7, 12	42,8	X	
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel (Combretaceae)	1, 2, 5, 7, 10	35,7	X	
<i>Hymenocardia acida</i> Tul. (Phyllantaceae)	3, 6, 10	21,4	X	
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze (Rubiaceae)	2, 4, 6, 9	28,5	X	
<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	4, 5, 7	21,4	X	X
<i>Paullinia pinnata</i> L. (Sapindaceae)	1, 5, 8	21,4	X	
<i>Pericopsis laxiflora</i> (Baker) Meeuwen (Leguminosae / Fabaceae)	3, 6	14,2		
<i>Pseudarthria hookeri</i> Wight & Arn. (Leguminosae / Fabaceae)	3, 6, 7, 10	28,5		
<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E.A.Bruce (Rubiaceae)	5,7	14,3	X	X
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume (Cannabaceae)	1, 8	14,3		
<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake (Compositeae)	1, 8	14,3		
<i>Vismia guineensis</i> (L.) Choisy (Hypericaceae)	1, 8	14,3		
Total : 12 plantes	Total : 14 recettes			

Sur les 12 plantes les plus utilisées dans nos recettes, 7 apparaissaient également dans la constitution des recettes recensées dans la ville d'Abidjan, par Sylla *et al.* et par N'Guessan *et al.* Quatre 4 plantes sont inscrites dans le document de Pharmacopée ivoirienne.

Les résultats obtenus nous montrent que les plantes recensées au cours de notre enquête sont assez bien représentatives des habitudes traditionnelles dans la prise en charge du paludisme.

Bien que certaines plantes soient originaires des régions de savane (plutôt vers le nord du pays), elles sont entrées dans les habitudes de médications traditionnelles grâce à leur présence sur les marchés de plantes médicinales. En effet, les populations vivant dans la ville cosmopolite d'Abidjan ont conservé leurs savoirs traditionnels et l'ont « importé » sur les marchés de plantes médicinales, par l'intermédiaire des grossistes de plantes médicinales qui assurent le ravitaillement des revendeuses à des points précis des marchés de plantes (zones dites « de déchargement » (Kouamé, 2017)).

2.4. Activités antiplasmodiales décrites dans la littérature pour les espèces recensées

Plusieurs des plantes recensées dans notre enquête ont déjà fait l'objet d'études scientifiques relatives à leur emploi dans les crises de paludisme. Dans le tableau présenté en annexe 6, nous avons rapporté les résultats obtenus par d'autres auteurs (Tuo, 2015). Cette revue de la littérature nous a permis de noter que parmi les plantes que nous avons relevées au marché d'Adjamé, plusieurs ont fait l'objet de tests d'activité *in vitro* sur *Plasmodium falciparum*, qui ont révélé une activité effective, avec des Cl₅₀ parfois < à 1 µg/mL.

Ces tests viennent apporter une base scientifique qui confirme l'intérêt d'utiliser ces plantes contre le paludisme. Par exemple, en 2014 Anosa et al. rapportaient une Cl₅₀ de 0,126 µg/mL obtenue *in vitro* avec *Enantia polycarpa* (Annonaceae) (Anosa, 2014). Des résultats encourageants avaient déjà été obtenus en 1993 par Gasquet et al. au Mali avec le Malaria 5® : ce MTA constitué de *Cassia occidentalis* (Fabaceae), *Lippia chevalieri* (Verbenaceae) et *Spilanthes oleracea* (Asteraceae) a été testé *in vivo* sur des souris infectées par *Plasmodium berghei*, avec un ralentissement de la propagation de la parasitémie (Gasquet, 1993).

D'après la littérature, 16 plantes issues de notre enquête ont révélé une activité antiplasmodiale *in vitro* :

- 5 avec une Cl₅₀ < 1 µg/mL : *Guiera senegalensis* J.F. Gmel, *Vernonia colorata* (Willd.) Drake, *Cassia sieberiana* DC., *Sarcocephalus latifolius* (Sm.) E.A. Bruce et *Picralima nititda* (Stapf) T. Durand & H. Durand.
- 3 avec une Cl₅₀ < 5 µg/mL : *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr, *Mitragyna inermis* (Willd.) Kuntze, *Bambusa vulgaris* Schrad.
- 8 plantes avaient une activité modérée avec une Cl₅₀ > 5 µg/mL : *Combretum molle* R.Br. ex G. Don, *Vernonia amygdalina* Delile, *Trema orientalis* (L.) Blume, *Paullinia pinnata* L., *Cochlospermum planchonii* Hook.f. ex Planch., *Ricinus communis* L., *Momordica charantia* L., *Alstonia boonei* De Wild.

Les données de la littérature et les références sont rassemblées dans l'annexe 6.

Les plantes les plus citées dans les recettes recensées au cours de notre enquête étaient *Anogeissus leiocarpus* (fréquence relative : 42 % ; Cl₅₀ < 1 µg/mL), *Guiera senegalensis* (fréquence relative : 35 % ; Cl₅₀ < 1 µg/mL), *Mitragyna inermis* (fréquence relative : 28 % ; Cl₅₀ < 5 µg/mL). Les activités antiplasmodiales retrouvées dans la littérature pour ces espèces semblent justifier la composition des recettes traditionnelles. L'intérêt des recettes plurispecifiques, associant des plantes à activité potentiellement forte contre le *Plamodium* à des plantes à activité modérée, suggère des activités complémentaires ou possibles effets de synergie. Ceux-ci, non-encore mis en évidence, méritent d'être étudiés afin de mettre à profit l'association des plantes pour une meilleure prise en charge traditionnelle du paludisme.

3. Enquête relative aux produits manufacturés

On a vu que le ministère de la santé en Côte d'Ivoire a mis en place le PNPMT en 2001 (Arrêté N° 409/MSP, 2001). Cette structure technique dispose d'un logiciel d'information et de gestion des tradipraticiens de santé (dénommé ECOTPS), qui a été adopté par l'OOAS (Organisation Ouest Africaine de la Santé) pour servir de modèle dans la sous-région. En Côte d'Ivoire, tous les acteurs du secteur sont supposés être identifiés et enregistrés au PNPMT. Cet enregistrement permet la délivrance d'une carte comportant le numéro d'enregistrement, leur conférant une reconnaissance d'existence au niveau du ministère de la santé (Manouan, 2010). Selon le Dr. Benoît Banga N'Guessan, du laboratoire de physiologie, pharmacologie et phytothérapie de l'Université d'Abobo-Adjamé, qui est l'un des concepteurs de ECOTPS, ce logiciel a permis de recenser en 2014 plus de 8500 tradipraticiens de santé dans 12 régions administratives sur 31 en la Côte d'Ivoire.⁴

On a également vu que les produits manufacturés pouvaient être enregistrés par le Ministère de la Santé. En 2016, un recensement réalisé par Kroa *et al.* rapportait 456 médicaments traditionnels fabriqués en série et dispensés, toutes pathologies confondues, dans 15 centres de médecine traditionnelle (Kroa, 2008). Les formes galéniques prédominantes étaient les poudres (47,2 %) et les solutions buvables (27,4 %). Seulement 15 produits (3,28 %) étaient dédiés à la prise en charge du paludisme. Une étude portant sur l'évaluation de la qualité microbiologique de ce type de médicaments, réalisée par B. Coulibaly *et al.*, est citée plus haut (Coulibaly, 2018).

Les produits manufacturés issus de la médecine traditionnelle sont bien acceptés par la population. Il apparaît cependant que ces produits ne font en général pas l'objet d'un enregistrement ni ne répondent aux spécifications évoquées dans le chapitre précédent.

La seconde partie de notre enquête avait ainsi pour objet de recenser des médicaments traditionnels pour le traitement du paludisme préparé à l'avance, en série, potentiellement assimilables à des médicaments traditionnels améliorés de catégorie 2. Nous nous sommes intéressés à :

- des produits susceptibles d'être enregistrés par la direction de la pharmacie, et a priori commercialisés dans des centres de santé, à l'issu d'une consultation ;
- des produits déjà dans le commerce, notamment proposés sur des marchés.

La présentation et le degré de standardisation de ces produits ont été analysés. Un retour d'information aux fabricants est prévu afin de leur faire des recommandations, comme complément à ce travail de thèse.

Le premier volet de l'enquête a été mené de novembre 2016 à février 2017 à Abidjan, en collaboration avec le PNPMT.

Il s'agissait pour le programme tout d'abord de sensibiliser les tradipraticiens à la nécessité de faire connaître leurs médicaments traditionnels afin de les valoriser via une demande d'autorisation de commercialisation. L'appel lancé était focalisé sur le traitement du paludisme ; les fabricants ayant la certitude de l'efficacité de leur produit étaient invités à y participer. Après avoir été informés de l'objet de l'enquête, 55 tradipraticiens ont déclaré disposer de médicaments traditionnels actifs sur le *Plasmodium*. Finalement 24 praticiens ont répondu à l'appel et 21 d'entre eux ont fait acheminer leur produit, contre rémunération (coût du produit) : 21 recettes nous sont ainsi parvenues.

L'objectif était d'effectuer des tests, des contrôles et de faire des recommandations.

⁴ Le pays compte 31 régions organisées en 12 districts et 2 districts autonomes.

Un second volet de l'enquête relative aux produits manufacturés a consisté à collecter des médicaments traditionnels manufacturés vendus sur les marchés de la ville de Korhogo, au nord du pays, en Aout 2017. Ce lieu a été choisi à cause du nombre important de praticiens de médecine traditionnelle fabriquant et/ou commercialisant des produits sous des formes pharmaceutiques standardisées. La sélection des produits a été faite dans des boutiques dédiées, sur conseil des vendeurs de médicaments à base de plantes : 9 produits pour le paludisme ont été collectés.

Pour ce recensement, nous avons défini comme critères d'inclusion la présentation sous forme de produit fini standardisé, un conditionnement avec présence d'étiquette, une indication thérapeutique écrite.

Pour les deux types de recensements, nous avons utilisé une fiche de recueil où sont renseignées les informations sur la forme galénique, le type de conditionnement et les informations qu'on y retrouvait (étiquetage, indications, posologie, composition en plantes, dates de fabrication, et de péremption, numéros de lot et d'autorisation, contact, pays de fabrication).

3.1 Produits antipaludiques collectés

3.1.1. Produits déclarés suite à l'appel du PNPMT

Les données personnelles relatives aux 24 tradipraticiens ayant répondu à l'appel à produits du PNPMT demeurent confidentielles (79 % sont de sexe masculin).

Les 21 médicaments traditionnels manufacturés obtenus sont fabriqués en série. Ils provenaient de régions diverses de la Côte d'Ivoire et avaient des présentations diverses. Pour chacun des médicaments un code d'identification a été attribué par le PNPMT afin de conserver la confidentialité pour les tradipraticiens qui le souhaitaient. Ces produits sont ici numérotés de 1 à 21. Leur lieu de fabrication est présenté dans la figure suivante.

3.1.1.1. Présentation des produits déclarés suite à l'appel du PNPMT

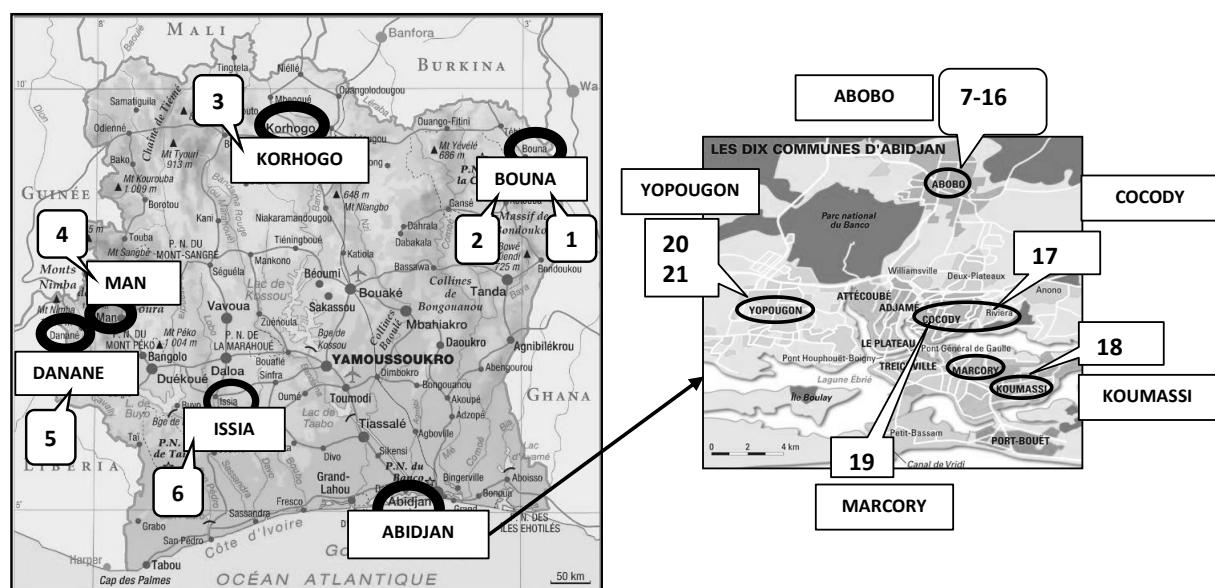


Figure 13 : Origine des médicaments traditionnels manufacturés reçus suite à l'appel du PNPMT

Les produits reçus, tels que commercialisés, sont présentés dans la figure 14 et le tableau 9 suivants. Onze d'entre eux étaient des formes sèches (52 %) : des poudres en vrac conditionnées en sachet ou en bouteille, destinées à la décoction ; 10 étaient des formes liquides. Des posologies figuraient sur les conditionnements ou ont été indiquées par les fournisseurs (un verre correspondant à un volume de 200 à 250 mL). Aucun de ces produits n'a pour l'instant fait l'objet d'un enregistrement (et aucun ne porte, donc, de numéro d'enregistrement).

Les formes liquides étaient manifestement toutes aqueuses. Conservées à température ambiante, elles sont susceptibles de développer des contaminations microbiennes (cet aspect aurait été intéressant à investiguer à réception). Aucun conservateur ne semblait être employé par les fabricants. Les produits ne portaient généralement pas de date de péremption ou de fabrication.

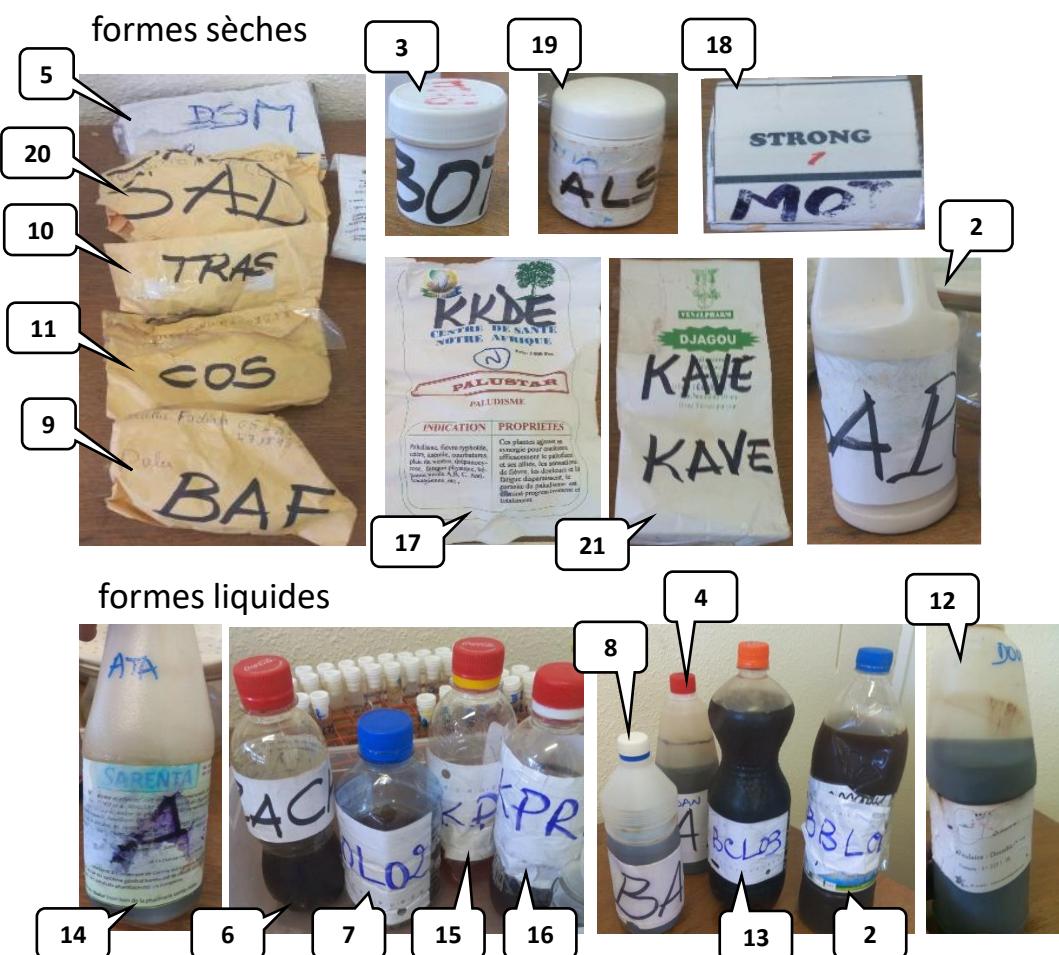


Figure 14 : Médicaments traditionnels manufacturés reçus à la suite de l'appel du PNPM (photos : A. Akoubet)

Tableau 9 : Posologies des médicaments traditionnels manufacturés reçus suite à l'appel du PNPM

N°	Code	Provenance	Forme	Posologie et schéma de prise (indications des fabricants)
1	DAN	Bouna	Liquide	Un verre à thé matin, midi et soir pendant trois à quatre jours pour les adultes ; un verre deux fois par jours pour les enfants
2	BAPO	Bouna	Poudre	Ajouter un litre d'eau à la poudre. Prendre un verre à eau du liquide deux fois : matin et soir pendant 7 jours chez l'adulte ; un demi-verre à eau matin et soir pendant trois jours chez l'enfant
3	BOT	Korhogo	Poudre	Une demi-cuillère à café matin, midi et soir pendant trois à quatre jours pour les cas simples et pendant sept jours pour les cas résistants ou chroniques
4	BBLO1	Man	Liquide	Un verre à thé par jour pendant trois jours pour le paludisme simple et pendant quatre jours pour le paludisme chronique
5	DSM	Danane	Poudre	Une cuillère à café dans un verre d'eau à prendre matin et soir pendant trois jours
6	ZACH	Issia	Liquide	Un verre à thé une fois par jour le soir après le repas pendant 7 jours
7	BOLO2	Abidjan-Abobo	Liquide	Un verre à eau du liquide deux fois matin et soir pendant 7 jours chez l'adulte et un demi-verre à eau matin et soir pendant trois jours
8	BABI	Abidjan-Abobo	Liquide	Préparer le contenu dans un litre d'eau et boire un verre à thé matin et soir pendant trois jours
9	BAF	Abidjan-Abobo	Poudre	Une cuillérée à soupe dans un demi-litre d'eau bouillante, laisser refroidir puis prendre un verre de thé matin, midi et soir pendant trois jours
10	TRAS	Abidjan-Abobo	Poudre	Deux cuillères à café dans une bouillie ou un verre d'eau tiède et prendre une fois par jour pendant sept jours
11	COS	Abidjan-Abobo	Poudre	Un verre à thé une fois par jour pendant six jours
12	DOUMO	Abidjan-Abobo	Liquide	Un verre à thé matin et soir pendant trois jours, mais poursuivre le traitement pendant douze jours pour les cas résistants
13	BCLO3	Abidjan-Abobo	Liquide	Une petite tasse à café le matin et soir pendant trois jours
14	ATA	Abidjan-Abobo	Liquide	Deux bouchons matin et soir pendant trois jours pour les cas simples, puis continuer le traitement avec un bouchon le matin pendant quatre à cinq jours pour les cas résistants ou chroniques
15	KPRA	Abidjan-Abobo	Liquide	un verre matin et soir pendant trois jours pour les cas simple et pendant sept jours pour les cas résistants et chroniques
16	KPRV	Abidjan-Abobo	Liquide	un verre matin et soir pendant quatre jours pour les cas simple et pendant cinq à six jours pour les cas résistants et chroniques
17	KKDE	Abidjan-Cocody	Poudre	Deux cuillères à soupe pour deux litres d'eau, faire bouillir pendant vingt minutes, laisser reposer et boire un verre matin et soir pendant trois jours
18	MOT	Abidjan-Koumassi	Poudre	Une cuillère à café dans un verre d'eau chaude et le boire matin et soir pendant sept jours pour les cas simples et mati, midi et soir pendant dix à quinze jours
19	ALS	Abidjan-Marcory	Poudre	Une petite cuillère à café rase matin et soir pendant trois jours
20	SAD	Abidjan-Yopougon	Poudre	Préparer le contenu dans un litre d'eau et boire un verre à thé matin et soir pendant trois jours
21	KAVE	Abidjan-Yopougon	Poudre	Une cuillère à soupe pour un verre d'eau chaude qu'on laisse refroidir et boire matin, midi et soir pendant trois jours pour les cas simples et pendant 10 jours pour les cas résistants ou chroniques

Les conditionnements comportaient les éléments rapportés dans le tableau 10 suivant :

Tableau 10 : Conditionnement et informations figurant sur les emballages des médicaments traditionnels manufacturés reçus à la suite de l'appel du PNPMT

N°	Code	Forme	Conditionnement	Imprimé	Indication et posologie	Composition	Date (fabrication ou péremption)	N° lot	Adresse du fabricant
1	DAN	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
2	BAPO	Poudre	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
3	BOT	Poudre	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
4	BBLO1	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
5	DSM	Poudre	Papier	NON	NON	NON	NON	NON	NON
6	ZACH	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
7	BOLO2	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
8	BABI	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
9	BAF	Poudre	Papier	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
10	TRAS	Poudre	Papier	NON	NON	NON	NON	NON	NON
11	COS	Poudre	Papier	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
12	DOUMO	Liquide	Bouteille plastique recyclée	OUI	OUI	NON	NON	NON	OUI
13	BCLO3	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
14	ATA	Liquide	Bouteille plastique recyclée	OUI	OUI	NON	OUI	NON	OUI
15	KPRA	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
16	KPRV	Liquide	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
17	KKDE	Poudre	Papier	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
18	MOT	Poudre	primaire papier ; secondaire carton	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
19	ALS	Poudre	Bouteille plastique recyclée	NON	NON	NON	NON	NON	NON
20	SAD	Poudre	Papier	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
21	KAVE	Poudre	primaire papier ; secondaire carton	OUI	OUI	NON	NON	NON	NON
				<i>Oui : 24 %</i>	<i>Oui : 24 %</i>	<i>Oui : 5 %</i>	<i>Oui : 14 %</i>	<i>Oui : 9 %</i>	<i>Oui : 33 %</i>

Généralement, les produits ne portent pas d'étiquette. On remarque que les posologies ne sont que rarement indiquées : elles sont transmises oralement aux patients. Il n'y a pas de notion de dose maximale.

Seul le produit n°17 (KKDE), porteur d'un nom de fantaisie (Palustar®) disposait d'une précision de sa formule qualitative : *Alstonia boonei* De Wild., Apocynaceae, *Mangifera indica* L., Anacardiaceae, et *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn., Phyllantaceae. Les parties employées ne sont pas précisées. Toutes ces plantes sont parmi les plus connues pour leur emploi traditionnel dans l'indication en Côte d'Ivoire, avec une convergence importante. L'insuffisance d'indication de la composition en plantes des recettes correspond à une certaine méfiance des tradithérapeutes. Néanmoins, dans le cadre de notre enquête, 8 tradithérapeutes (5 %) ont accepté de délivrer d'emblée la composition en plantes de leur recette. Celles-ci n'ont pas été rapportées pour respecter l'accord de confidentialité établi avec eux. Les produits contiennent de 1 à 4 plantes. Les espèces sont toutes mentionnées dans la littérature ethnobotanique et ont toutes relevées dans ce manuscrit, au titre de notre enquête ou des travaux ethnobotaniques récents cités. Ce sont toujours des plantes citées de manière très significative dans ce manuscrit.

Dans le cadre de notre étude, des tests d'activité antiplasmodiale ont été réalisées pour ces recettes. Les résultats sont présentés à la fin de ce chapitre.

3.1.2. Produits collectés dans le commerce

3.1.2.1. Obtention des produits

Des médicaments à base de plantes standardisés,⁵ dont la provenance était la ville de Korhogo, retrouvés sur les marchés à Abidjan, ont été collectés. Ils avaient été acheminés depuis cette ville, située au nord du pays. Faisant partie de la région des savanes, Korhogo bénéficie d'un climat chaud, favorisant la croissance d'espèces végétales très sollicitées en médecine traditionnelle. Sa proximité avec des pays tels que le Burkina Faso et le Mali favorise des échanges commerciaux ainsi que le développement d'activités commerciales autour des plantes médicinales. Des tradipraticiens ou de simples opérateurs économiques dans la région se sont investis dans le développement et la modernisation de ce secteur d'activité et proposent des produits manufacturés en grande série, parfois vendus sur internet. D'autres structures assurent la vente de phytomédicaments. C'est le cas de la structure nommée « Phytosalus », ONG créée à Ouagadougou au Burkina Faso, dédiée à la promotion la médecine traditionnelle. Cette structure a été enquêtée. Elle propose 293 médicaments traditionnels pour le traitement de diverses maladies. L'informatrice était une dame née en 1983, chargée de la vente des produits et travaillant seule. Concernant la prise en charge du paludisme, elle a proposé 4 médicaments traditionnels dont deux provenant d'un autre laboratoire : Phytofla. D'autre part, d'autres médicaments contre le paludisme ont été obtenus chez des herboristes au commerce moins formel. On notera qu'un produit présenté comme antipaludique, à base d'huile essentielle de lavande, a été obtenu dans une pharmacie d'Abidjan mais n'a pas été inclus dans notre étude.

⁵ Nous parlerons de phytomédicaments ou de MTA. Le terme « médicament » s'entend ici comme « composition destinée traiter ou prévenir une maladie ou présentée comme tel ». La présentation comme « compléments alimentaires » de tels produits n'est pas exclue.

On pourra se référer à l'article L5111-1 du Code de la santé publique français (2007) (accessible à : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/)

Produits obtenus chez Phytosalus :



Pradil-II®



PRADIL II
FAB DEC 2018



Malaria®



MALARIA
FAB 14/12/16
N° 918



Tisane saye®



Falsipar®

Produits obtenus dans des herboristeries ou auprès de vendeurs de rue :

- Formes liquides



Super Remo Forte®



Sirop de Vie®



Palu Fort®



Moringa oleifera®



Palutime®

- Formes sèches



Moringa Miracle®



Palustar®

Figure 15 : Médicaments traditionnels manufacturés achetés dans le commerce (photos : A. Akoubet)

3.1.2.2. Caractéristiques des produits collectés dans le commerce

Les caractéristiques des produits obtenus dans le commerce sont présentées dans les tableaux 11 et 12

Tableau 11 : Compositions et posologies des médicaments traditionnels manufacturés du commerce

Nom	Composition*	Nom vernaculaire	Indications	Posologie
Sirop de vie® Aloe vera Moringa	- <i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f., Xanthorrhoeaceae - <i>Moringa oleifera</i> Lam., Moringaceae + Kaolin	Aloes Moringa (<i>Mourou</i>) + Kaolin (<i>Calaba</i>)	Paludisme, hypertension artérielle, courbatures, troubles sexuels, infections urinaires, purification de l'organisme	1 verre à thé matin et soir avant le repas
Malaria®	« Calcinat végétal »	ND	Paludisme	Soins curatifs : 2 pincées X3/j /3j au cours du repas Soins préventifs : 2 pincées X1/j tous les 3 j au cours du repas
Moringa miracle®	- <i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f., Xanthorrhoeaceae - <i>Moringa oleifera</i> Lam., Moringaceae	Aloes Moringa (écorce, feuilles, graines)	Paludisme, rhumatismes, anémie, hypertension, diabète, ulcère	Adulte >18 ans : 1 cc/j dans du lait, sauce, bouillie, café...
Moringa oleifera®	<i>Moringa oleifera</i> Lam., Moringaceae	Moringa (feuilles)	Paludisme, aphrodisiaque	Non indiqué
Palu fort®	Non indiqué	Non indiqué	Paludisme, anémie, fatigue générale, grippe, fièvre, diarrhée, vomissements	1 verre à thé X3/j
Palustar®	- <i>Alstonia boonei</i> De Wild., Apocynaceae - <i>Mangifera indica</i> L., Anacardiaceae - <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn., Phyllanthaceae	Bois de fromage (<i>Amien</i>) Manguier (<i>Amango</i>) Phyllantus (<i>Sougnassi</i>)	Paludisme, fièvre typhoïde, ictere, anémie, courbatures, drépanocytose, fatigue, hépatite virale A, B, C	2 c à S pour 2 litres d'eau. Faire bouillir pendant 20 min. Laisser reposer et mettre dans un pot. Boire 1 verre X3/j

Palutime®	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Azadiracta indica</i> A.Juss., Meliaceae - <i>Senna occidentalis</i> (L.) Link, Fabaceae / Leguminosae - <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. et Thonn. - <i>Chrysantellum americanum</i> (L.) Vatke, Asteraceae / Compositae - <i>Lippia chevalieri</i> Moldenke, Verbenaceae 	<ul style="list-style-type: none"> Neem Cassia Phyllanthus Herbe aux fleurs d'or Lippia 	Traitement préventif et curatif du paludisme	<p>Soins curatifs : 5 j</p> <p>Enfants jusqu'à 5 ans : 1cc 3X/j ;</p> <p>Enfants 7-14 ans : 2 cc X3/j ;</p> <p>Adulte : 2c à S: X3/j</p> <p>Soins préventifs: 5 j tous les 2 mois</p> <p>Enfants jusqu'à 5 ans : 2cc 2X/j ;</p> <p>Enfants 7-14 ans : 2 cc X2/j ;</p> <p>Ad: 2c à S: X2/j</p>
Super Remo Forte®	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f., Xanthorrhoeaceae - <i>Borago officinalis</i> L., Boraginaceae - <i>Apium graveolens</i> L., Apiaceae - <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss, Apiaceae +Gelée royale, vitamines 	<ul style="list-style-type: none"> Aloes Bourrache Cèleri Persil +Gelée royale, vitamines 	Paludisme, tension, hémorroïdes, faiblesse sexuelle, grippe, infection urinaire	<p>2-12 ans : 1 c à S X2/j</p> <p>14 ans et plus : 1 verre à thé X2/j</p>
Tisane Saye®	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Cochlospermum planchonii</i> Hook. f. ex Planch., Bixaceae - <i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn., Phyllanthaceae - <i>Senna alata</i> (L.) Roxb., Fabaceae / Leguminosae 	<ul style="list-style-type: none"> N'dribala Phyllanthus Dartrier 	Paludisme, hépatite	<p>Adulte : boire un grand verre X3 /j.</p> <p>Enfant à partir de 7 ans : boire ½ grand verre X3 /j.</p>

* Les plantes étaient généralement désignées en français ou sous des noms scientifiques pouvant être incomplets (genre seul) ou non valides : une interprétation plausible est proposée dans cette table.

Pradil II et Falsipar® n'avaient pas de composition indiquée ; le vendeur les proposait dans la prise en charge du paludisme, mais cette indication n'était pas présente sur l'emballage. Ces produits n'ont pas été analysés.

Tableau 12 : Conditionnement et informations figurant sur les emballages des médicaments traditionnels manufacturés du commerce

Nom	Forme	Conditionnement	Etiquetage	Indication et posologie	Composition qualitative	Date de fabrication ou de péremption	N° lot	N° enregistrement	Adresse du fabricant	Pays d'origine
Palutime®	Liquide	primaire plastique	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	OUI	Burkina Faso
Palustar®	Poudre	secondaire + primaire plastique	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	Côte d'Ivoire
Tisane Saye®	Poudre	secondaire + primaire plastique	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	Burkina Faso
Moringa oleifera®	Liquide	primaire plastique	OUI	NON	OUI	NON	NON	NON	NON	non déterminé
Malaria®	Poudre	primaire plastique	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	Burkina Faso
Moringa miracle®	Poudre	primaire plastique	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	non déterminé
Super Remo Forte®	Liquide	primaire plastique	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	Côte d'Ivoire
Aloe vera Moringa sirop de vie®	Liquide	secondaire + primaire plastique	OUI	OUI	OUI	OUI	NON	NON	OUI	Côte d'Ivoire
Palu Fort®	Liquide	secondaire + primaire plastique	OUI	OUI	NON	OUI	OUI	NON	OUI	Côte d'Ivoire
			Oui : 89 %	Oui : 89 %	Oui : 67 %	Oui : 100 %	Oui : 67 %	Oui : 11 %	Oui : 89 %	Côte d'Ivoire : 4

Les produits contiennent de 1 à 5 plantes, associées à d'autres ingrédients dans 2 cas (kaolin, gelée royale, « vitamines » sans précision). Quatorze espèces végétales entrent dans la composition de ces 9 phytomédicaments. Les plus fréquentes (3 produits) étaient *Aloe vera*, *Moringa oleifera* et *Phyllanthus amarus*.

Comparativement aux éléments présentés précédemment :

- 2 plantes de ces formules (14,3 %) nous ont également été proposées au marché d'Adjamé : *Alstonia boonei* et *Cochlospermum planchonii* ;
- 7 espèces (50 %) étaient également citées dans l'enquête de Sylla et al. à Abidjan.
- 8 plantes (soit 57 %) ont été retrouvées dans l'analyse des données de la littérature ethnobotanique ivoirienne. Il s'agissait d'*Alstonia boonei*, *Azadiracta indica*, *Cochlospermum planchonii*, *Mangifera indica*, *Moringa oleifera*, *Phyllanthus amarus*, *Senna alata*, *Senna occidentalis*.

Tous les médicaments traditionnels portaient mention de la composition en plantes sur le conditionnement secondaire et/ou primaire, à l'exception de Palu fort® et Malaria® (non défini). Les parties de plantes n'étaient précisées que pour 2 phytomédicaments (*Moringa miracle*® et *Moringa oleifera*®, tous deux de composition simple). La composition quantitative n'est jamais mentionnée.

Tous les phytomédicaments mentionnaient une date de fabrication et une date de péremption ; six portaient un numéro de lot : Palutime®, Palustar®, Tisane saye®, Malaria®, *Moringa miracle*®, Palu fort® (soit 67 %). Sept (89 %) portaient une adresse et/ou un contact téléphonique et le pays de fabrication. Un seul médicament : la Tisane saye®, portait un numéro d'enregistrement, qui était une autorisation de mise sur le marché obtenu au Burkina Faso. L'importation de ce produit en Côte d'Ivoire n'a cependant pas fait l'objet d'un enregistrement ou d'une autorisation. On remarque l'absence d'enregistrement pour les produits d'origine ivoirienne, mettant en évidence un besoin de communication auprès des fabricants. La mise en place d'un cahier des charges relatif à l'enregistrement, s'il semble souhaitable, peut compliquer l'adhésion à ce système, en raison des difficultés pour les fabricants d'assurer la traçabilité, d'établir un système documentaire ou de réaliser des analyses qui seraient requises pour la constitution d'un dossier de demande d'enregistrement (du fait du manque de laboratoires spécialisés et du coût des analyses à effectuer ; voir annexes 1-4) (Kroa, 2008). Fort de ce fait, l'AIRP (ex-DPML) s'est assigné la tâche de mener la réflexion pour aider au mieux les opérateurs dans ce cadre, afin d'assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité (au moins suggérée sur la base de la tradition) de ces médicaments traditionnels améliorés (voir plus haut).

3.1.2.3. Produits collectés dans le commerce : composition au regard de la tradition

La comparaison de la composition des produits manufacturés avec les données ethnobotaniques ivoiriennes de la littérature et avec nos résultats d'enquêtes auprès des vendeuses du marché d'Adjamé montre des phénomènes de convergence forts (les plantes les plus fréquemment employées sont généralement les mêmes), sauf pour l'*Aloe vera*, le *Chrysantellum*, les Lamiaceae. On remarque que plusieurs des plantes employées ne possèdent a priori pas d'activité antipaludique. D'autre part, certaines nécessitent des précautions d'emploi, notamment chez l'enfant ou en cas de grossesse, qui ne figurent pas sur les produits. Une plante à alcaloïdes pyrrolizidiniques, potentiellement hépatotoxique, est présente (Bruneton, 2015).

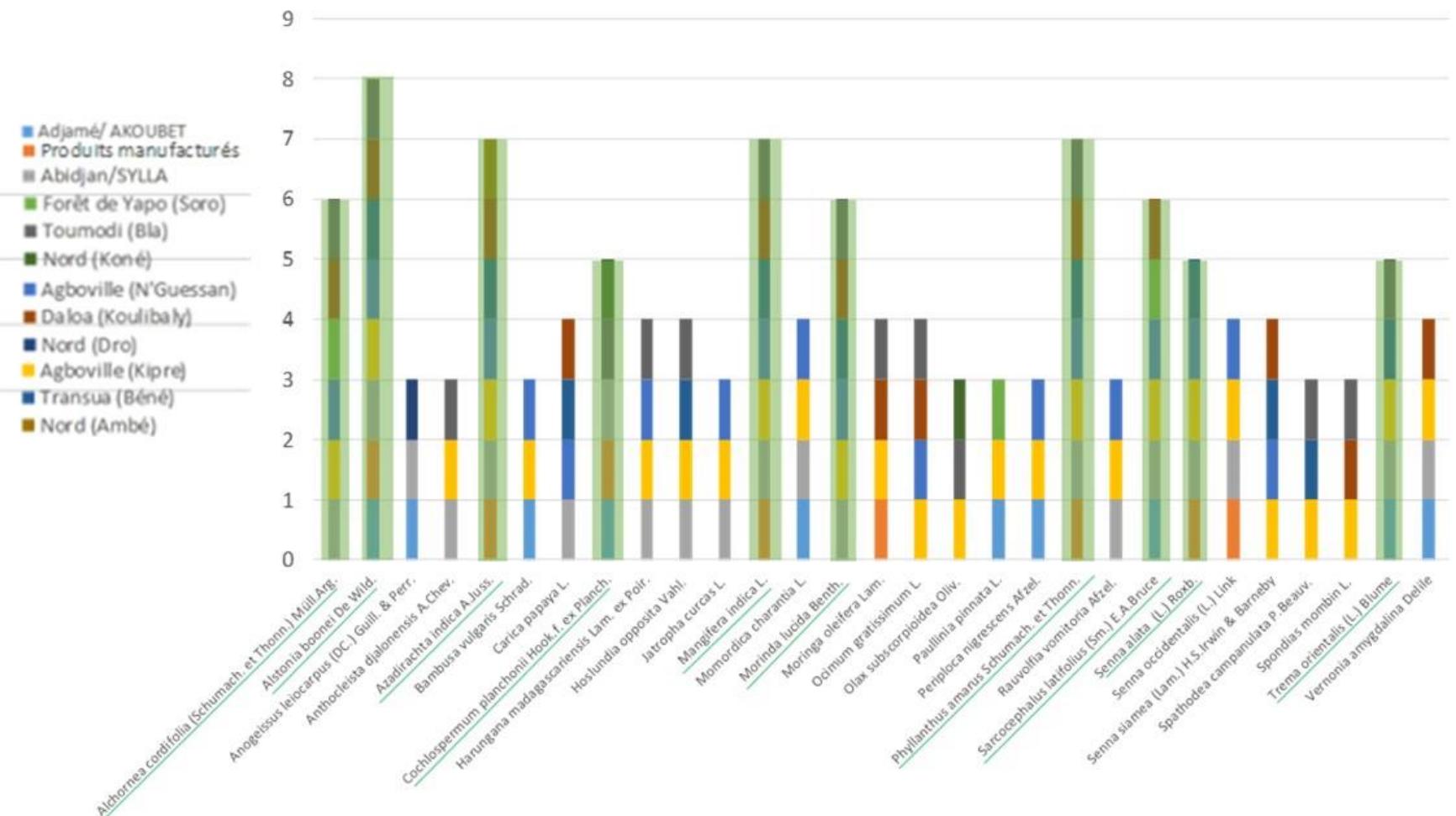


Figure 16 : Espèces constitutives des produits manufacturés du commerce : convergence avec la littérature

Sources : voir tableau 3 (chapitre 1)⁶

⁶ Ambe et al., 2002, ref. cit. ; Béné K. et al. 2016, ref. cit. ; Bla, 2015, ref. cit. ; Bla, 2015, ref. cit. ; Dro, 2013, ref. cit. ; Kipre et al. 2017, ref. cit. ; Koné W. et al. 2004, ref. cit. ; Koulibay A. et al. 2016, ref. cit. ; N'Guessan. 2008. ref. cit. ; N'Guessan et al. 2009, ref. cit. ; Soro S. et al., 2014, ref. cit. ; Sylla Y. et al., 2018, ref. cit.

3.2. Activité antipaludique des produits manufacturés

Les produits envoyés au PNPMT ont fait l'objet d'extractions dans le cas des poudres (destinées à la décoction ; en l'absence de lyophylisateur disponible au moment de la préparation des échantillons : extraction par un mélange eau / éthanol 1 :1 ; extraction par le méthanol) ; pour les formes liquides, une évaporation à siccité a été réalisée par entrainement azéotropique avec de l'éthanol, suivie d'une reprise du résidu dans un mélange eau / éthanol (1 :1). Les échantillons ont été évalués pour leur activité antiplasmodiale *in vitro*, sur plusieurs souches de *Plasmodium falciparum* (formes schizontes, endo-érythrocytaires). Les résultats sont exprimés dans le tableau 13. Une vérification de l'absence de caractère hémolytique des extraits, qui pourrait donner des résultats faussement positifs, a été réalisée visuellement.

Des tests ont ainsi été réalisés à l'hôpital Bichat par le Dr. S. Cojean, de l'équipe « chimiothérapie antiparasitaire » de l'UMR BioCIS, sur les souches 3D7 chloroquino-sensible et W2 chloroquino-résistante, avec une mesure par fluorescence de l'ADN du parasite après amplification par PCR, à 48 h. Des concentrations inhibitrices 50 % (IC_{50} , inhibition de 50 % de la croissance des parasites) ont pu être mesurées pour 14 des produits. Les résultats sont les suivants :

- Les extraits hydroéthanoliques de 5 recettes collectées par le PNPMT avaient une activité antiplasmodiale inférieure à 5 µg/mL sur la souche 3D7, dont 3 avec une valeur de IC_{50} inférieur à 1,5 µg/mL ;
- Les extraits hydroéthanoliques de 4 recettes avaient une activité inférieure à 25 µg/mL dont une (BOT, 3) avec une valeur de 1,5 µg/mL sur la souche W2 chloroquino-résistante.

D'autres séries de tests ont été réalisés par Mme Elizabeth Mouray, dans l'UMR 7245 du Muséum National d'Histoire Naturelle dirigée par le Pr. Philippe Grellier, sur la souche Fcb1 chloroquino-résistante, par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée, à 72 h. Les extraits ont été testés à une ou deux concentrations données, permettant de mesure une inhibition de croissance exprimée en %. Les extraits les plus actifs ont fait l'objet d'une évaluation de IC_{50} . Sur cette souche, 9 produits montrent une inhibition de croissance supérieure à 75 % pour des concentrations d'extraits (ou de lyophylisats) de 100 µg/mL. A 10 µg/mL, seule la recette n°3 (BOT) montre une activité importante.

On note des différences d'activité importante entre les 2 séries de tests. La majorité des MTA proposés pour enregistrement présente une activité antiplasmodiale potentielle, sur au moins une souche. Les formules DAN (n°1), ZACH (n°6), BOLO2 (n°7), BABI (n°8), KPRV (n°16) n'avaient pas d'activité, ou une activité marginale. L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt possible de la plupart recettes, sous réserve de confirmation par des tests *in vivo*, voire d'études cas-contrôle chez des patients des tradithérapeutes dépositaires des recettes. Les conclusions relatives aux plantes support d'activité ne peuvent pas être proposées à ce stade en raison de la clause de confidentialité établie avec les tradithérapeutes.

A l'exception de la tisane SAYE, active sur la souche Fcb1, les MTA collectés dans le commerce restent à évaluer suivant les mêmes méthodes. Les extraits ont été préparés.

Tableau 13 : Activités antiplasmodiales in vitro des MTA collectés par le PNPMT

MTA collectés avec le PNPMT			<i>P. falciparum</i> Fcb1 : % inhibition		<i>P. falciparum</i> Fcb1	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> W2
n°	code	Type d'extrait	10 µg/mL	100 µg/mL	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ ± EC (µg/mL)	Cl ₅₀ ± EC (µg/mL)
1	DAN	(lyoph.)	3	39		>100	>100
2	BAPO	EtOH/H ₂ O	13	85		>100	>100
2	BAPO	MeOH	3	88		>100	>100
3	BOT	EtOH/H ₂ O	74	99		nd	nd
3	BOT	MeOH	90	98	< 1,5	1,56 ± 0,23	1,55 ± 0,2
4	BBLO1	(lyoph.)	22	97	9,5	11,32 ± 3,41	18,37 ± 2,97
5	DSM	EtOH/H ₂ O	10	61		3,07 ± 0,52	52,54 ± 4,64
5	DSM	MeOH	3	63		23,29 ± 2,45	39,35 ± 4,8
6	ZACH	(lyoph.)	7	36		>100	>100
7	BOLO-2	(lyoph.)	nd	7		>100	>100
8	BABI	(lyoph.)	nd	Nd		>100	>100
9	BAF	EtOH/H ₂ O	9	57		>100	>100
9	BAF	MeOH	9	74		nd	nd
10	TRAS	EtOH/H ₂ O	0	31		9,42 ± 1,02	6,0 ± 1,90
10	TRAS	MeOH	0	75		89,20 ± 4,6	>100
11	COS	EtOH/H ₂ O	14	67		5,25 ± 1,27	17,94 ± 3,78
11	COS	MeOH	3	81		11,57 ± 1,18	22,6 ± 1,83
12	DOUMO	(lyoph.)	nd	12		19,9 ± 0,20	>100
13	BCLO3	(lyoph.)	7	21		11,93 ± 1,89	57,75 ± 6,73
14	ATA	(lyoph.)	1	31		1,53 ± 0,20	27,32 ± 5,69
15	KPRA	(lyoph.)	1	32		12,72 ± 1,52	19,49 ± 3,89

MTA collectés avec le PNPMT			<i>P. falciparum</i> Fcb1 : % inhibition		<i>P. falciparum</i> Fcb1	<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. falciparum</i> W2
n°	code	Type d'extrait	10 µg/mL	100 µg/mL	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ ± EC (µg/mL)	Cl ₅₀ ± EC (µg/mL)
16	KPRV	(lyoph.)		16		>100	>100
17	KKDE	EtOH/H₂O	18	98		74,56 ± 6,25	>100
17	KKDE	MeOH	4	97	34	>100	>100
18	MOT	EtOH/H₂O	9	93		26,8 ± 3,29	24,09 ± 6,38
18	MOT	MeOH	8	95		12,8 ± 1,38	21,52 ± 5,15
19	ALS	EtOH/H ₂ O	0	50		>100	>100
19	ALS	MeOH	0	74		13,12 ± 1,57	13,86 ± 4,35
20	SAD	EtOH/H ₂ O	2	66		23,45 ± 1,49	48,17 ± 5,15
20	SAD	MeOH	7	98	24,5	12,69 ± 1,3	20,8 ± 5,01
21	KAVE	EtOH/H₂O	6	97	25	37,37 ± 4,17	>100
21	KAVE	MeOH	1	95		1,54 ± 0,26	31,45 ± 9,09
MTA manufacturé	Tisane SAYE	EtOH/H ₂ O	14	98	A déterminer	nd	nd
Témoin	Chloroquine		à 64 nM* : 0	-	30 nM (9,59 ng/mL)	5,92 ± 0,21 nM	38,71 ± 1,46 nM

* moyenne de 12 valeurs sur les 2 séries.

nd : non déterminé ; EC : écart-type.

MTA sous forme liquide : lyophilisation (indiquée « lyoph. »), pas d'extraction réalisée.

En gras : les extraits ayant montré une activité notable (> 75 % d'inhibition à 100 µg/mL sur la souche Fcb1 et/ ou Cl₅₀ < 10 µg/mL sur 3D7 et / ou W2).

Le graphique suivant indique le pourcentage des MTA dont au moins un extrait a présenté une activité dans les tests *in vitro* (seuils d'activités considérés, souches : voir figure 17) (Agbodeka, 2017).

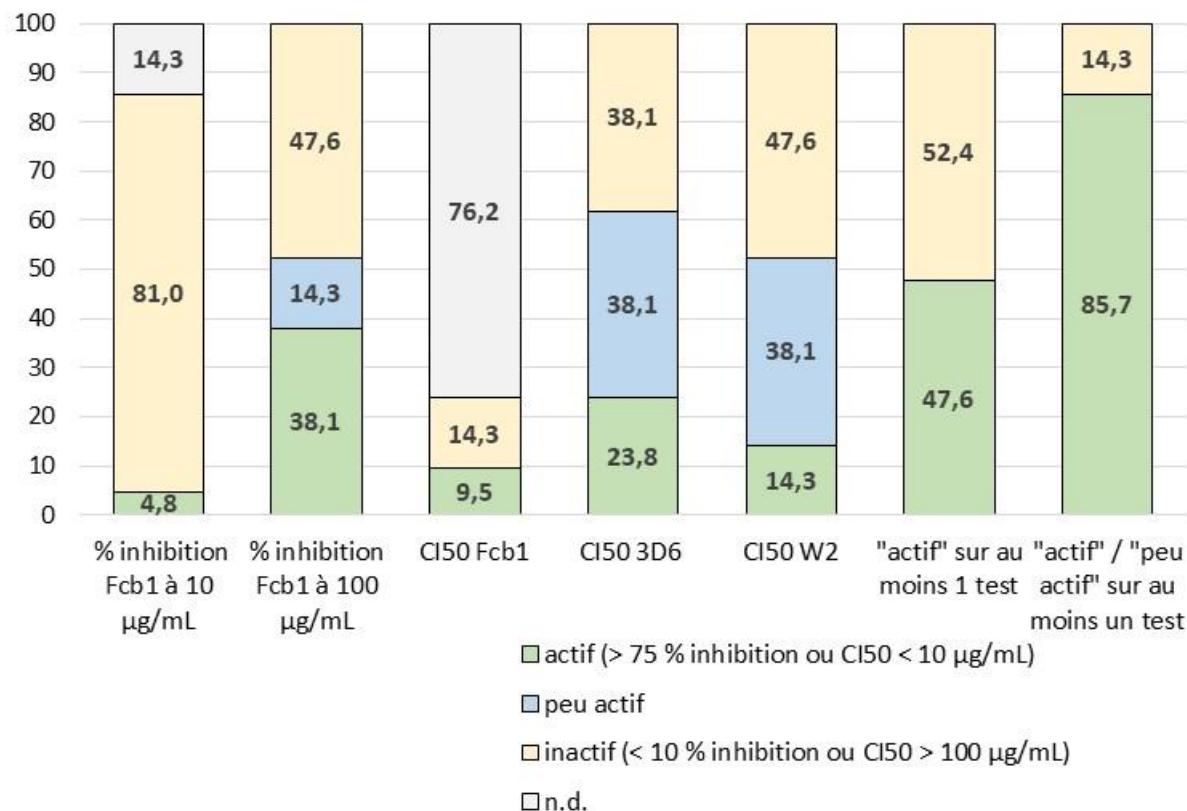


Figure 17 : Activités antiplasmodiales *in vitro* des MTA collectés par le PNPMT : résumé, en % pour 21 produits

4. Conclusion et perspectives des enquêtes ethnobotaniques

En résumé, pour nos travaux d'ethnobotanique portant sur des plantes et recettes antipaludiques :

- Une analyse de la littérature ivoirienne publiée, comparant les données collectées dans plusieurs régions du pays, a été réalisée, mettant en évidence des convergences d'usage notables (chapitre 1). Une comparaison avec les données de la littérature portant sur l'évaluation de l'activité antiplasmodiale des plantes relevées par nous et les auteurs indique la pertinence globale de la sélection traditionnelle. Les résultats de notre enquête montrent une bonne convergence.
- Une enquête de terrain a été menée auprès de vendeuses du marché aux plantes médicinales d'Adjame (Abidjan), ayant permis de relever 14 recettes, avec généralement des associations de plantes. Des herbiers de référence ont été constitués, pour usage par le Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT) (cet herbier, présenté dans le cadre du mémoire sanctionnant le D.U. d'ethnobotanique de Lille, n'est pas inclus dans le manuscrit).

- Un appel à contribution pour enregistrement de MTA a été mené en partenariat avec le PNPM, auprès des tradipraticiens ivoiriens : 21 recettes, de composition à ce stade confidentielle, ont pu être obtenues. Les produits collectés sont déjà produits de manière générique. La mesure d'activités antiplasmodiales *in vitro* suggère un choix de plantes pertinent pour la majorité des produits (la majorité présente une activité inhibitrice sur la souche Fcb1 ; seuls 3 ne présentent pas d'activité antiplasmodiale). Il est important de rappeler le caractère indicatif mais non démonstratif de l'évaluation *in vitro* (Houghton, 2007).
- Une collecte de MTA commercialisés en Côte d'Ivoire a été réalisée. Elle a permis l'obtention de 11 produits portant pour indication le traitement du paludisme. Quatre sont produits en Côte d'Ivoire mais n'ont pas été enregistrés par les autorités sanitaires. Parmi les produits importés, aucun n'a obtenu d'agrément ivoirien et un seul semble enregistré par des autorités nationales. Une analyse de l'étiquetage a été effectuée. La majorité des plantes employées a fait l'objet d'évaluations antiplasmodiales positives, au moins *in vitro*, d'après la littérature.
- Ces produits ont un degré de standardisation variable. Il n'y a pas de composition quantitative. On remarquera qu'aucun n'est proposé sous forme de dose, mais que des posologies sont proposées.

La convergence avec la littérature ethnobotanique est nette pour l'ensemble de ces résultats. A notre connaissance, les plantes relevées ne figuraient pas sur la liste rouge des plantes menacées de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) pour la Côte d'Ivoire. D'autre part, notre travail met en évidence, comme celui d'autres auteurs, des problèmes potentiels de qualité au niveau du stockage des plantes, et pose la question de la conservation des produits manufacturés sous forme liquide.

L'approche ethnobotanique réalisée ici est originale car :

- elle s'intéresse à des produits manufacturés et/ou réalisés en série, avec un degré de standardisation variable ;
- elle a été menée en partenariat avec les autorités sanitaires ivoiriennes ;
- elle sert de base à une réflexion sur des exigences raisonnablement applicables aux acteurs du secteur des produits à base de plantes ivoiriens. Notre travail se poursuit actuellement, avec la proposition d'un référentiel qui pourrait venir se substituer aux règles actuellement proposées par la direction de la pharmacie : celles-ci rendent en effet très difficiles l'enregistrement par des petits acteurs. Parmi nos propositions, les principales sont :
 - o la mise en place de systèmes documentaires visant à assurer une traçabilité chez les tradipraticiens, dans les centres de santé ou unités de fabrication ;
 - o la proposition d'un étiquetage standardisé comportant notamment des mises en garde, sur la base des données bibliographiques ;
 - o la mise en place de garanties relatives à l'identité des plantes majeures, au moins sur une base d'examen d'identité botanique ; le recours à la microscopie serait utile le cas échéant (ce travail a été commencé au cours de cette thèse) ;
 - o le soutien à une standardisation qui pourrait passer par un contrôle semi-quantitatif par CCM, s'appuyant sur l'ouvrage récent « pharmacopée ivoirienne » (une contribution à l'amélioration des monographies par les laboratoires de phytochimie du pays est à envisager) ;

- la mise en place d'une charte de bonnes pratiques, les Bonnes Pratiques de Fabrication telles que définies par l'EMA (par exemple) semblant difficiles à appliquer, et la production de MTA étant déjà effective.

Notre travail n'a pas été achevé pour plusieurs points, et les perspectives sont nombreuses :

- une partie des tests biologiques reste à effectuer (MTA du commerce) ;
- les analyses chimiques des recettes manufacturées (produits envoyés au PNPMT, produits collectés dans le commerce) sont à finaliser. Tous les MTA ont été extraits. Toutes les plantes constitutives ont été obtenues, avec une vérification de l'authenticité des échantillons en partenariat avec l'herbier national. Toutes ces plantes ont également été extraites. Les extraits (MTA, plantes) ont été partiellement analysés par CLHP-UV-MS/MS. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de finaliser la comparaison des extraits obtenus pour les formules et les plantes constitutives. Le but de cette démarche est de vérifier que les plantes annoncées sont bien présentes dans les produits (i.e. identifiées sans erreurs par les acteurs de terrain et les intermédiaires), malgré les problèmes inhérents au faible contrôle des chaînes de valeur. Ces données pourraient également relever la présence de contaminants observables par CLHP-MS. La méthodologie proposée est une approche par la technique des réseaux moléculaires (voir le chapitre suivant), qui permet une mise en évidence visuelle des composés communs ou non à différents extraits. Les premiers réseaux ont été obtenus mais ne sont pas montrés ici : nous n'avons pas jugé le traitement des premières données suffisamment satisfaisant.

Dans l'optique d'une finalisation de ce travail, nous avons pu obtenir cette année un financement auprès du PASRES (Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique), incluant les fonds nécessaires pour :

- un séjour post-doctoral, pour l'analyse des données obtenues par CLHP-MS/MS – réseaux moléculaires,
- le travail de 2 étudiants en M2, pour l'implantation d'une base de données simple (emplois validés ou non par la littérature / contribution au contrôle d'identité botanique / procédures de gestion des entrées et sorties de plantes / documentation / bonnes pratiques de stockage et conservation) pour les exploitants tradipraticiens. Les préconisations de l'OMS (2002) présentées en annexe constituent une base de travail et doivent être rendues accessibles aux acteurs. La formation est à envisager, dans ce cadre. Elle pourrait tirer partie des modes de communications modernes (vidéos didactiques courtes sur les réseaux sociaux, etc.).
- La contribution d'étudiants en thèse d'exercice de pharmacie est envisagée pour la constitution de compléments aux CCM de référence de la pharmacopée ivoirienne. Une interface avec les données de CLHP MS/MS serait utile pour l'identification des produits.
- Un volet d'analyses microbiologiques (plantes des marchés, produits manufacturés) serait à adjoindre, afin d'avoir un aperçu de l'état du marché.

Ces travaux sont à mener autant que possible en partenariat étroit avec le PNPMT et l'Agence Ivoirienne de Réglementation Pharmaceutique (AIRP), mais aussi avec les associations de tradipraticiens.

Chapitre 3 : Travaux personnels – Etude de remèdes à base
du fruit de *Picralima nitida*

Introduction

Picralima nitida (Stapf) T.Durand & H. Durand (Apocynaceae), arbre des forêts d'Afrique tropicale, est une plante utilisée classiquement en médecine traditionnelle comme antipaludique (Ledouble, 1964). Son activité est associée à la présence d'alcaloïdes indolomonoterpéniques. Une préparation traditionnelle antipaludique originale, parfois utilisée en Côte d'Ivoire, a été mentionnée au cours de notre enquête au marché d'Adjame : elle exploite la pulpe de son fruit, par macération, alors que c'est généralement l'écorce de tronc ou les graines qui sont employées. Cette préparation a fait l'objet de nos investigations. Nous avons également étudié des décoctions du fruit, autre forme employée traditionnellement. Nous avons aussi essayé de caractériser les potentielles variations de composition de ce fruit.

L'organisation de ce chapitre est le suivant :

Les données bibliographiques relatives à *P. nitida* sont d'abord présentées, suivies de la présentation de nos travaux expérimentaux (partie 1).

Après une caractérisation micrographique du fruit afin d'identifier des éléments caractéristiques (partie 2 et annexe 8), nous avons entrepris une déréplication en CLHP-MS/MS de la préparation traditionnelle dans le but de vérifier la présence d'alcaloïdes indolomonoterpéniques justifiant d'éventuelles propriétés antipaludiques et d'établir le profil de ceux-ci (partie 3). Une comparaison avec une base de données spectrales a permis l'identification des composés principaux. Une comparaison des deux modes de préparations (macération, décoction) a été menée. Une analyse comparative de plusieurs lots de fruits de provenances et de périodes de récolte différentes a été réalisée afin d'investiguer une éventuelle variabilité des extraits traditionnels. Une comparaison des profils chromatographiques des pulpes, des péricarpes et des graines est également proposée (partie 4 pour ces travaux exploitant l'UHPLC-MS/MS et une approche métabolomique ; le bilan des extraits analysés au cours de ces différentes étapes figure en introduction de la partie 4).

Le dosage des alcaloïdes totaux et celui d'alcaloïdes spécifiques a été ensuite effectué sur les extraits traditionnels afin d'évaluer la quantité d'alcaloïdes susceptible d'être ingérée par un patient utilisant le fruit de *P. nitida* (parties 4.2.5 et 4.2.6).

Enfin, notre investigation s'est poursuivie par une évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* des différents extraits, puis *in vivo* pour l'extrait aqueux d'un lot, comparé à un extrait de péricarpe (partie 5). Le but de cette évaluation était de vérifier la pertinence de la tradition, mais également d'évaluer si les préparations étudiées pouvaient constituer des candidats au développement de MTA issus d'un organe végétal renouvelable et accessible.

1. Données bibliographiques relatives à *Picralima nitida*

1.1. Présentation de l'espèce, botanique

Picralima nitida (Stapf) T. Durand & H. Durand est une Apocynaceae (Gentianales), unique représentant de son genre (The Plant List, consulté en mai 2021). Ses synonymes sont *Picralima klaineana* Pierre, *Picralima macrocarpa* A.Chev. et *Tabernamontana nitida* Stapf.

Les autres espèces du genre ont été reclassées :

- *Picralima elliotii* (Stapf) Stapf, *Picralima gracilis* A.Chev. (invalidé) et *Picralima umbellata* (K.Schum.) Stapf sont des synonymes de *Hunteria umbellata* (K.Schum.) Hallier f. ;
- *Picralima laurifolia* A.Chev. (invalidé) est un synonyme de *Hunteria simii* (Stapf) H.Huber.

C'est un petit arbre allant parfois jusqu'à 20 m de haut, au tronc d'un diamètre de 40 cm. Son bois dur et élastique, de couleur jaune, est utilisé par les populations locales pour fabriquer des navettes, des peignes et de menus objets. Ses feuilles, oblongues ou elliptiques, sont courtement acuminées, arrondies ou obtuses à la base et luisantes à la face supérieure. Elles mesurent entre 15 et 26 cm de long et 5 à 10 cm de large, et sont traversées par de nombreuses nervures latérales parallèles, plutôt effacées. Ses fleurs sont organisées en inflorescences terminales, ombelliformes, courtement pédonculées, dont les pédicelles mesurent entre 7 mm et 1,5 cm. Le calice formé de 5 lobes triangulaires mesure environ 8 mm. La corolle est constituée d'un tube cylindrique bombé à la partie supérieure, atteignant 2 cm de long. Les fleurs apparaissent en mai-juin. Sa fructification est saisonnière et a lieu principalement au mois de Novembre (Alexandre, 1980). Les fruits sont de forme ellipsoïde et sont solitaires ou par 2. Ils peuvent mesurer jusqu'à 15 cm de long et 12 cm de large. Ils contiennent de nombreuses graines aplatis, d'environ 2 cm de long.



Figure 18 : *Picralima nitida*
(Source photographique : TelaBotanica)

La plante est strictement tropicale et africaine, retrouvée de la Côte d'Ivoire jusqu'à l'Ouganda, à la République Démocratique du Congo et la région de Cabinda (Angola) (Ressources végétales de l'Afrique Tropicale, site consulté en mars 2019). En Côte d'Ivoire elle est notamment et historiquement retrouvée dans les régions d'Agboville, Anoumaba, et Bongouanou (Aubreville, 1959).

1.2. Emplois

1.2.1. Emplois médicinaux

La plante fait l'objet d'usages variés, notamment dans la prise en charge de pathologies diverses. Très souvent employée comme fébrifuge et remède contre le paludisme, elle est également citée dans la prise en charge de la douleur, de la pneumonie, des vers intestinaux. Sa réputation d'antimalarique est attestée de manière ancienne (années 1910-1920) et a été forte, avant une mise en doute de son intérêt réel dans les années 1950 (Hamet, 1951). Les organes les plus utilisés sont les graines, puis l'écorce de tige et les racines, sous forme broyée, mâchés ou consommés en décoction. Le fruit n'est que peu cité.

En Côte d'Ivoire, au Bénin et au Nigeria, les décoctions s'utilisent contre la jaunisse, la rougeole, par voie orale ou en lotion. Les graines sont utilisées pour traiter la hernie, les vomissements ou la diarrhée, sous forme broyées avec du jus de citron, par voie orale. Le broyat s'applique également sur les abcès ou est mélangé au beurre de karité en friction du ventre dans le traitement des leucorrhées. Au Ghana, les graines sont mâchées comme tonifiant et stimulant ; le décocté de graines s'emploie en lavement comme analgésique et celui des feuilles sèches s'utilise pour traiter le ver de Guinée. Les fruits sont utilisés au Cameroun sous forme de décocté pour soigner la toux et la fièvre typhoïde. L'écorce de tige remplace le fruit pour ces symptômes en République Démocratique du Congo. Au Gabon, le fruit et l'écorce de tige mâchés en petites quantités permettent de calmer la faim. Le décocté d'écorce avec du sucre permet de lutter contre les empoisonnements alimentaires ou les maladies vénériennes, alors qu'il est utilisé comme purgatif au Congo, ou comme traitement des hernies, des otites et des gonorrhées en association avec d'autres plantes. Il est également cité comme remède contre la stérilité.

1.2.2. Emplois non médicinaux

Des emplois comme toxique sont répertoriés : les racines et les graines broyées ou la pulpe de fruits rentrent dans la composition de poisons de flèche. Au Ghana et au Congo, les fruits immatures écrasés se jettent dans l'eau pour servir de poison pour la pêche (Hamet, 1951).

Le bois est très utilisé. Dur et élastique, il se polit bien et est utilisé pour la confection de petits ustensiles (pagaies, navettes de tissage, poupées, peignes, bâtons de marche, pilons, mortiers, supports à encens, arcs et flèches, manches de pelle, cuillers. L'écorce dure du fruit sert également à fabriquer des cuillers et de petites louches.

1.2.3. Production et commerce international

La plante fait l'objet d'un commerce international de ses graines séchées et/ou réduites en poudre. Au Ghana, la poudre de graines séchées est encapsulée et commercialisée sous le nom de "gélules de Picap®", et utilisée pour traiter la diarrhée et les douleurs. Au Cameroun, les graines, l'écorce de tige et les fruits sont couramment vendus sur les marchés. En 2002, le prix du marché était d'environ 2400 Fcfa (environ US\$ 5) pour 550 g de graines et d'écorce (Ressources végétales de l'Afrique tropicale, site internet consulté en mars 2019).

Dans certaines recettes traditionnelles, il arrive que les parties de *Picralima nitida* soient substituées par celles d'autres plantes. Au Cameroun par exemple, l'écorce de tige est souvent remplacée par celle d'*Alstonia boonei* De Wild., utilisée pour traiter la fièvre typhoïde, la jaunisse et le paludisme comme nous l'avons vu précédemment (Ressources végétales de l'Afrique tropicale, site internet consulté en

mars 2019). Les feuilles et l'écorce de *Thomandersia hensii* De Wild. & T.Durand, les feuilles et les racines de *Mangifera indica* L. et les racines de *Carica papaya* L. servent parfois d'antipaludique et de fébrifuge à la place de *Picralima nitida*.

1.3. Composition chimique

Picralima nitida contient des alcaloïdes indolomonoterpéniques qui sont caractéristiques des Gentianales (familles des Rubiaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Gelsemiaceae). Ils sont présents dans une partie des Apocynaceae (sous-famille des Rauvolfioideae) (Nazar, 2013). Ils sont tous issus du même précurseur, la strictosidine, qui donne naissance à plus de 3000 dérivés (Fox, 2019). Ces molécules présentent des activités pharmacologiques majeures, qui justifient des emplois de nombreuses plantes en médecine traditionnelle, ainsi que des emplois anciens ou actuels en biomédecine occidentale de molécules isolées (ajmalicine (raubasine), quinine, quinidine, réserpine, strychnine, « vinca-alcaloïdes », vincamine, yohimbine...).

D'assez nombreux travaux ont porté sur la composition chimique de *P. nitida*. Des criblages sur CCM à l'aide de réactifs colorés ont été réalisés sur des extraits aqueux et méthanoliques et d'écorces de tronc et de racines (Ngaïssona, 2016), de péricarpe (Kouitcheu, 2008) ou de pulpe du fruit (Nnamdi, 2015), mettant en particulier en évidence la présence, entre autres, d'alcaloïdes. Des travaux d'isolement réalisés à partir de 1927 ont permis d'identifier des alcaloïdes indolomonoterpéniques monomériques, puis plus récemment dimériques, appartenant à plusieurs types et classes. Une étude des parties aériennes a notamment été réalisée récemment au laboratoire par Fox-Alcover *et al.*, sous la direction de M. Beniddir (Alcover, 2020).

Dans cette série, ont ainsi été isolés de *P. nitida* :

- Graines : 3,5 à 4,8 % d'alcaloïdes totaux ; akuammine (majoritaire), akuammicine, akuammidine, pseudo-akuammigine, akuammiline, burnamine, picraline, picranitine, picratidine (*N*-méthyl-picraline), burnamine (désacétyl-picraline), désacétyl-akuammiline (rhazimol) ;
- Feuilles : akuammine, akuammidine, akuammagine, picraphylline, mélinonine A ;
- Fruits : akuammicine, akuammidine, akuammagine, pseudo-akuammigine, picraline ;
- Tiges : akuammine, akuammidine ;
- Racines : akuammicine, akuammagine, picracine, désacétyl-picraline ;
- Parties aériennes : 3,4,5,6-déhydrogeissoschizol , 10-hydroxygeissoschizol , moandaensine B , moandaensine C , 20'-*epi*-serpentine , 16-déméthoxy-20'-*epi*-serpentine , alstonine 6-méthylpropionate ;
- Sans précision d'organe : akuamménine, picranitine, picralinal, rhazimol, péricalline, péricine (Ressources végétales de l'Afrique tropicale, site internet).

Les structures des molécules isolées sont présentées ci-dessous (tableau 14). Pour certaines, l'organe est incertain, ou la structure non décrite.

Tableau 14 : Alcaloïdes isolés de Picralima nitida

Nom	Type	Classe	Formule brute	Masse précise <i>m/z</i>	Structure
10-Hydroxygeissoschizol	Ia	Type Corynanthe	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	M : [M+H] ⁺ : <i>m/z</i> théorique : 313,1911	
16-Déméthoxy-20'- <i>epi</i> -serpentinine	Ia / Ia	Type Corynanthe - Hétéroyohimbane (Type Corynanthe / type-ajmalicine)	C ₄₁ H ₄₃ N ₄ O ₅ ⁺	M : 671,3228 [M] ⁺ : <i>m/z</i> théorique : 671,3228	
20'- <i>Epi</i> -serpentinine	Ia / Ia	Type Corynanthe - Hétéroyohimbane (Type Corynanthe / type-ajmalicine)	C ₄₂ H ₄₅ N ₄ O ₅ ⁺	M : 685,3385 [M] ⁺ : <i>m/z</i> théorique : 685,3385	

3,4,5,6-Déhydrogeissoschizol	Ia	Type Corynanthe	$C_{19}H_{21}N_2O^+$	M : 293,1648 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 293,1648	
Akuamménine			$C_{20}H_{22}N_2O_4$		<i>Non décrit</i>
Akuammicine	IIb	Type pandoline (isoplumerane)	$C_{20}H_{22}N_2O_2$	M : 332,1861 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 313,1760	
Akuammidine	Ia	Type Sarpagine	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	M : 352,1787 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 353,1865	
Akuammigine	Ia	Hétéroyohimbane (Type Corynanthe type ajmalicine)	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	M : 352,1787 $[M+H]^+$ théorique : 353,1860	
Akuammiline	Ia	Type Akuammiline (Akuammilane)	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	M : 394,1893 $[M+H]^+ : m/z$ théorique 395,1965	

Akuammine	Ia	Type Sarpagine (Akuammilane)	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	M : 982,1893 $[M+H]^+$: <i>m/z</i> théorique 383,1965	
Alstonine 6-méthylpropionate	Ia	Hétéroyohimbane (Type Corynanthe type ajmalicine)	$C_{25}H_{27}N_2O_5^+$	M : 435,1915 $[M]^+$: <i>m/z</i> théorique : 435,1915	
Burnamine (désacétyl-picraline)	Ib	Akuammilane	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	M : 368,1736 $[M+H]^+$: <i>m/z</i> théorique : 369,1809	
Désacétyl-akuammiline (rhazimol)	Ib	Akuammilane	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	M : 352,1787 $[M+H]^+$: <i>m/z</i> théorique : 353,1860	

Mélinonine A	Ia	Hétéroyohimbane (Type Corynanthe)	$C_{22}H_{27}N_2O_3^+$	M : 367,2016 $[M]^+ : m/z$ théorique : 367,2016	
Moandaensine B	Ia / Ia	Type Corynanthe / Type Corynanthe	$C_{40}H_{47}N_4O_3^+$	M : 631,3643 $[M]^+ : m/z$ théorique : 631,3643	
Moandaensine C	Ia / Ia	Type Corynanthe / Type Corynanthe	$C_{40}H_{45}N_4O_3^+$	M : 629,3486 $[M]^+ : m/z$ théorique : 629,3486	
Péricalline (= Apparicine)	III	Groupe Uleine-dasycarpidane (type-apparicine)	$C_{18}H_{20}N_2$	M : 264,1627 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 265,1699	

Péricine	III	Groupe Uleine-dasycarpidane (type-apparicine)	$C_{19}H_{22}N_2$	M : 278,1783 [M+H] ⁺ : m/z théorique : 279,1856	
Picracine	Ia	Type Corynanthe	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	M : 354,1943 [M+H] ⁺ : m/z théorique : 355,2016	
Picralinal	Ib	Akuammilane	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	M : 366,1580 [M+H] ⁺ : m/z théorique : 367,1652	
Picraline	Ib	Akuammilane	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	M : 410,1842 [M+H] ⁺ : m/z théorique : 411,1915	
Picranitine (telle que décrite par Tane (Tane, 2002))	Ib		$C_{21}H_{24}N_2O_5$	M : 384,1685 [M+H] ⁺ : m/z théorique : 385,1758	

Picraphylline	Ia	Hétéroyohimbane	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	M : 382,1893 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 383,1965	
Picratidine (<i>N</i> -méthyl-picraline)	Ib	Akuammilane	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	M : 424,1998 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 425,2071	
Pseudo-akuammine	Ib	Akuammilane	$C_{22}H_{26}N_2O_3$	M : 366,1943 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 367,2016	
Rhazimol	Ib	Akuammilane	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	M : 352,1787 $[M+H]^+ : m/z$ théorique : 353,1860	

Références : Dewick, 2009 ; Szabó, 2008 ; Qu, 2016 ; Knölker, 2016 ; O'Connor, 2006 ; Kitajima, 2003 ; Benayad, 2016

D'autre part, Alcover-Fox *et al.* ont réalisé une déréplication des parties aériennes, mettant en évidence :

- Avec un niveau de confiance élevé (1) : 10-hydroxygeissoschizol, 3,4,5,6-tétradéhydrogeissoschizol, akagerine, akuammigine, alloyohimbine, corynanthéidal, iboxygaine, péricyclivine ;
- Avec un niveau de confiance moyen (2) : akuammicine, cinchonine, corynanthéol, *N*-méthyl antirhine, péricine, pseudoyohimbine, strictosamide, strychnine-*N*-oxyde, raubasine, vindolinine, voachalotine (Alcover, 2020).

1.4. Activités biologiques

Au regard de l'utilisation très répandues de *Picralima nitida* en médecine traditionnelle, de nombreux chercheurs ont mené des investigations sur les différentes parties de la plante. De nombreuses activités pharmacologiques ont été rapportées. Dans l'optique d'une valorisation potentielle de la plante sous forme de MTA, il nous a semblé important de les rapporter ici.

1.4.1. Activités diverses

- **Activités anti-inflammatoires et analgésiques :**

Les extraits de *P. nitida* ainsi que ses alcaloïdes ont montré des activités analgésiques et anti-inflammatoires, qui pourraient partiellement justifier le choix de la plante dans le traitement traditionnel des accès palustres. On relève ainsi :

- une activité analgésique centrale d'un extrait de graines chez le Rat, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire significative dans des tests usuels chez cette espèce ;
- une forte activité analgésique locale pour l'akuammine et l'akuammidine (supérieure à celle de la cocaïne, chez le Rat) ;
- un effet de la pseudo-akuammigine sur l'œdème de la patte induit par le carraghénane chez le Rat, à 1, 5 et 50 mg/kg par voie orale. L'effet analgésique est antagonisé par la naloxone (antagoniste opioïde) (Dwujejua, 2002).

Ce caractère analgésique est mentionné pour le fruit, dont la consommation est décrite comme anesthésiant la bouche (« *amertume excessive suivie d'une anesthésie de la muqueuse buccale* ») (Hamet, 1951).

- **Activité antidiarrhéique :**

Au Cameroun, la plante est utilisée traditionnellement pour traiter les troubles gastro-intestinaux et la dysenterie. Une étude a comparé l'extrait méthanolique du péricarpe de fruit, pour son activité antidiarrhéique, au lopéramide (3 mg/kg). L'extrait administré par voie orale aux doses de 375 et 750 mg / kg de poids corporel, entraîne une diminution significative de la fréquence de défécation et la gravité de la diarrhée (de 18,81-21,86 %) avec ralentissement du transit intestinal (Kouitcheu, 2006).

Une activité anti-shigellosique *in vitro* et *in vivo* de cet extrait a été rapportée chez le rat. L'effet antimicrobien évalué *in vitro* contre *Shigella dysenteriae* type I donne une CMI (concentration minimale inhibitrice) de 800 µg/mL et une CMB (concentration minimale bactéricide) de 6400 µg/mL. *In vivo*, l'extrait réduit la diarrhée préalablement induite, de façon comparable à la ciprofloxacine, avec réduction de la fréquence d'émission et une augmentation de la densité des selles (Kouitcheu, 2006).

- **Activité antidiabétique :**

De nombreux travaux ont permis de démontrer les propriétés hypoglycémiantes des extraits de *Picralima*, suggérant l'intérêt potentiel de cette plante dans la prise en charge du diabète. En effet, les extraits méthanoliques et hydro-éthanoliques de l'écorce de tige et feuilles présentent une activité antidiabétique dans le diabète induit chez la souris par la streptozotocine (Erharuyi, 2014). L'extrait méthanolique des feuilles à la dose de 300 mg/kg induit une réduction de la glycémie de 38,48 % (Teugwa, 2013).

L'extrait butanolique des graines entraîne une diminution de la glycémie induite par la streptozotocine chez des rats diabétiques gestantes à partir du jour 16 jusqu'à la délivrance le jour 21 (Yessoufou, 2013). Au contraire, l'extrait éthanolique de graines augmente le taux de glucose chez les rats diabétiques de diabète induit par l'alloxane (Igboasoziyi, 2007). Les extraits méthanoliques de graine, pulpe et d'écorce de fruit ont montré un effet hypoglycémiant à 300 et 900 mg/kg chez le rat sain (Inya-Agha, 2006) ou après traitement à l'alloxane (Okonta, 2007). L'extrait aqueux des graines a également montré un effet hypoglycémiant chez les lapins diabétiques induits par l'alloxane (Aguwa, 2001). Une étude a montré l'intérêt de l'huile de graines ; en effet des doses de 2,0 mL/kg par voie orale et 0,125 mL/kg en intra péritonéal permettent une réduction de la glycémie chez le rat (Shittu, 2010). Ces activités pourraient être associées aux alcaloïdes (évaluation de la pénétration du glucose dans des cellules adipocytaires 3T3 -L1 menée sur l'akuammicine, la 10-désoxyakuammine, l'akuammine, l'akuammidine, la burnamine et la picraline) (Ngaïssona, 2016).

- **Activités antimicrobiennes :**

L'extrait méthanolique d'écorce s'est montré actif sur des bactéries Gram-positives et des champignons. La fraction majoritaire de cet extrait avait une concentration minimale inhibitrice (CMI) contre *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus flavus* comparable au médicament de référence, l'ampicilline. Vis-à-vis de *Aspergillus niger* elle présentait des valeurs de CMI inférieures à celles du tiaconazole³⁶. Une crème formulée à base d'extrait méthanolique de l'écorce de tige de *Picralima* a fait l'objet d'essais cliniques. Elle s'est avérée très efficace contre les affections dermatiques telles que *Pityriasis versicolor*, *Tinea pedis interdigitalis* (pied d'athlète), *Tinea capititis* (teigne du cuir chevelu), et *Tinea corporis* (mycose cutanée) (Ngaïssona, 2016).

Enfin, on notera que des extraits polaires d'écorce de tronc et de racine ont montré des activités antioxydantes *in vitro*, très inférieures à celles de l'acide ascorbique employé comme témoin (Ngaïssona, 2016).

Surtout, on remarquera des travaux pharmacologiques anciens portant sur des extraits (de graines, surtout) et des alcaloïdes isolés, montrant des effets cardiovasculaires ou neurologiques complexes - notamment sympathicomimétique et un potentiel hypotenseur pour plusieurs composés (Hamet, 1951).

1.4.2. Activités antiparasitaires, dont activité antiplasmodiale

La littérature rapporte une activité antileishmanienne modérée *in vitro* pour l'extrait méthanolique d'écorce de tige, ainsi qu'un effet significatif contre *Trypanosoma brucei brucei* *in vitro* (Ngaïssona, 2016).

Ce sont les activités antiplasmodiales qui nous intéressent plus particulièrement ici. Les travaux des auteurs ont porté sur des extraits ou des molécules isolées. Les extraits de racines, d'écorce de tige et d'écorce de fruit ont montré des effets significatifs *in vitro* contre *Plasmodium falciparum*, y compris sur des souches résistantes à la chloroquine, à de faibles concentrations. L'extrait chlorométhylénique du péricarpe était le plus actif, comparativement à des extraits de graines et de feuilles, notamment (Ressources végétales de l'Afrique tropicale).

*Tableau 15 : Activités antiplasmodiales in vitro d'extraits de *P. nitida**

Organe	Extraits	Souche	Activité	Référence
Pulpe du fruit	méthanolique et aqueux	20 isolats cliniques de <i>P. falciparum</i> , inhibition de croissance de schizontes	En moyenne : $IC_{50} = 23,3 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$, $28,3 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$, respectivement	Nnamdi <i>et al.</i> (Nnamdi, 2015)
Graines	Méthanolique	<i>Plasmodium falciparum</i> , souche W2 chloroquino-résistante	$IC_{50} = 10,9 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$	Bickii <i>et al.</i> (Bickii, 2007)
	dichlorométhane/méthanol (1:1)		$IC_{50} = 20,1 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$	
	Hexanique		$IC_{50} = 129,6 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ (considéré inactif)	
Racines	Chlorométhylénique	<i>Plasmodium falciparum</i> , souche NF54, chroloquino-sensible	0,188 $\mu\text{g / mL}$	Francois <i>et al.</i> (Francois, 1996)
Ecorces de tiges	Chlorométhylénique		0,545 $\mu\text{g / mL}$	
Péricarpe	Chlorométhylénique		1,581 $\mu\text{g / mL}$	
Ecorces de troncs, de graines, de feuilles	Aqueux, méthanoliques, chlorométhyléniques		Activités faibles à nulles ($> 50 \mu\text{g/mL}$)	
Graines	extrait alcaloïdique	<i>Plasmodium falciparum</i> , souche D-6	0,83 $\mu\text{g/mL}$	Govindi <i>et al.</i> (Govindi, 1993)
		<i>Plasmodium falciparum</i> , souche W-2	1,76 $\mu\text{g/mL}$	

Okokon et al. (Okokon, 2007) ont quant à eux montré l'activité antiplasmodiale *in vivo* de l'extrait éthanolique de graines chez des souris infectées par des souches de *Plasmodium berghei* chloroquine-sensibles : les doses 35-115 mg/kg/jour ont présenté une activité schizonticide sanguine significative ($P < 0,05$) (infection précoce de 4 jours ; infection établie). Le même type d'extrait a amélioré les paramètres hématologiques chez la souris infectée (Nkwankwo, 2017).

Des évaluations d'alcaloïdes isolés de la plante ont aussi été réalisées : les données retrouvées dans la littérature sont présentées dans la table suivante (tableau 16).

Tableau 16 : Activité antiplasmodiale *in vitro* d'alcaloïdes de *P. nitida*

Alcaloïdes	<i>Plasmodium falciparum</i>			
	Souche D-6		Souche W-2	
	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)
Akuammicine	0,45	1,44	0,73	2,33
Akuammine	0,53* ; 0,95 0,530 µg/ml	1,38 ; 2,48	0,00111* ; 0,66 1,110 µg/ml	0,0028 ; 1,72
Alstonine*	0,017	0,048	0,038	0,11
Picraline	0,44	1,07	0,53	1,29
Picratidine	0,8	1,88	0,92	2,16
Picranitidine	0,04	-	0,03	-
Akuammidine	4,68	13,28	7,25	20,57
Akuammigine	1,8	5,10	1,62	4,59
Pseudo-akuammigine	0,42	1,14	0,1	0,27
	Souche FcB1	Cl ₅₀ (µM)		
Moandaensine B		8.7 ± 0.4		
Moandaensine C		9.5 ± 0.7		
20'- <i>Epi</i> -serpentine		2.6 ± 0.3		
16-Déméthoxy-20'- <i>epi</i> -serpentine		5.2 ± 2.0		
Alstonine-6-méthylpropionate		3.0 ± 0.0		
3,4,5,6-Déhydrogeissoschizol		19.5 ± 0.7		
10-Hydroxygeissoschizol		99 ± 0.0		
Témoins	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)
Chloroquine	0,003	0,009	0,084	0,26
Artémisinine	0,001	0,0035	0,001	0,0035
Quinine	0,027	0,083	0,097	0,29

Références : Okunji, 2005 ; sauf * : Govindi, 1993 ; ** Alcover-Fox, 2020.

(* NB : C'est un analogue de l'alstonine qui a été identifié dans la plante)

L'un des mécanismes d'action des médicaments antipaludiques est l'inhibition de la formation d'hémozoïne, dimère formé à partir de l'hème libérée lors de la dégradation de l'hémoglobine par le *Plasmodium* (Boutefnouchet, 2020). Nwankwo et al. ont montré que l'extrait éthanolique de graines de *Picralima nitida* inhibe la formation d'hémozoïne, dans une culture de *Plasmodium berghei* au stade de l'anneau (à 12h et 18h), d'une manière non-dose dépendante à différentes concentrations (80 à 400 µg/mL ; contrôle : chloroquine à 10 µg/mL) (Nkwankwo, 2015).

En marge de l'activité antiplasmodiale, Nwabor *et al.* ont montré que les extraits méthanoliques et aqueux de pulpe de *P. nitida* ont des propriétés larvicides chez l'anophèle, suggérant un intérêt dans la lutte vectorielle contre le paludisme (Nwabor, 2014).

1.4.3. Données toxicologiques publiées

- **Etude toxicologique du fruit :**

Des essais de toxicité aigüe sur les extraits méthanoliques et aqueux de pulpe de fruit de *P. nitida* ont montré que l'administration d'une dose de 5000 mg/kg de l'un ou l'autre des extraits provoquait l'apparition de signes physiques de toxicité chez la Souris albinos 10 heures après administration, se soldant par la mort de l'animal. La dose létale 50 % (DL₅₀) a été estimée à 3705,15 mg/kg pour les deux extraits (Nnamdi, 2015).

- **Etude toxicologique des graines :**

Des travaux anciens (Michiels, 1919) portant sur un extrait alcoolique (ramené à un Ratio drogue extrait (DER) 1 :1) sont rapportés : 2 cL et 5 cL *per os* n'engendrent pas de signe toxique chez le lapin et le cobaye, respectivement. Par voie sous-cutanée, sont observés : chez le lapin (5 cL) : parésie, convulsions, bradycardie et décès (à 15 min) ; chez le cobaye : parésie, troubles respiratoires, décès (à 1,5 h). L'auteur indique que l'extrait « *ne paraît... guère toxique* » (Hamet, 1951).

Koffi *et al.* ont testé une décoction de graines par voie orale, de 600 à 3000 mg/kg de poids corporel, chez des souris Swiss, pendant 4 à 6 semaines. Ils n'ont observé aucun signe de toxicité ni de mortalité dans cette gamme de concentrations (Koffi, 2014). Kouitcheu *et al.* ont quant à eux évalué la toxicité de l'extrait méthanolique du péricarpe chez le Rat Wistar (Kouitcheu, 2008). L'administration *per os* (0,75 ; 1,5 ; 3 et 6 g/kg/J) pendant 6 semaines a engendré, pour les doses les plus élevées, une perturbation significative des paramètres biochimiques, hématologiques, rénaux, hépatiques et cardiaques. La DL₅₀ de toxicité aiguë a été estimée à 14,5 et 12,5 g/kg de poids corporel chez les mâles et les femelles, respectivement.

Chidiebere *et al.* ont rapporté une action spasmogène puissante *in vitro* chez des souris gravides ayant reçu une injection intrapéritonéale de 50 mg/kg d'un extrait éthanolique de graines, entraînant une diminution de la fertilité (Chidiebere, 2015). Des décès d'animaux ont été observés pour des doses de 500 mg/mL, l'autopsie montrant une nécrose des cellules rénales.

A notre connaissance, il n'y a pas eu d'études de génotoxicité, de mutagénèse et de cancérogénicité.

Des relevés de la première moitié du 20^e siècle indiquent l'innocuité d'une vingtaine de grammes de graines chez l'humain (Hamet, 1951).

Ces données, globalement rassurantes, indiquent la nécessité d'investigations supplémentaires pour qualifier le rapport bénéfice / risque de l'emploi des différentes parties la plante, notamment dans des populations particulières comme les femmes enceintes.

2. Etude micrographique du fruit

Le fruit ne pouvait pas être facilement mis en herbier. Nous avons entrepris une caractérisation micrographique. Elle permet d'identifier des éléments caractéristiques de la pulpe dans la préparation traditionnelle.

Caractérisation micrographique du fruit de *Picralima nitida*

Picralima nitida a été décrit par plusieurs auteurs. Ses feuilles, de grande taille, et son fruit, volumineux, de forme ovoïde, facilement identifiable, sont des éléments caractéristiques permettant la reconnaissance de la plante en l'absence de fleurs.



Figure 19 : Planche d'herbier de *P. nitida* et fruit mûr frais [réalisation et photographie : A. Akoubet]

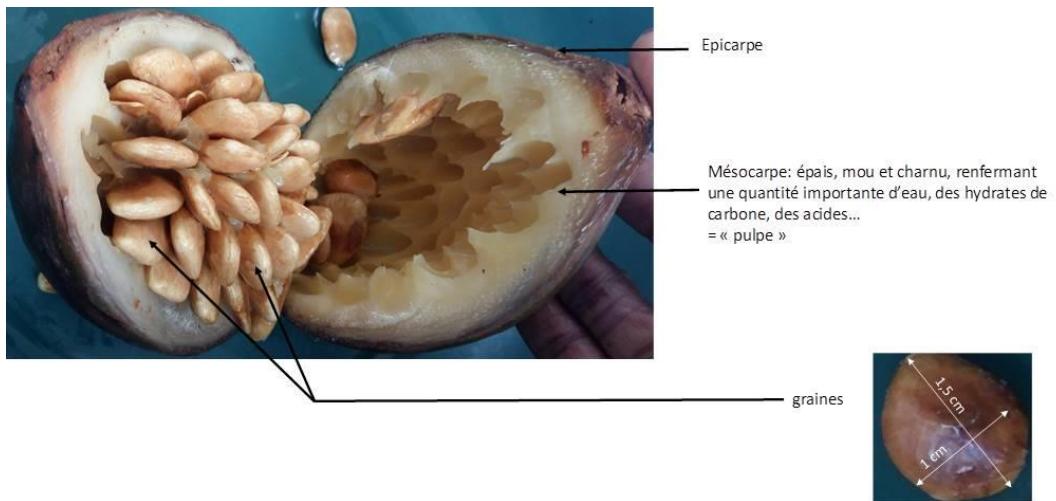


Figure 20 : Section longitudinale de fruit mûr de *P. nitida*; en bas : graine



Figure 21 : Péricarpe séché (a) et graines (b) de *P. nitida*

Malgré tous les travaux effectués sur cette plante, aucune étude micrographique n'a été réalisée, à notre connaissance. L'objectif de cette étude micrographique du fruit est de déterminer les éléments caractéristiques nécessaires à son identification, en cas de modification de son intégrité (coupe, broyage), et le cas échéant au contrôle de matières premières. L'échantillon ayant fait l'objet de la micrographie a été récolté le 3 Octobre 2018 et provenait de la région sud de la Côte d'Ivoire, dans la forêt du CNRA (Centre National de Recherche Agronomique), près d'Abidjan. Les coupes, montages et photos de cette section ont toutes été réalisées par A. Akoubet. Il serait intéressant d'effectuer des comparaisons des éléments observés avec ceux d'autres fruits d'Apocynaceae et d'essayer de déterminer des spécificités et des éléments différenciants le cas échéant. D'autre part, des mesures précises des éléments caractéristiques restent à réaliser.

Epicarpe

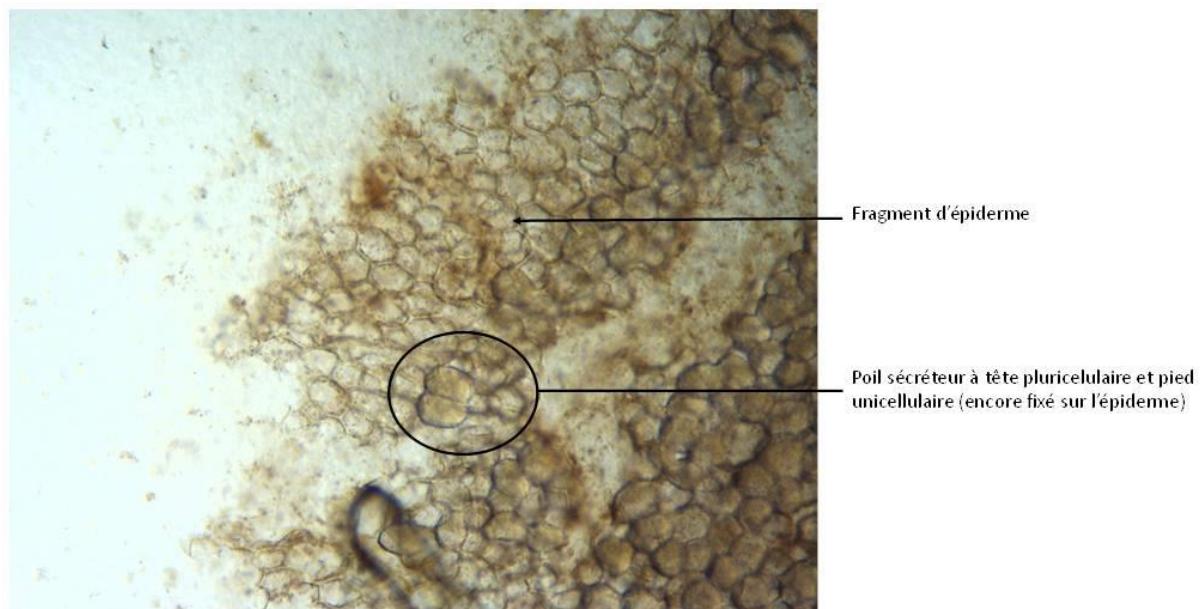


Figure 22 : Coupe transversale du fruit : fragment d'épicarpe ($\times 40$)

Mésocarpe (pulpe)

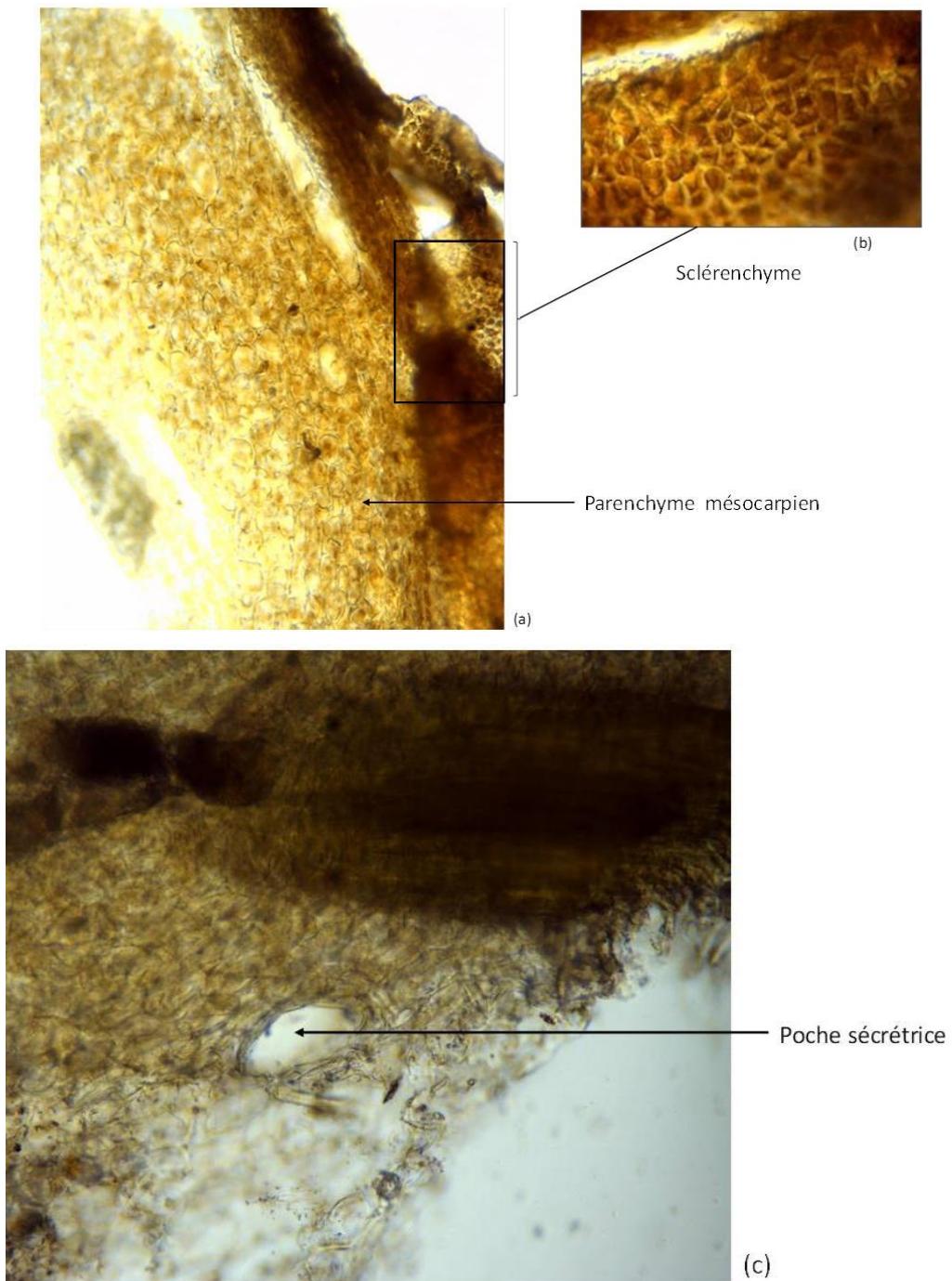


Figure 23 : Coupe transversale du fruit : parenchyme mésocarpien (a), sclérenchyme (b), poche sécrétrice (c) ($\times 40$)

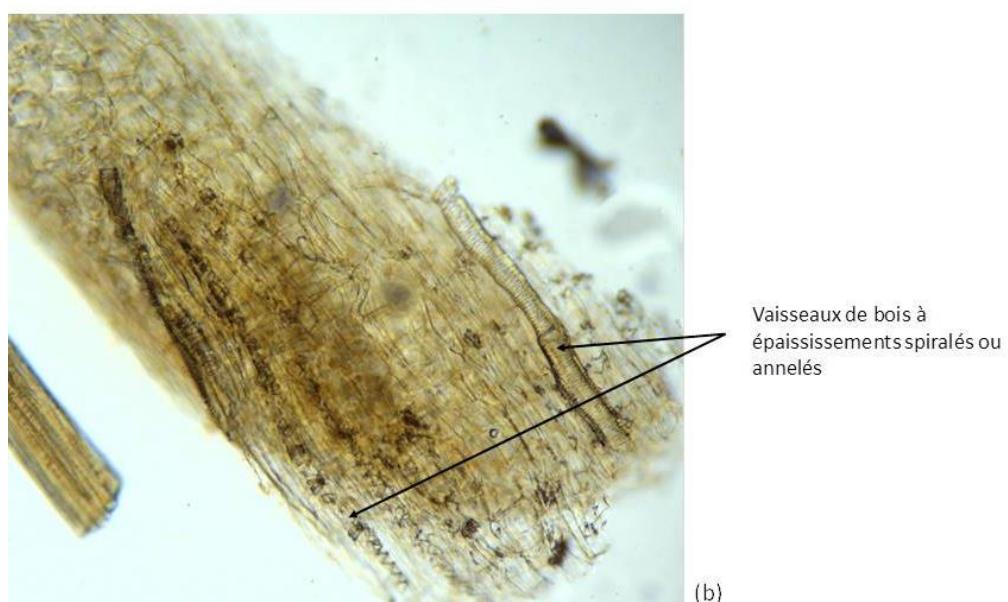
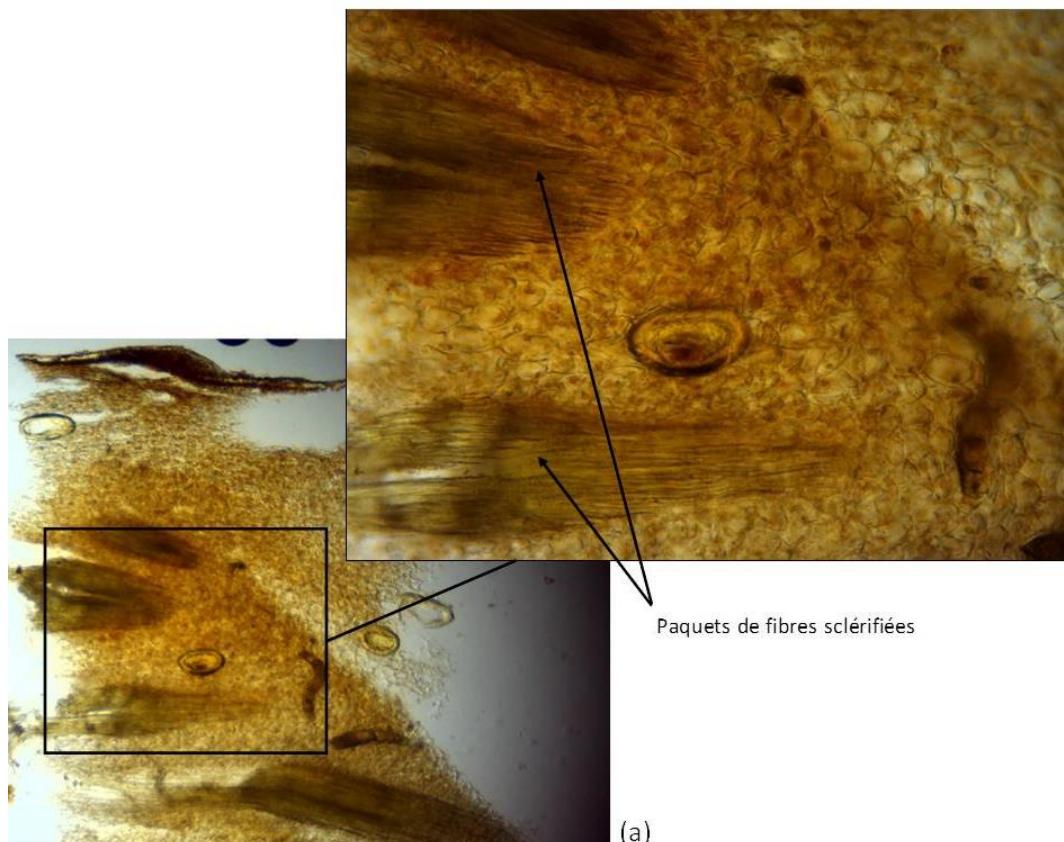


Figure 24 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Fibres sclérfifiées en paquets (a); Faisceaux conducteurs : vaisseaux de bois (b) (x 40)

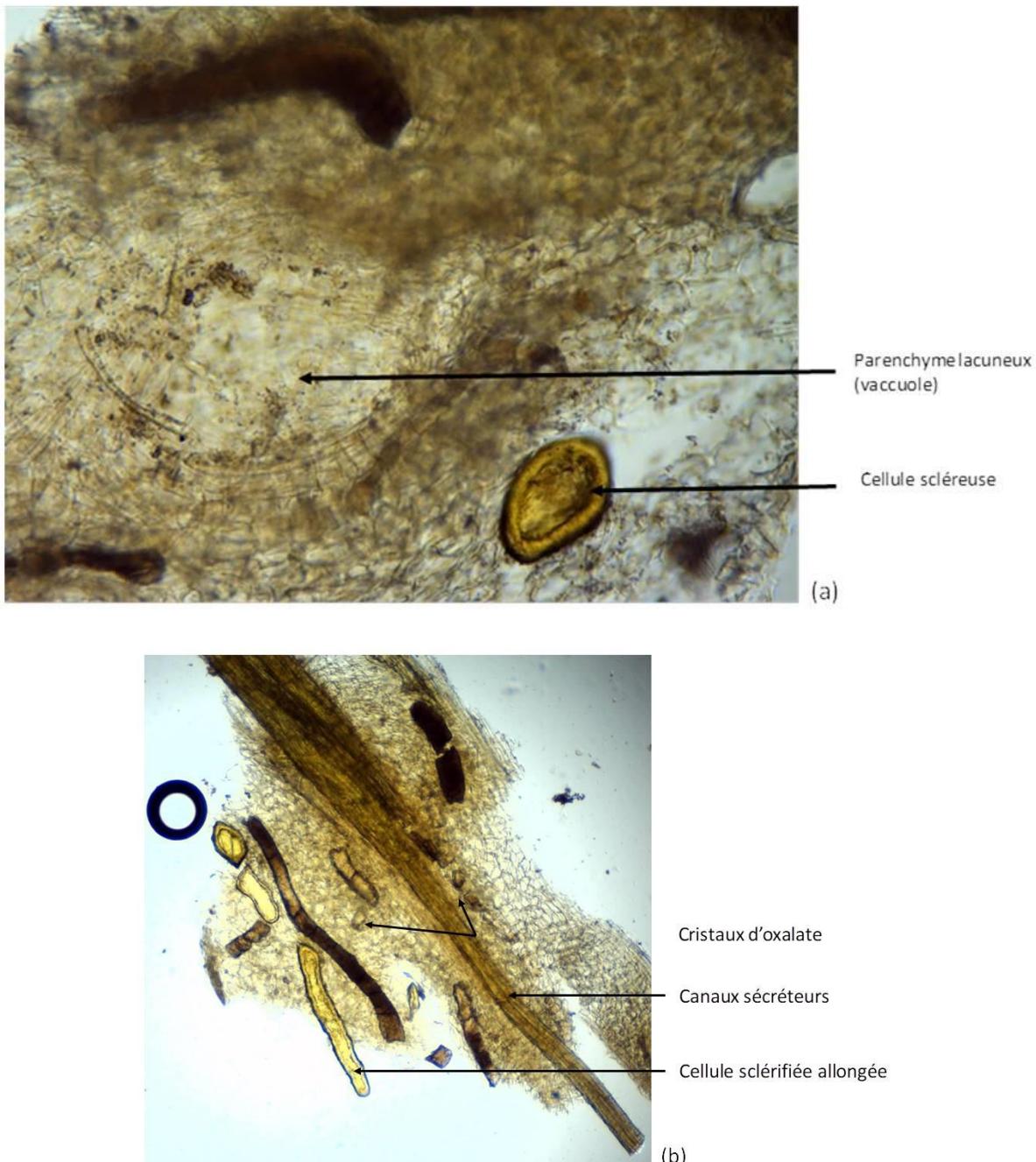


Figure 25 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Parenchyme lacuneux et sclérite (a) ; Cristaux d'oxalate, canaux sécréteurs et cellules sclérifiées allongées (b) ($\times 40$)

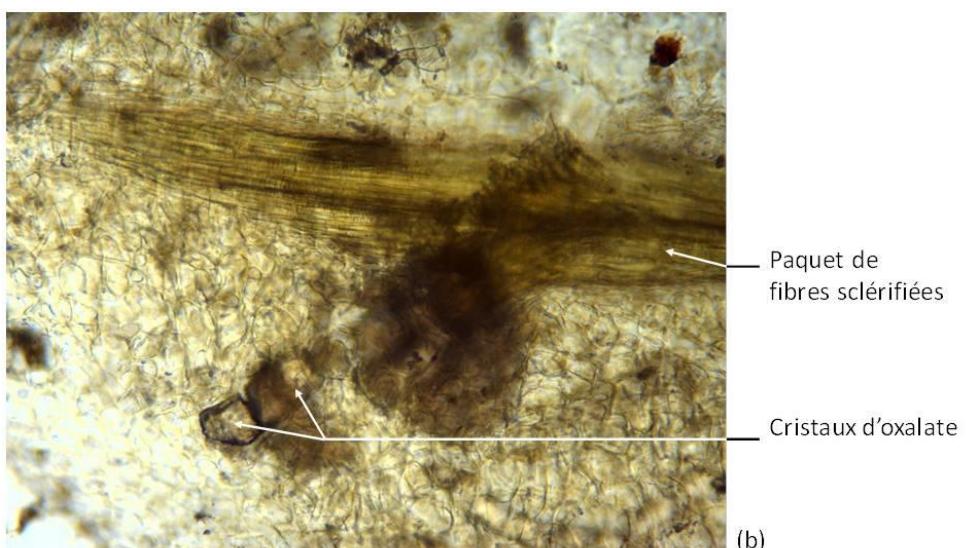
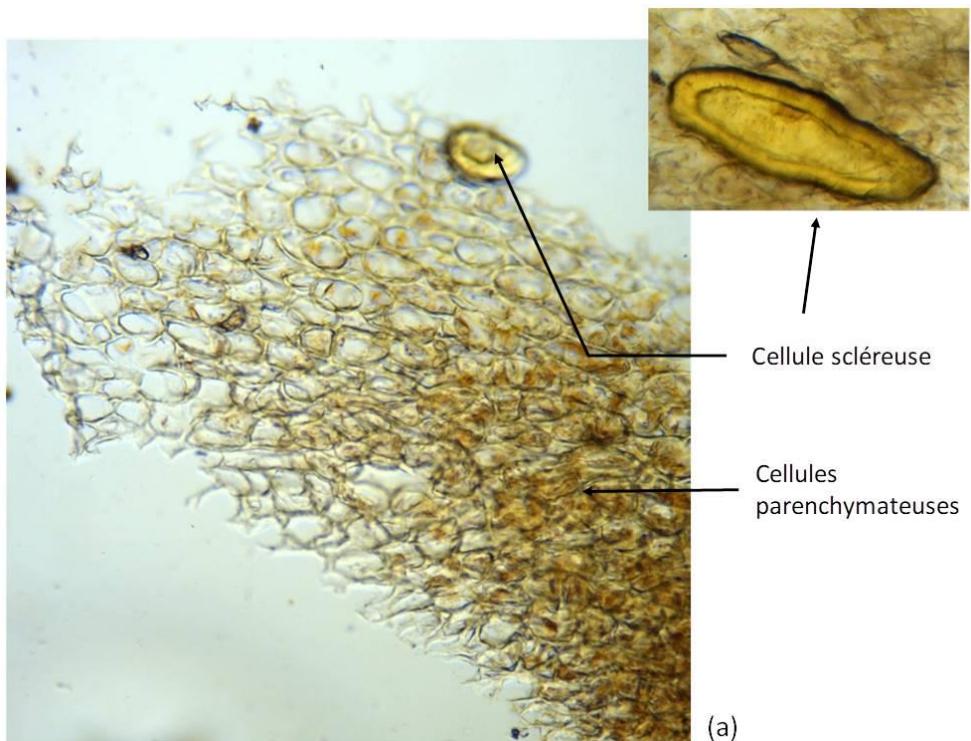


Figure 26 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Cellule scléreuse et parenchyme (a) ; sclérites, fibres sclérifiées et cristaux d'oxalates (b) (x 40)



(a)



(b)

Figure 27 : Coupe transversale du fruit : mésocarpe. Sclérites (a) ; cristaux d'oxalate (b). ($\times 40$)

Graine

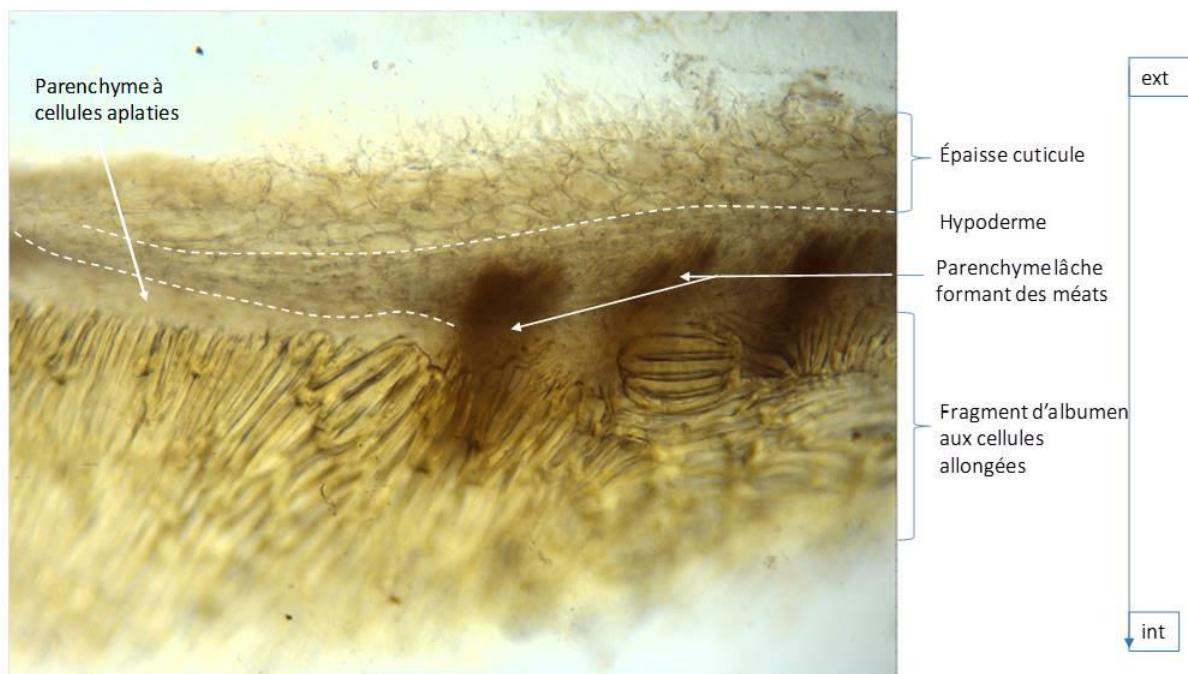
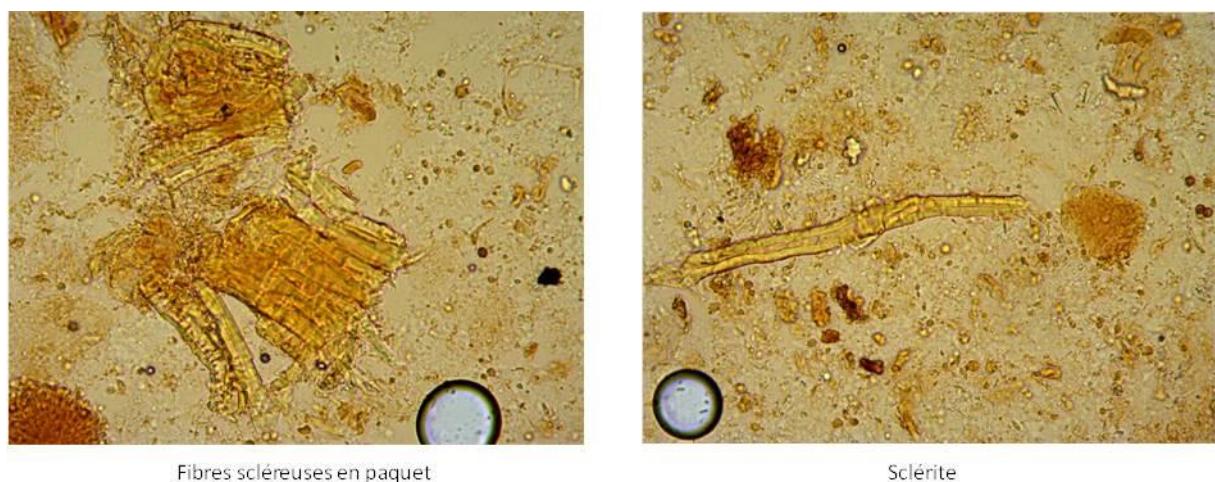


Figure 28 : Coupe transversale de graine : fragments de tégument ($\times 100$)

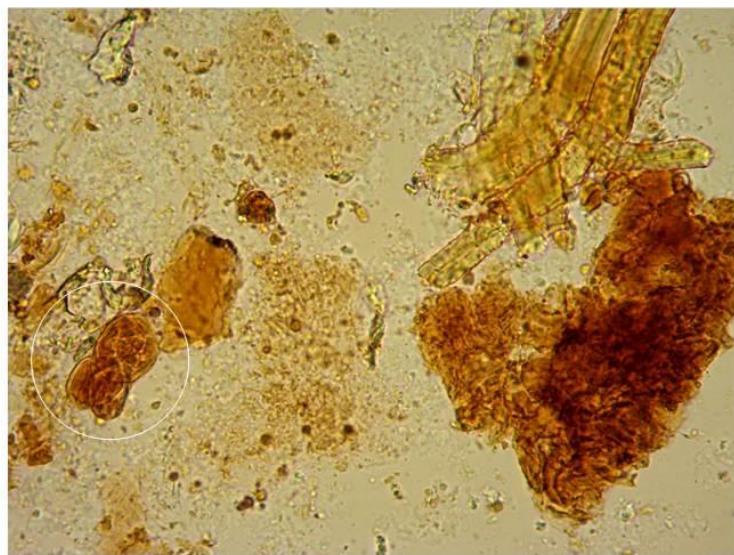
Pulpe du fruit : montage dans l'eau



Fibres scléreuses en paquet

Sclérite

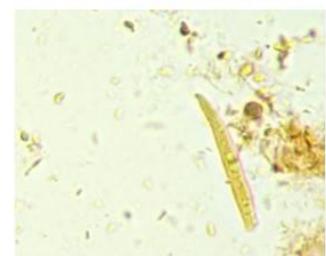
Figure 29 : Analyse microscopique de l'extrait aqueux du fruit ($\times 40$).



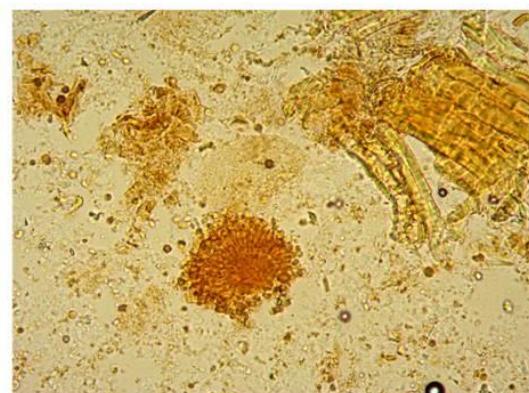
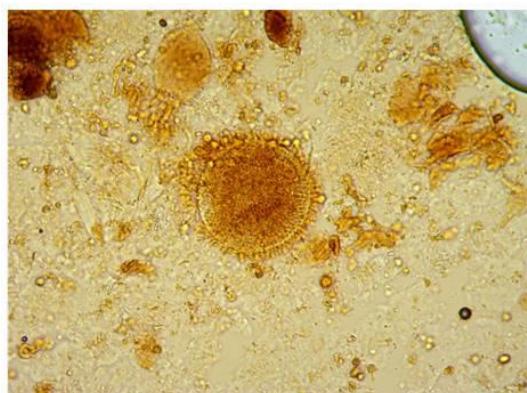
Têtes de poil sécréteur (l'une vue de haut, l'autre de profil)



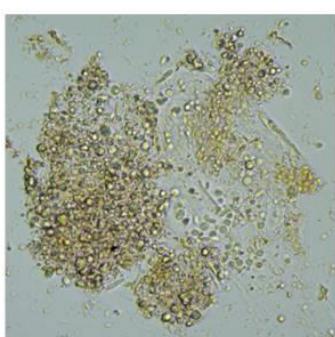
Poil tecteur pluricellulaire



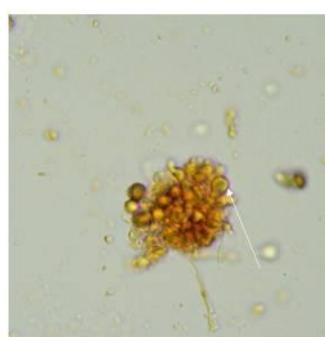
Canal sécréteur



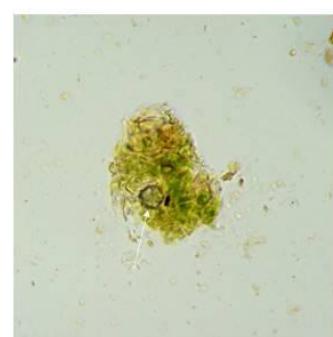
Têtes de poil sécréteur libérant des gouttelettes d'huile



Gouttelettes d'huile en suspension



Fragment d'épicarpe avec un poil sécréteur à tête et pied unicellulaire



Fragment du mésocarpe avec macle d'oxalate de calcium

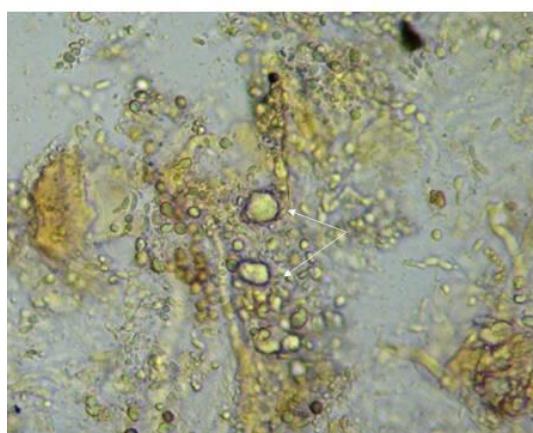
Figure 30 : Analyse microscopique de la pulpe du fruit ($\times 40$).



Vaisseaux de bois spirale



Fragment de parenchyme



Cristaux d'oxalate



Paquet de fibres scléreuses

Figure 31 : Analyse microscopique de la pulpe du fruit (x 40)

On retrouve des éléments du hile dans la pulpe étudiée (vaisseau de bois visible).

L'analyse microscopique de la pulpe montre bien la présence des éléments caractéristiques identifiés dans la coupe transversale du fruit.

3. Dérépllication d'un extrait du fruit de *Picralima nitida*

3.1. Introduction, méthodologie

Une préparation traditionnelle à base de pulpe de fruit de *P. nitida* a été réalisée pour en étudier la composition chimique. Pour ce faire, la préparation a été analysée par LC-MS/MS en utilisant la méthodologie des réseaux moléculaires, puis dérépliquée grâce à une base de données spectrales développée au laboratoire sous la direction du Dr. Mehdi Beniddir : la MIADB (*Monoterpene Indole Alkaloids Data Base*), constituée de 172 alcaloïdes indolomonoterpéniques au moment de son dépôt sur le site MetaboLights (Fox, 2019 ; Beniddir, 2018).

La préparation traditionnelle étudiée est une macération à froid de la pulpe dans l'eau, directement dans le péricarpe, qui nous a été indiquée lors de notre enquête au marché d'Adjamé. Elle était originale et moins usitée que les graines et l'écorce. Nos interlocuteurs à l'herbier national avaient déjà été informés de son emploi. Le fruit utilisé (lot L1-1) était mûr, comme rapporté par l'enquête ethnobotanique. Le fruit est coupé en 2 et débarrassé de ses graines est rempli d'eau. La phase aqueuse est à boire le lendemain. Pour un fruit de 190 g, un extrait aqueux sec de 5 g est obtenu après filtration et évaporation à siccité.

Cet extrait a été analysé par CLHP en phase inverse couplée à un détecteur UV à barrette de diodes et à un spectromètre de masse tandem ESI-Q/ToF (électrospray couplé à un analyseur tandem de type quadrupole / temps de vol – *Time of Flight*), permettant des mesures de masse en haute résolution. Les conditions analytiques et les paramètres en MS et MS/MS sont décrits dans la partie matériel et méthodes. Brièvement, l'analyse a été réalisée en mode positif, entre m/z 100 et 1000 ; la fragmentation des ions (monochargés et dichargés) a été réalisée en « top 3 », à 30, 50 et 70 eV (les spectres sont ensuite moyennés), avec un temps d'exclusion de 40 secondes. Ces conditions étaient celles utilisées de manière standard au laboratoire pour les plantes à alcaloïdes indolomonoterpéniques au moment de l'analyse. Les analyses d'autres lots ont été menées à une énergie de collision de 50 eV.

Les alcaloïdes observés sont désignés par des numéros qui seront exploités tout au long de ce manuscrit. L'extrait étudié, désigné « **extrait L1-1T** »⁷, constituera notre extrait de référence pour des comparaisons de différents lots de la plante.

Les chromatogrammes obtenus à 2 longueurs d'onde et en MS (TIC : *Total Ion Count*, courant ionique total, de m/z 100 à 1000) sont présentés dans la figure suivante.

⁷ Initialement codé : extrait brut AA PN JPF 23052017

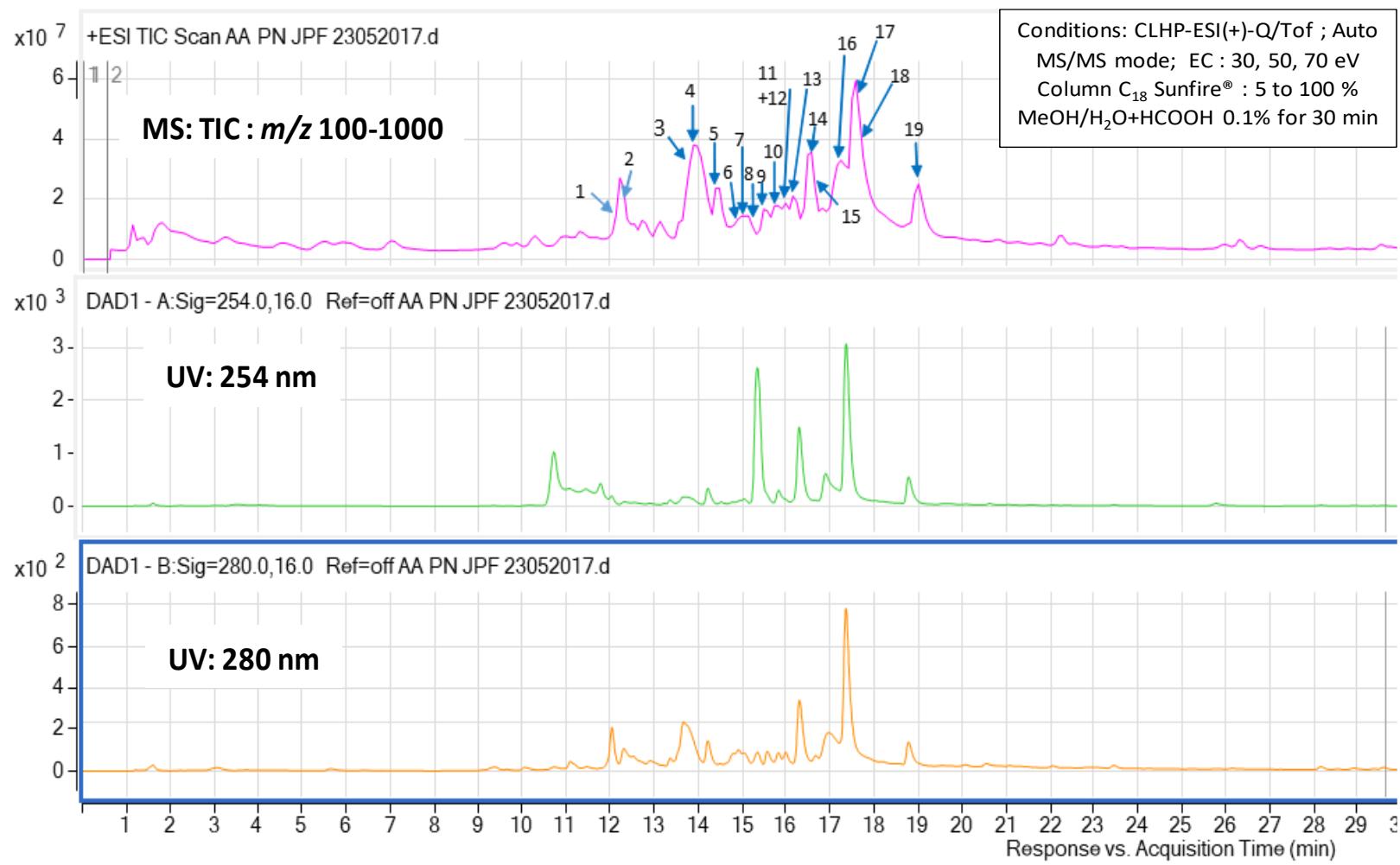


Figure 32 : Chromatogrammes CLHP-UV (254 et 280 nm) et MS (TIC) de l'extrait L1-1T de pulpe de P. nitida

Après traitement des données avec le logiciel MZMine2® (élimination du bruit de fond, élimination des pics d'isotopes en MS), une analyse de ce chromatogramme a été réalisée par la méthode des réseaux moléculaires (*Molecular Networking* ; MN), à l'aide de l'outil Cytoscape® mis à disposition de la communauté scientifique sur le site GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) (GNPS, site internet ; wang, 2016). Cet outil permet une représentation graphique des données, en regroupant les spectres MS et les spectres MS/MS associés sous forme de nœuds, et en associant ces derniers par similitude des spectres MS/MS : on obtient globalement des associations des molécules détectées et des ions fragmentés par familles structurales. De tels agrégats sont désignés comme des « *clusters* ». Une absence de concordance des données spectrales avec les autres ions conduit à des nœuds non associés, dénommés « *selfloops* ». On notera qu'en fonction des paramètres choisis (nombre d'ions fragments communs minimal ; degré de similitude, désigné par un « cosine score » correspondant au cosinus de la résultante des vecteurs associés aux spectres MS/MS), les topologies peuvent être très différentes.

D'autre part, le GNPS est doté d'une base de données collaborative (dans laquelle la MIADB est intégrée), permettant de proposer des identités pour ces différents nœuds par comparaison à des spectres MS/MS expérimentaux de molécules témoins. Le lecteur pourra se référer à une revue assez récente exposant diverses stratégies d'exploitation des réseaux moléculaires, dans une optique de déréPLICATION ou de mise en évidence de molécules d'intérêt (Beniddir, 2019).

L'exactitude de l'annotation fait usuellement l'objet d'une qualification du degré de confiance, suivant des règles élaborées par Schymanski *et al.* (de 1 : parfaite concordance des données MS/MS et UV, du temps de rétention chromatographique ; comparaison avec un témoin : structure confirmée ; 2 : structure probable : correspondance des données MS/MS par rapport à une base de données et/ou analyse diagnostique des spectres ; à 5 pour une simple valeur de masse précise et une absence d'annotation) (Schymanski, 2014).

3.2. DéréPLICATION de l'extrait L1-1T

3.2.1. Données obtenues par analyse en réseau moléculaire

L'analyse des données de CLHP-MS/MS par la méthode des réseaux moléculaires a donné un réseau constitué de 200 nœuds, dont 76 sont des self-loops. Le réseau est présenté dans la figure 20 suivante : les clusters d'intérêt sont désignés par des lettres ; les nœuds dérépliqués par le GNPS exploitant la MIADB figurent en rouge : ils sont au nombre de 17 (dont 8 visibles sur les chromatogrammes UV et MS (courant ionique, TIC, *Total ion count*)). Les nœuds correspondant aux pics chromatographiques sont désignés par les numéros attribués sur le chromatogramme en figure 19. Certains nœuds correspondent à des matches avec la MIAD mais l'intensité des pics correspondants est trop faible en MS et en UV pour que ces produits puissent être distingués. L'identité des pics correspondant ne peut pas être affirmée sur la base de ces attributions (les temps de rétention n'ayant notamment pas permis de conclure). Les pics 6 et 9 ne sont pas retrouvés dans le réseau.

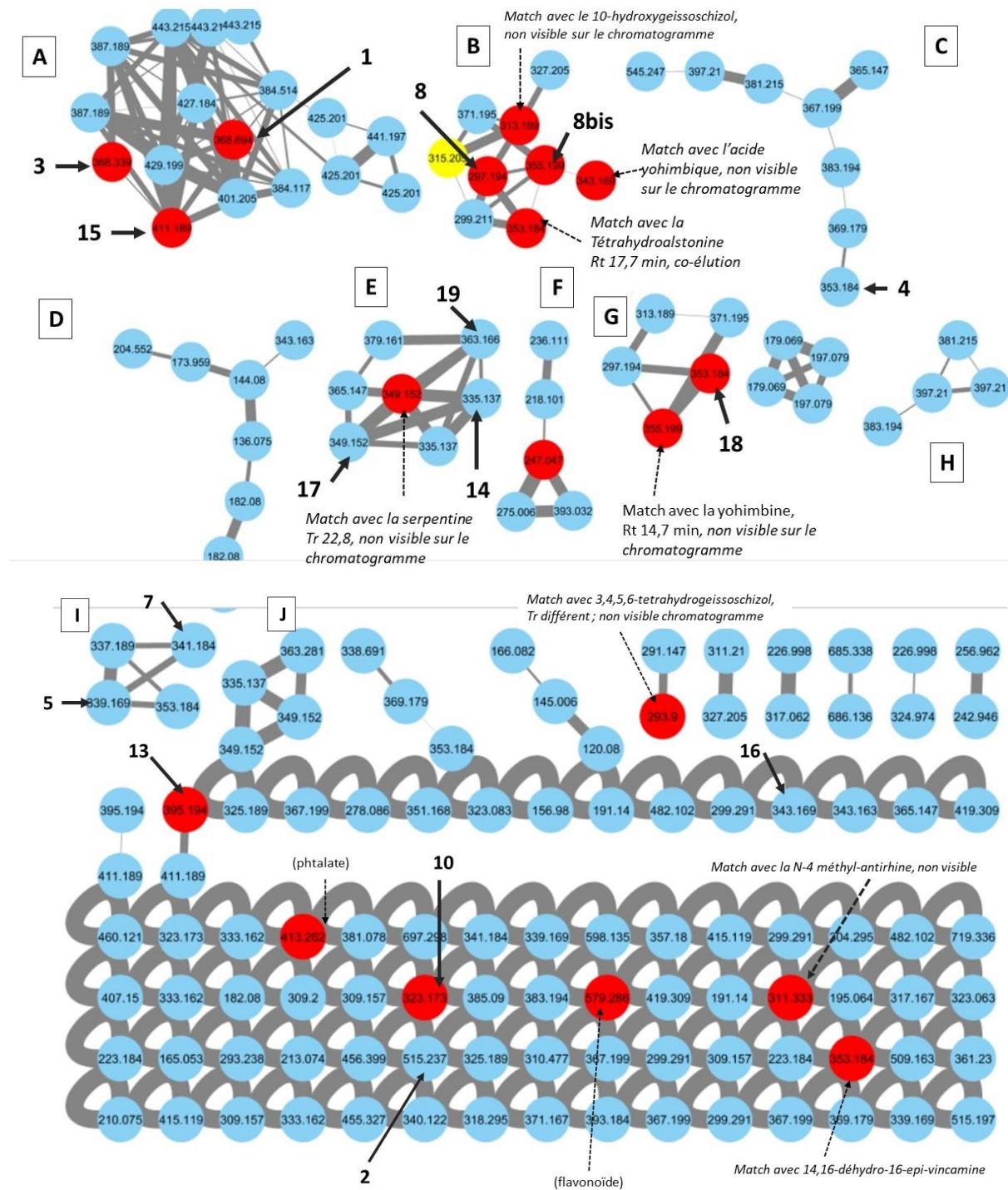


Figure 33 : Réseau moléculaire obtenu pour l'extrait L1-1T

L'interprétation est réalisée de la manière suivante : par exemple, le cluster A comporte les composés correspondant aux pics chromatographiques **1**, **3** et **15**, identifiés à des témoins de la MIADB avec un score élevé. Les pics apparaissant comme nœuds **3** et **15** correspondent bien aux temps de rétention de ces témoins dans les mêmes conditions élutives⁸ : la certitude quant à leur identification est bonne (niveau de confiance 1).

⁸ Pour mémoire, la MIADB a été analysée au laboratoire, en conditions chromatographiques, sur le même matériel que celui employé ici. On tolère des différences de Tr de 1 minute avec les témoins.

Tableau 17 : DéréPLICATION des alcaloïdes de l'extrait de pulpe de *P. nitida* (extrait L1-1T)

Pic	Tr (min)	Intensité (coups)	<i>m/z</i> mesuré [M+H] ⁺ ^a	<i>m/z</i> théorique [M+H] ⁺ ^a	Formules brutes (M)	Cluster	Match avec la MIADB	Tr témoin MIADB (min)	Score	Identité proposée	Niveau de confiance ^b
1	12,12	1 136 861	369,1811	369,1809	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	A	Burnamine	14,25	0,825	<i>Diastéréoisomère de la burnamine ? (Tr différent du nœud « burnamine », 3)</i>	2
2	12,2	247 717	515,1864	515,1864	C ₃₅ H ₂₂ N ₄ O	<i>Self-loop</i>	-				
3	13,96	1 250 180	369,1818	369,1818	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	A	Burnamine	14,25	0,714	Burnamine ^c	1
4	13,71	4 385 595	353,1844	353,1844	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	C	-			<i>Raubasine = Ajmalicine ?^e</i>	
5	14,49	1 456 348	339,1697	339,1697	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	I	-				
6	14,88	427 350	383,1977	383,1977	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	<i>Non vu</i>	-			<i>Picraphylline ?^{a,d}</i>	
7	14,97	361 066	341,1928	341,1928	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	I	-				
8	15,14	452 095	297,1888	297,1888	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O	B	Corynanthéidal		0,874	Corynanthéidal ^e	1
8bis	13,88	144 0763	355,1636	355,1636	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	B	Yohimbine	14,72	0,831	<i>Diastéréoisomère de la Yohimbine ? (Tr différent)^e</i>	
9	15,47	601 996	293,1641	293,1641	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O	<i>Non vu</i>	-				
10	15,89	649 729	323,1768	323,1768	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	<i>Self-loop</i>	Akuammicine		0,723	Akuammicine ^c	1
11	15,97	570 158	293,1657	293,1657	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O		-				
12	16,06	667 346	295,1812	295,1812	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O		-				

Pic	Tr (min)	Intensité (coups)	<i>m/z</i> mesuré [M+H] ⁺ ^a	<i>m/z</i> théorique [M+H] ⁺ ^a	Formules brutes (M)	Cluster	Match avec la MIADB	Tr témoin MIADB (min)	Score	Identité proposée	Niveau de confiance ^b
13	16,3	1 159 277	395,1955	395,1955	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	Cluster de 2 noeuds	Akuammiline	13,52	0,807	<i>Analogue de l'Akuammiline (Tr différent du témoin)</i>	1
14	16,53	2 241 265	335,1401 [M] ⁺	335,1401	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ C ₂₀ H ₂₉ N ₂ O ₃ ⁺ ?	E	[Cluster avec la Serpentine ; (cosine 0,925)]			<i>Analogue déméthylé de serpentine ?</i>	
15	16,56	941 399	411,1902	411,1902	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	A	Picraline			Picraline^c	1
16^a	17,32	2 642 635	343,1630 [M+H] ⁺	343,1687 [M+H] ⁺	C ₄₂ H ₄₄ N ₄ O ₅		-			<i>Cette masse peut correspondre à la serpentinine ou à la 20'-épi-serpentinine</i>	
17	17,57	5 519 782	349,1537 [M] ⁺	349,1537	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ C ₂₁ H ₂₁ N ₂ O ₃ ⁺ ?	C	[Cluster avec la Serpentine (cosine : 0,938)]			<i>Diastéréoisomère de la Serpentine (C₂₁H₂₁N₂O₃⁺) ? (ex : Epi-serpentine ?)</i>	
18	17,57	194 294	353,1838	353,1838	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	G	Akuammigine	17,89	0,971	Akuammigine^c	1
19	18,99	1 576 255	363,1695	363,1695	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₃	E	[Cluster avec la Serpentine (cosine : 0,9)]				

^a sauf mention contraire pour l'ion **16**, dichargé [M+2H]²⁺

^b niveau 1 : correspondance parfaite des Tr et des spectres UV ; match de la MS/MS.

^c déjà décrit dans *P. nitida*

^d seule l'identité de la formule brute est à l'appui de cette hypothèse ; le noeud n'est pas observé dans le réseau moléculaire

^e déjà dérépliqué chez *P. nitida* (voir Alcover-Fox *et al.*, 2020, (Alcover,2020)).

3.2.2. Conclusion : composition alcaloïdique de l'extrait L1-1T

Au total 13 alcaloïdes visibles sur le chromatogramme sont dérépliqués : 5 alcaloïdes sont identifiés sans ambiguïté (avec un niveau 1 de confiance) : la burnamine (**3**), le corynanthéidal (**8**), l'akuammicine (**10**), la picraline (**15**), l'akuammigine (**18**), tous déjà identifiés dans l'espèce. La présence de diastéréoisomères d'alcaloïdes présents dans la MIADB est probable, au regard de la similitude des spectres MS/MS mais la différence de temps de rétention avec les témoins. La présence d'analogues est suggérée par les liens dans les réseaux (fortes valeurs de cosine, expression numérique de la similitude, de 0 à 1 ; ici > 0,9). Certains clusters ne présentaient aucun match avec la base de données, laissant penser à des molécules originales. La concordance avec les alcaloïdes dérépliqués par la même approche par Alcover-Fox *et al.*, pour les parties aériennes, n'est que très partielle (Alcover, 2020).

Les structures des composés connus dans la plante et identifiés sont présentées plus haut (tableau 14). Celles de composés ayant donné des matches dans l'analyse par réseau moléculaire ou présentant des formules brutes compatibles à des nœuds du réseau sont présentées dans la figure 21 ci-dessous.

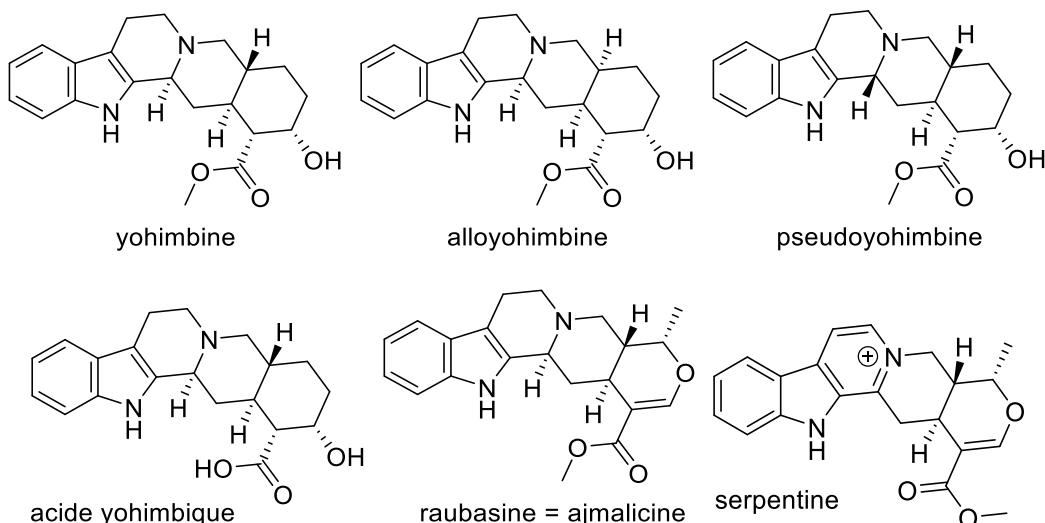


Figure 34 : Structure de composés de la MIADB ayant donné des matches dans l'analyse par réseau moléculaire ou diastéréoisomères potentiellement présents

L'isolement de ces composés alcaloïdiques inconnus est nécessaire pour confirmer les prédictions des réseaux moléculaires ou simplement déterminer l'identité de nœuds inconnus. Ce travail est encore en cours. Il a été entrepris pour **4, 5, 7, 8, 8-bis, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19** (voir la partie matériel et méthodes).

On peut enfin conclure à la présence d'alcaloïdes déjà décrits comme ayant une activité antiplasmodiale (**10, 15, 18**) dans l'extrait traditionnel très particulier étudié ici.

Cette caractérisation de l'extrait **L1-1T** servira de base pour la recherche et l'identification des composés d'intérêt dans les différents extraits réalisés. L'évaluation de l'activité antiplasmodiale de cet extrait est présentée plus loin.

4. Analyse comparatives de lots du fruit de *Picralima nitida*

Après avoir confirmé la présence d'alcaloïdes indolomonoterpéniques pouvant justifier l'emploi de la préparation traditionnelle du fruit de *Picralima nitida* dans le traitement du paludisme, une analyse comparative de plusieurs lots de fruits obtenus sur des marchés de plantes médicinales a été entreprise.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la variabilité des extraits traditionnels. Les différentes étapes de ce travail sont :

- l'étude de la composition qualitative en alcaloïdes, par analyse CLHP-HRMS/MS, comparant le profil de 6 extraits traditionnels (T) et de 9 macérats aqueux de pulpe (AF), issus de 12 lots distincts,
- une analyse métabolomique de ces données visant à affiner les premières observations ;
- l'étude de la composition quantitative, avec la détermination de la teneur en alcaloïdes totaux et un dosage de 5 alcaloïdes majoritaires par HPLC-UV dans plusieurs de ces extraits, comparativement à des témoins ;
- la transposition de l'approche par CLHP-MS/MS en UHPLC-HRMS/MS, pour l'étude de la composition de décoctés de pulpes, autre recette mentionnée. Ce travail a porté sur 9 lots ; lorsque cela a été possible, l'influence du degré de maturité a été étudiée (6 lots de fruits immatures, 3 lots de fruits de maturité moyenne) ;
- pour ces différents lots, le profil alcaloïdique des épicarpes et des graines a également été étudié (26 extraits aqueux obtenus par décoction), par UHPLC-MS/MS.

Au cours de ces analyses nous utilisons comme référence l'extrait L1-1T décrit précédemment, et nous conservons la nomenclature numérique des alcaloïdes mis en évidence lors de sa caractérisation tout au long du texte (lorsque des composés non détectés initialement sont mis en évidence, ils sont désignés par incrément numériques, et pas par temps de rétention croissants).

4.1. Lots de fruit employés

Quatorze lots de fruits de *Picralima nitida* ont été recueillis sur les marchés de plantes médicinales de la ville d'Abidjan entre 2016 et 2019. L'origine et les dates d'obtention sont indiquées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Echantillons de fruits de *P. nitida* : origines et dates d'obtention

Code du lot	Lieu d'obtention	Provenance	Période	Masse du fruit ou moyenne du lot (fruits mûrs)
L1-0	centre de floristique IBAAN, Yopougon (banlieue d'Abidjan)	Abidjan	Aout 2016	2 fruits : 682 g
L1-1	Marché Yopougon Selmer (banlieue d'Abidjan)	Agboville, 77 km au nord d'Abidjan	Mai 2017	n.d. ; env. 500 g
L1-2	Marché Cocody-Palmeraie (Abidjan)	Inconnue du vendeur	Avril 2017	856 g
L1-3	Marché Yopougon Selmer	Agboville	Avril 2017	441 g
L1-4	Marché d'Adjamé (Abidjan)	Alépé, 56 km au Nord-Est d'Abidjan	Avril 2017	Moyenne : 327 g
L1	Marché d'Adjamé	Alépé	Novembre 2018	Moyenne : 660 g
L2	Marché d'Adjamé	Alépé	Janvier 2019	Moyenne : 575 g
L3	Marché d'Angré Cocovico	Inconnue du vendeur	Janvier 2019	1100 g
L4	Marché Yopougon Siporex	Agboville	Janvier 2019	950 g
L5	Marché Cocody Palmeraie	Inconnue du vendeur	Janvier 2019	682 g
L6	Marché d'Adjamé	Alépé	Avril 2018	Moyenne : 582,5 g
L7	Marché de Treichville	Agboville	Avril 2018	Moyenne : 672 g
L8	Marché de Treichville	Bonoua	Avril 2018	Moyenne : 799,5 g
L9	Marché Yopougon Siporex	Inconnue du vendeur	Octobre 2019	n.d.

Dans ces lots, les degrés de maturité des fruits étaient parfois variables. Ce paramètre a été pris en compte. En l'absence de précisions dans la suite du manuscrit, les fruits à pleine maturité sont employés – extraits portant le code « A »).

Des fruits non mûrs (code « B ») ou de maturité moyenne (code « C ») ont le cas échéant été étudiés – ce caractère sera alors explicitement indiqué ici.

4.2. Comparaison des extraits aqueux de pulpe

L'étude chimique du macérat aqueux de pulpe de *P. nitida* utilisé traditionnellement pour traiter le paludisme a permis d'établir un chromatogramme-type pour ce type d'extraits. Toutefois, la réalisation de cette préparation suivant la méthode strictement traditionnelle ne permet d'obtenir que de faibles volumes d'extrait natif. Pour l'obtention de plus grandes quantités d'extraits, nous avons d'abord opté pour une macération aqueuse sur la pulpe seule, de manière à rester proche des conditions initiales. Une comparaison a été réalisée. Les deux modes d'extraction étaient donc :

- le mode strictement « traditionnel » (macération aqueuse à froid dans le fruit vidé des graines, 12 h) : ces extraits sont désignés par la lettre « T » ;
- la macération aqueuse à température ambiante de la pulpe retirée du fruit (24 h) : ces extraits sont désignés par le code AF (A pour le degré de maturité : maturité complète ; F pour l'extraction « à froid »). Ces extraits AF seront notés « APF » en partie 4.4.

Pour cette analyse, 9 lots de fruits à pleine maturité ont été utilisés : 3 lots de fruits ont été préparés selon la méthode traditionnelle uniquement, 6 par macération « à froid », et 3 ont subi les deux modes de préparation (voir partie matériel et méthodes).

Les rendements sont calculés en % m/m en tenant compte de la teneur en eau de chaque lot, déterminée par perte à la dessication. Ils sont indiqués dans la partie matériel et méthodes.

4.2.1 Comparaison chromatographique des extraits aqueux

Ces 15 extraits ont été analysés par CLPH-UV-ESI(+)-Q/ToF, en mode auto MS/MS (top 3). L'extrait utilisé comme référence pour la recherche de molécules d'intérêt était l'extrait **L1-1T** décrit précédemment. Ces analyses, réalisées plus tard, montrent un petit décalage des temps de rétention.

Les chromatogrammes obtenus en UV sont présentés ci-dessous. Les pics principaux sont désignés par les numéros attribués aux alcaloïdes correspondant. Les valeurs de *m/z* des principaux ions observés dans les mêmes analyses sont reportés sur les chromatogrammes UV.

Les ions non identifiés ne sont pas de nature alcaloïdique, d'après le calcul de leurs formules brutes. On notera que le pic **5** (*m/z* 339,16 ([M+H]⁺), Tr 13,5 min) est coélué avec des composés donnant des ions à *m/z* 179,068 (C₁₀H₁₀O₃) et *m/z* 197,078 (C₁₀H₁₂O₄), non identifiés, qui ne correspondent pas à des fragments en source. Ces formules brutes peuvent correspondre, d'après le DNP (DNP, 2020) à des dérivés en série benzaldéhyde ou naphtalénone.

Les profils des 2 types d'extraits sont, comme on pouvait l'anticiper, quasi-identiques : on peut le constater en comparant les extraits T et AF des lots L6, L7, L8 dans les 2 figures suivantes.

Figure 35 : Chromatogramme CLHP-UV-(MS/MS) des extraits traditionnels (extraits T)

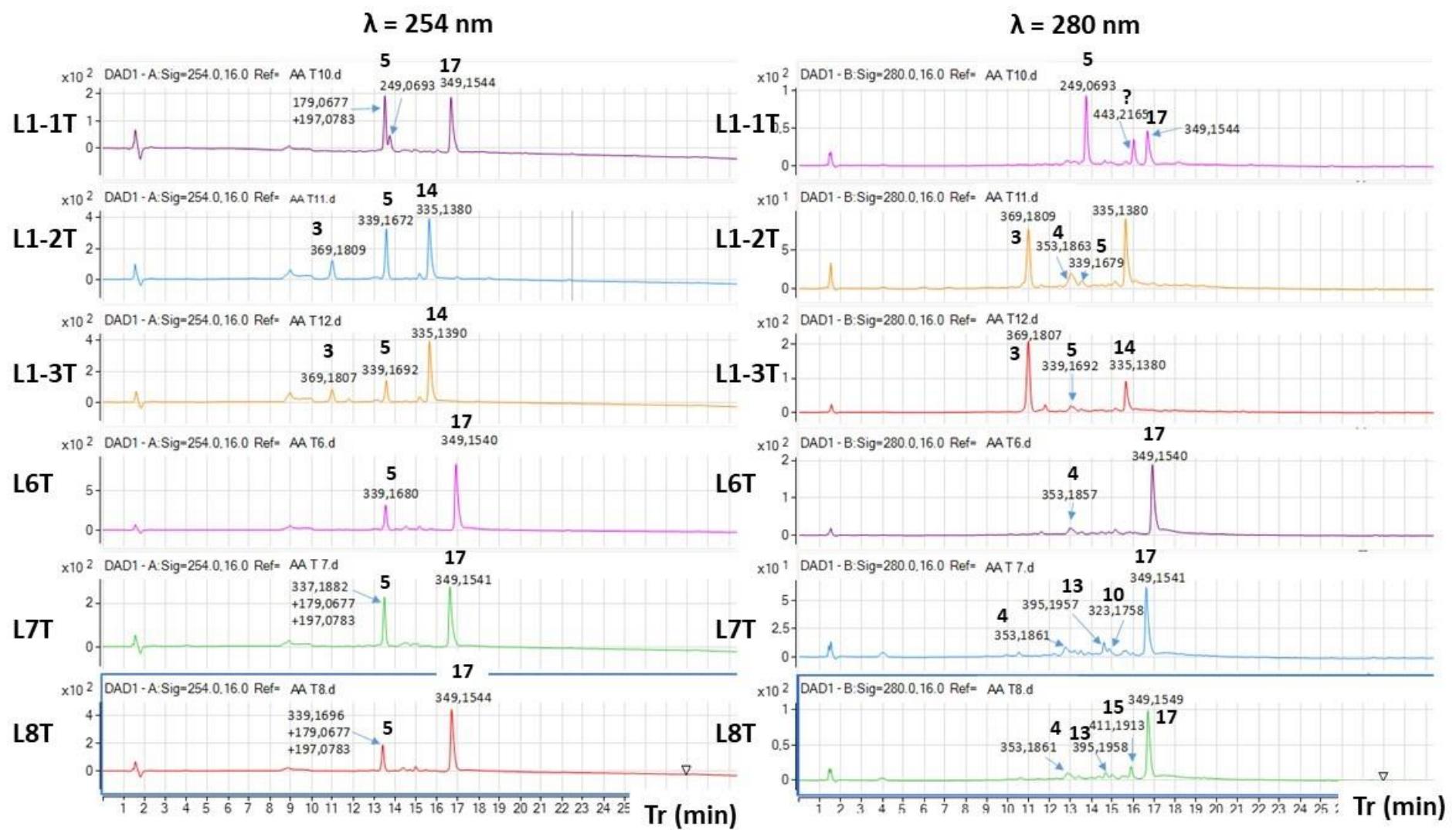
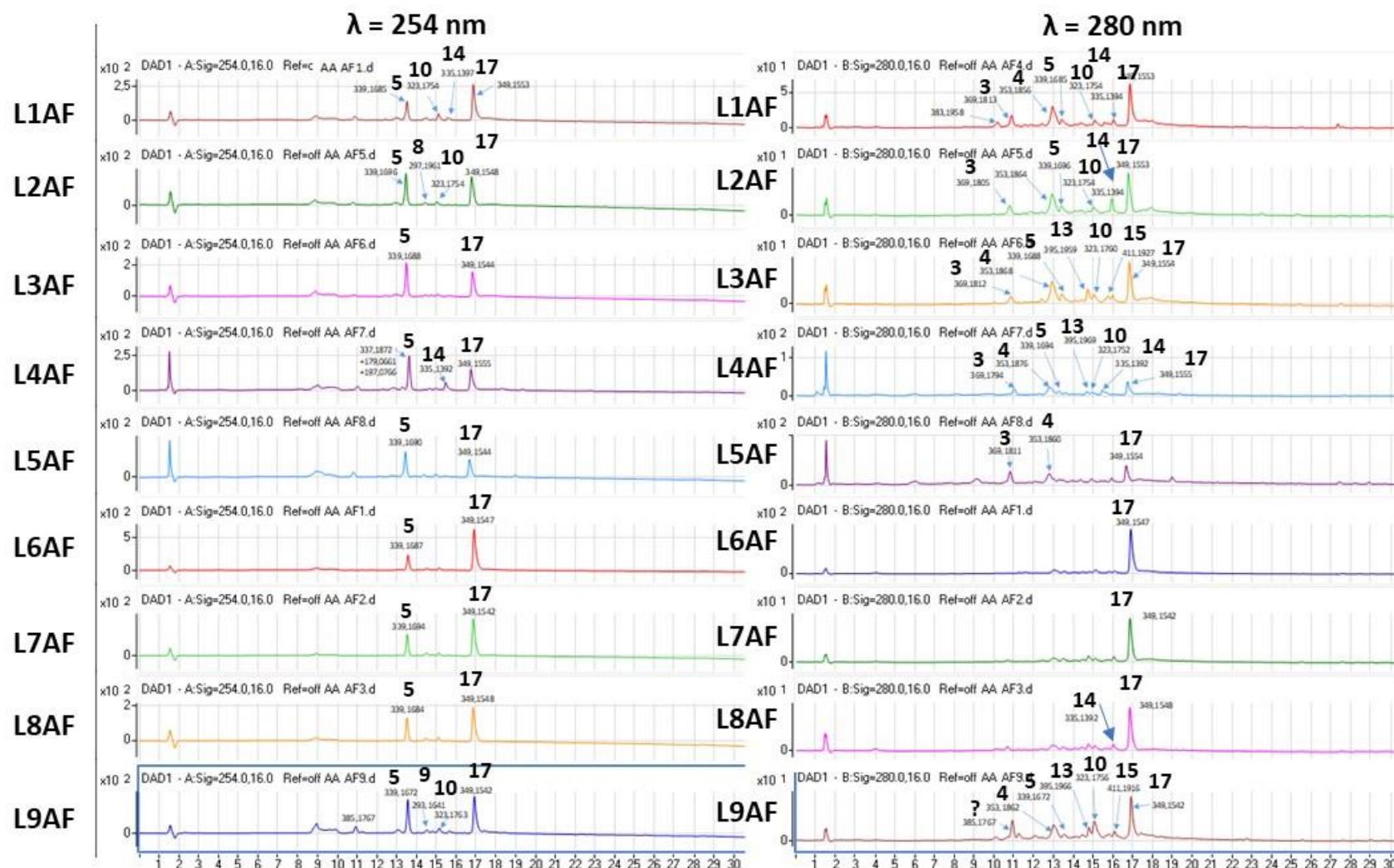


Figure 36 : Chromatogramme CLHP-UV-(MS/MS) des extraits par macération de pulpe à froid (extraits AF)



On constate une variabilité non négligeable du profil alcaloïdique en fonction des lots : certains alcaloïdes sont toujours présents, mais avec des abondances relatives variables (ex : **3**, m/z 369,168 ($[M+H]^+$), Tr 10,7 min ; **5**), voire très variables (**17**, m/z 349,155 ($[M+H]^+$), Tr 16,8 min : ce dernier est absent dans les lots L1-2 et L1-3). Le pic **14** (m/z 335,138 ($[M+H]^+$), Tr 15,7 min) n'est présent que dans quelques lots. Ces différences sont illustrées dans la figure 24 ci-dessous, qui compare l'ensemble des extraits traditionnels et par macération analysés, à $\lambda = 254$ nm (des valeurs de m/z théoriques sont indiquées). Le chromatogramme à $\lambda = 280$ nm n'est pas présenté, en raison d'importantes coélutions.

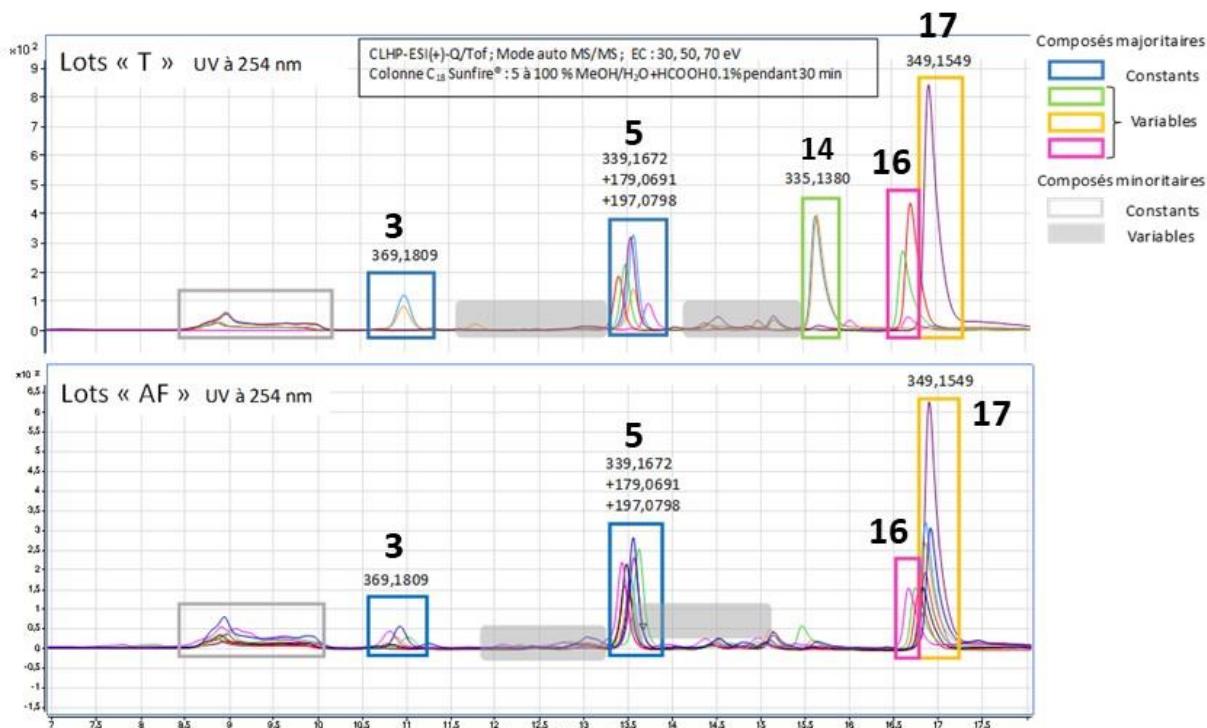


Figure 37 : Chromatogrammes comparés des extraits traditionnels (extraits T) et obtenus par macération de pulpe à froid (extraits AF)

Cette analyse comparative met en évidence deux profils chromatographiques, en fonction des lots de fruits :

- la majorité des lots donne des extraits aqueux avec deux alcaloïdes apparaissant comme majoritaires : **5** et **17** (m/z 339,1680 et 349,155 ($[M+H]^+$) (profil-type « 1 ») ;
- les lots L1-2 et L1-3, obtenus en avril 2017 (extraits traditionnels), ont pour alcaloïdes majoritaires : **5** (m/z 339,1680, $[M+H]^+$) et **14** (m/z 335,138, $[M+H]^+$), et une absence de **17** (profil-type « 2 »). Pour l'extrait L4AF (lot 4), le profil est intermédiaire.

Ces profils sont illustrés avec le détail des chromatogrammes des extraits L1-3T et L1AF à $\lambda = 254$ nm, ci-dessous (figure 25). Les différences de profils ne sont pas associées au mode d'extraction (voir les chromatogrammes des lots L6-L8 dans les figures 22 et 23).

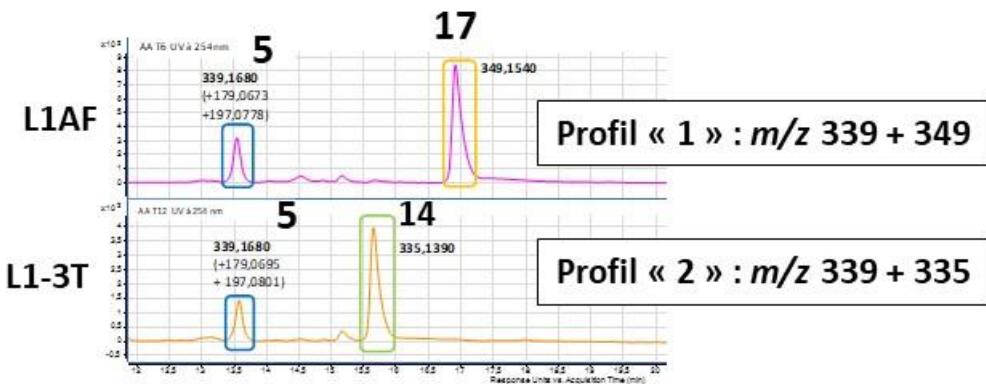


Figure 38 : Illustration des 2 profils-types des extraits aqueux obtenus à partir des différents lots de fruit de P. nitida (détail des chromatogrammes à $\lambda = 254$ nm)

La figure rappelle la présence systématique de deux molécules de masse paire, non alcaloïdiques, au temps de rétention : 13,73 minutes (m/z 179,0697 et 197,0802).

Cette comparaison montre qu'il existe une variabilité relative de constitution chimique des extraits de pulpe, selon leur provenance ou la période de récolte. Il convient d'objectiver ces différents profils, qui peuvent avoir des conséquences sur l'activité biologique des préparations. Une étude a donc été entreprise afin de déterminer les facteurs potentiels de variation.

4.2.2 Etude de la variabilité chimique : confirmation par analyse métabolomique

Une analyse métabolomique a ainsi été réalisée. Les extraits T et AF précédents ont été analysés par CLHP-MS/MS (ESI(+)-Q/ToF) avec triplicats analytiques (préparations d'échantillons indépendantes à partir des extraits secs), selon un ordre aléatoirement déterminé, avec injection de blancs et d'échantillons QC (*Quality Control*, mélange de l'ensemble des extraits). Les données ont été analysées avec l'outil Metaboanalyst 4.0 (*statistical, functional and integrative analysis of metabolomics data*) (Chong, 2019), disponible sur un serveur web, exploitant des fichiers .csv, générés après traitement des données avec le logiciel MZMine2. Après élimination des données manquantes et normalisation des données (médiane, Pareto scaling), nous avons réalisé une analyse chimiométrique multivariée en composante principale (PCA). Les paramètres employés sont présentés dans la partie Matériel et méthodes. Les lieux d'obtention et dates de récolte des différents lots sont rapportés dans le tableau 18 plus haut.

Les 2 premiers composants du modèle PCA comptent pour 63,9 % de la variance. La PCA sépare les échantillons en 3 groupes principaux (figure 26).

On remarque que les extraits traditionnels (T) ou obtenus par macération (AF) issus d'un même lot de fruits ne sont pas associés de manière systématique par l'analyse PCA, contrairement à ce qui était attendu. Ces différences pourraient être liées à des rendements d'extraction différents pour des composés individuels (**13**, m/z 395,19, isomère de l'akuammiline par exemple), ou à une contribution de molécules issues de l'épicarpe dans les extraits traditionnels. Comme anticipé, le profil-type « 1 » (L1-2T, L1-3T) et le profil-type « 2 » sont largement différenciés. Les ions correspondant aux alcaloïdes **14** et **17** (isomère et analogue de la serpentine probables) en sont bien responsables d'après le PCA

biplot et la *heatmap* (« carte de chaleur ») générée à partir de ces données (analyse ANOVA). L'analyse fait également émerger d'autres ions différenciants, minoritaires, qui ne sont pas associés aux 2 profils distincts mentionnés précédemment. Ces ions sont, en particulier :

- **16** : m/z 343,17 ($[M+2H]^{2+}$) (et m/z 685,34 ($[M+H]^+$)) ;
- m/z 385,17, à Tr 11,2 min (peu abondant, non repéré initialement dans le réseau et les chromatogrammes ; formule brute : $C_{21}H_{26}N_2O_5$; pour cette formule brute, le DNP propose 13 alcaloïdes indolomonoterpéniques, comme par exemple l'echitamidine (19,20-dihydro-19-hydroxyakuammicine)) ; Cet ion est différenciant pour le lot L9, échantillon dans lequel cet alcaloïde est relativement abondant.
- m/z 367,20, à Tr 16,5 min (idem ; formule brute : $C_{22}H_{26}N_2O_3$; le DNP propose 43 alcaloïdes indolomonoterpéniques ; la mélonine A, le picralinal, la pseudo-akuammine, identifiées dans l'espèce, par exemple).

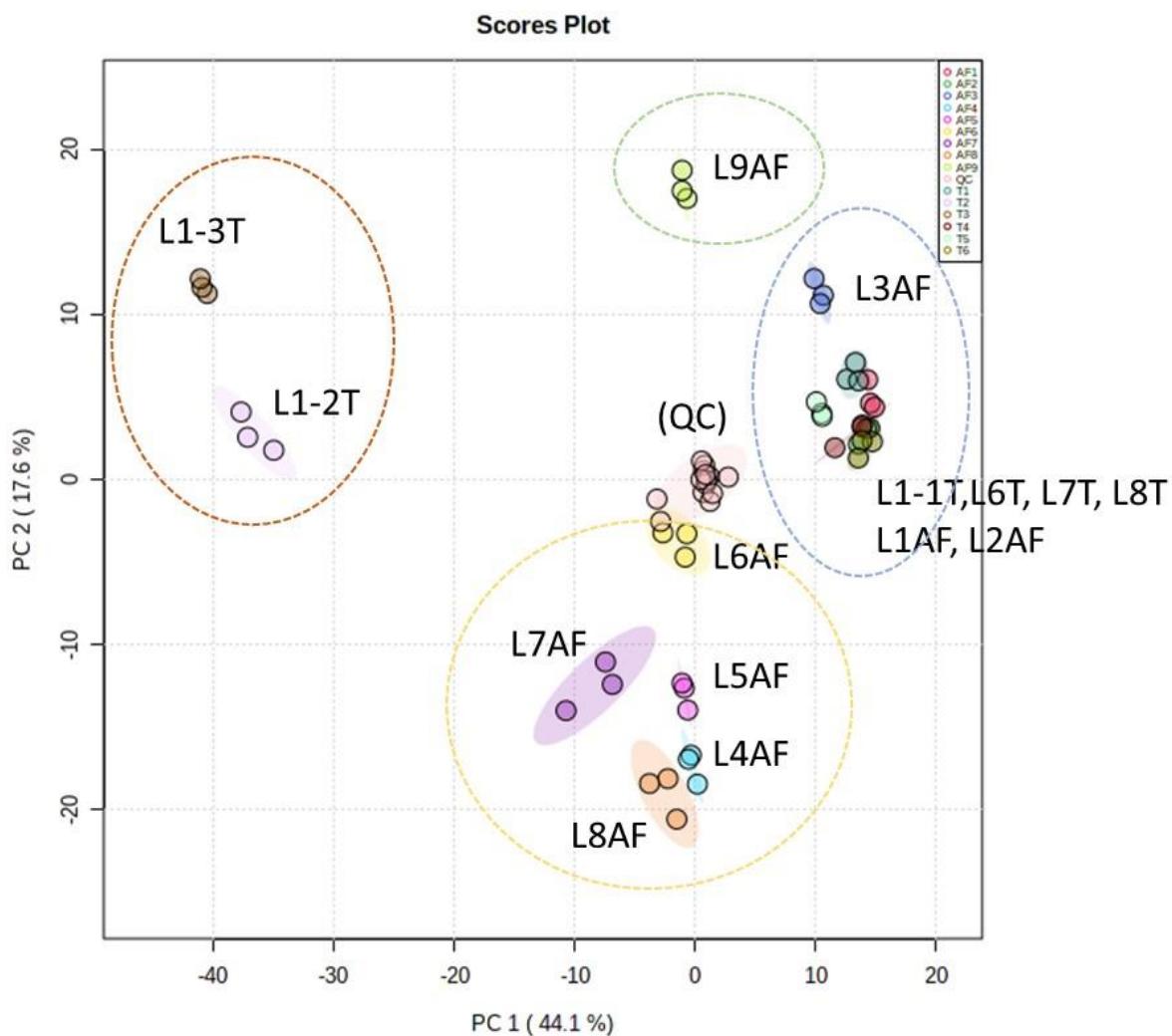


Figure 39 : Analyse PCA sur les extraits traditionnels (extraits T) et obtenus par macération de pulpe à froid (extraits AF)

Rq : les QC apparaissent sur la figure seront éliminés dans la version finale du manuscrit

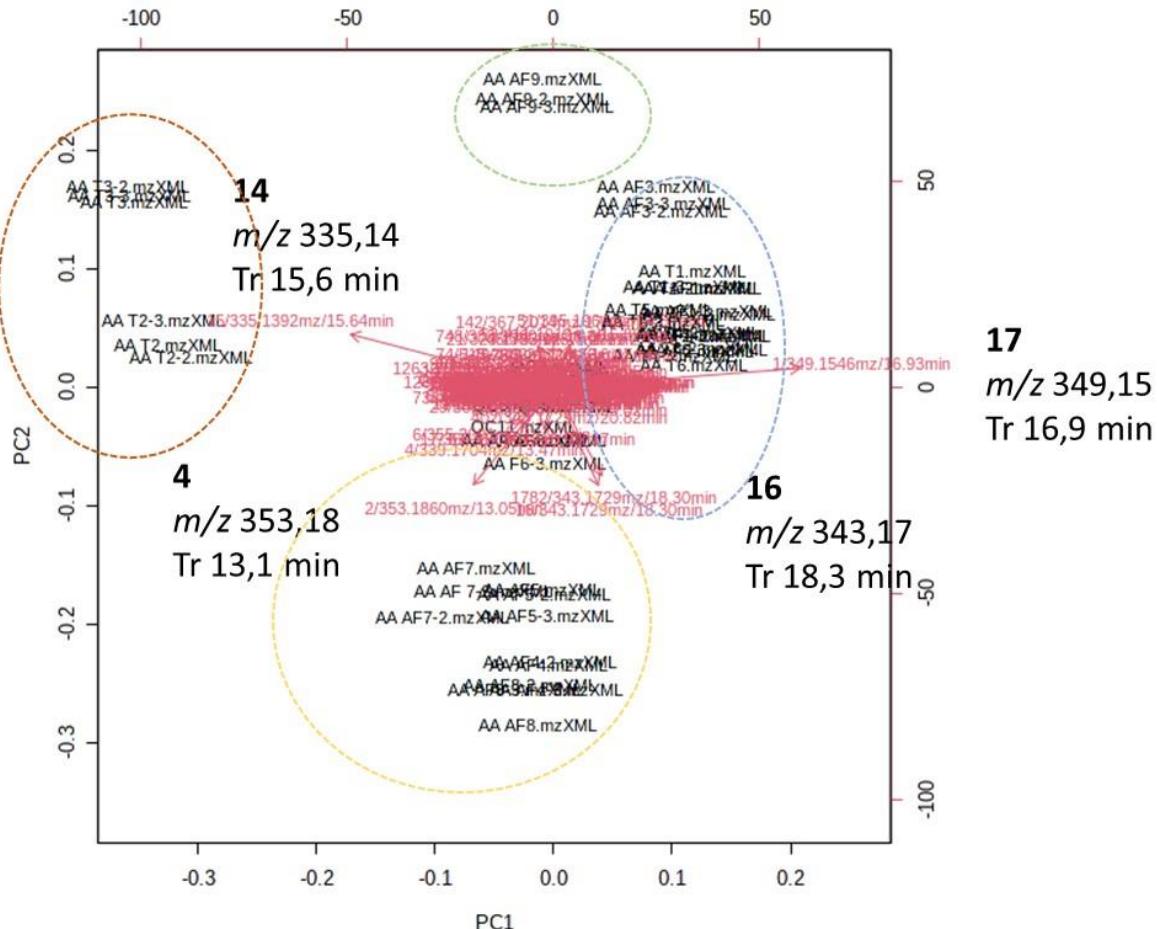


Figure 40 : Analyse PCA sur les extraits aqueux (T traditionnels ; AF macération) : PCA biplot sur PC1, PC2 (nuages de points projetés)

Les principaux ions responsables de la variance sont indiqués figure 27, figure 28 ; on a différences légères de temps de rétention par rapport à l'analyse initiale de l'extrait L1-1T ;
Rq : les QC seront éliminés dans la version finale du manuscrit.

Le traitement de l'ensemble de ces données par la méthode des réseaux moléculaires n'apporte pas d'informations complémentaires : ces analyses ne sont pas exposées dans le manuscrit.

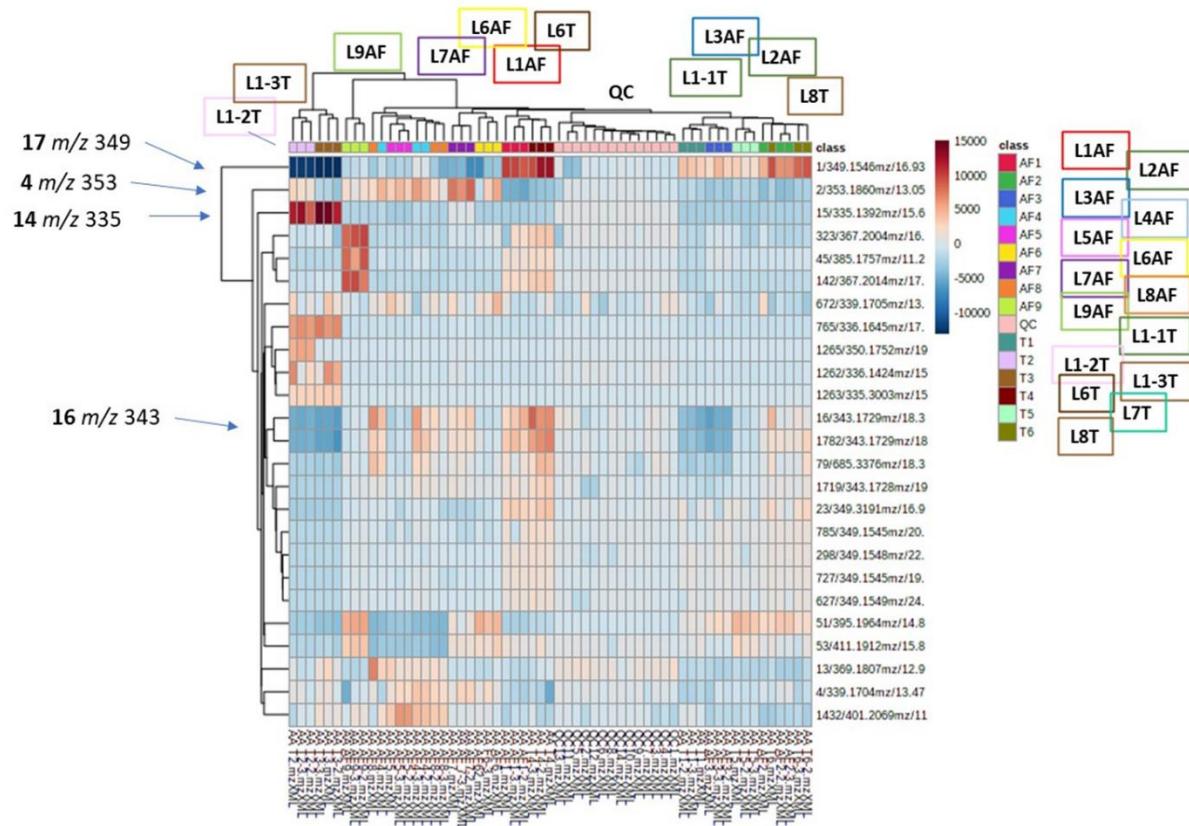


Figure 41 : Heatmap générée par l'analyse PCA pour les extraits aqueux (T traditionnels ; AF macération)

Rq : Les QC seront éliminés dans la version finale du manuscrit. On remarque des problèmes dans l'élimination des isotopes pour quelques ions (m/z 336, par exemple).

En conclusion, l'analyse PCA confirme les observations réalisées par examen simple des chromatogrammes, mais indique également le fait que l'ion m/z 685 (16, $[M+H]^+$, Tr 18,3 min, associé à l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ à m/z 343 ; cette masse correspond à celle de la serpentine) est différenciant entre les lots. Hormis la période de récolte commune pour un groupe sur la PCA (L1-2, L1-3, obtenus en avril 2017), il n'est pas possible d'expliquer les facteurs de variation sur la base des informations recueillies (date, lieu de culture, calibre du fruit).

4.2.3. Profil alcaloïdique en fonction du degré de maturité du fruit

Les analyses chromatographiques qualitatives suivantes ont été réalisées par UHPLC-DAD-HRMS/MS (ESI(+)-Q/ToF) en raison du gain de temps d'analyse offert par cet appareillage, devenu disponible au laboratoire au cours de cette thèse.

Nous avons d'autre part décidé de travailler sur des décoctés de pulpe : cette méthode permet d'obtenir des rendements d'extraction supérieurs à la méthode traditionnelle initialement étudiée, ce qui est propice à la réalisation de plusieurs analyses et des tests biologiques. Ce mode d'extraction a également été mentionné au cours de notre enquête pour la préparation de remèdes antipaludiques. On remarquera que d'un point de vue sanitaire, elle est susceptible d'engendrer une moindre exposition bactérienne pour le patient que la macération.

La majorité des lots étaient constitués d'un ou de plusieurs fruits exclusivement mûrs (notés A). Pour certains lots, des fruits immatures (notés B) ou peu mûrs (notés C) ont pu être obtenus. Ils ont été traités à part et des profils chromatographiques ont également été obtenus.

4.2.3.1. Analyse comparative des extraits de pulpe de fruits mûrs de *Picralima nitida* obtenus par décoction

Le passage à l'UHPLC réduit le temps d'analyse à 8 minutes. La résolution chromatographique demeure correcte. L'élution a été réalisée avec de l'acétonitrile et non plus du méthanol : la sélectivité est en revanche modifiée. Les profils chromatographiques sont similaires à ceux observés précédemment. Une superposition des chromatogrammes obtenus est présentée dans la figure 29.

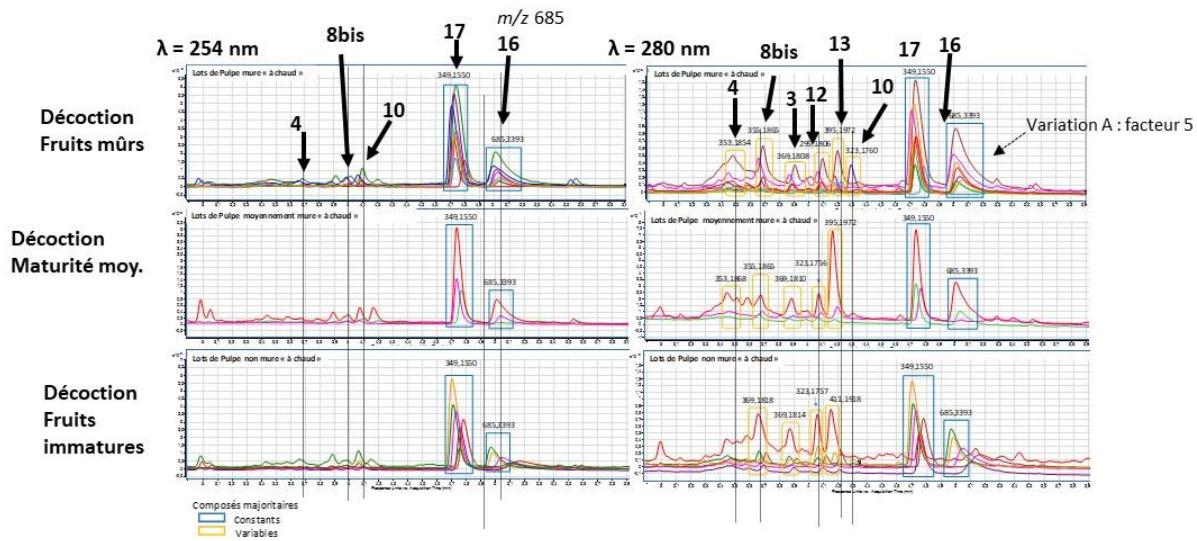


Figure 42 : Récapitulatif des chromatogrammes UV à $\lambda = 254$ et 280 nm de l'analyse UHPLC-UV-MS/MS des décoctés de fruits de *P. nitida* (différents stades de maturité)

Le pic **16** correspondant potentiellement à la serpentinine est majoritairement visible sous forme de son adduit monochargé. La modification du mode de préparation augmente manifestement le rendement d'extraction de **16**, qui apparaît plus abondant, d'après les chromatogrammes UV, que dans les extraits obtenus à froid. Cet alcaloïde devient parfois un des constituants majoritaires, avec

17 (m/z 349,1550 et 685,3393). L'ion m/z 339 (**5**) est toujours présent, mais il apparaît moins abondant, relativement, que dans les extraits réalisés à froid. L'ion m/z 355 (**8bis**, Tr = 15,40 min) apparaît au contraire comme plus abondant que pour les extraits précédents.

Les extraits ont un « profil-type 1 » ou intermédiaire.

Une analyse par la méthode des réseaux moléculaires appliquée à ces extraits ne montre pas d'éléments nouveaux en termes de déréPLICATION, ni de différences particulières liées au degré de maturité. Cette analyse n'est pas montrée ici.

Les composés majoritaires et leurs temps de rétention en UHPLC sont indiqués dans la table 19.

Tableau 19 : Alcaloïdes majoritaires dans les décoctés de pulpe de *P. nitida* en UHPLC-MS/MS

Pic	Tr (min)	m/z mesuré [M+H] ⁺	m/z théorique [M+H] ⁺ ^a	Formules brutes (M)	Identité proposée
4	3,48	353,1867	353,1844	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	Raubasine = Ajmalicine ?
8bis	3,76	355,1865	355,1836	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	Diastéréoisomère de la Yohimbine ?
10	4,09	323,1754	323,1768	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	Akuammicine ?
12	4,16	295,1809	295,1812	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	-
13	4,24	395,1973	395,1955	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	Akuammiline ?
16	4,78	349,1550	349,1537	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ ^a	Diastéréoisomère de la Serpentine ?
17	5,12	685,3393	685,3393	C ₄₂ H ₄₄ N ₄ O ₅ ^a	Serpentinine ou 20'-épi-serpentinine ?

^a le cas échéant [M]⁺

Les chromatogrammes figurent dans l'annexe 9.

4.2.3.2. Analyse métabolomique

Les échantillons obtenus par décoction ont été injectés en triplicats indépendants, avec des échantillons « QC ». Après traitement des données avec MZMine2, élimination des données manquantes dans plus de 50 % des échantillons et normalisation (par médiane, Pareto scale), une analyse PCA a été réalisée. Elle n'explique que 43 % de la variance (Figure 30). Les molécules principalement responsables des différences entre échantillons sont des alcaloïdes. Ce sont les ions: m/z 367, Tr 5 min ; m/z 349 (pic **17**), Tr 4,79 min ; m/z 369, Tr 3,6 min.

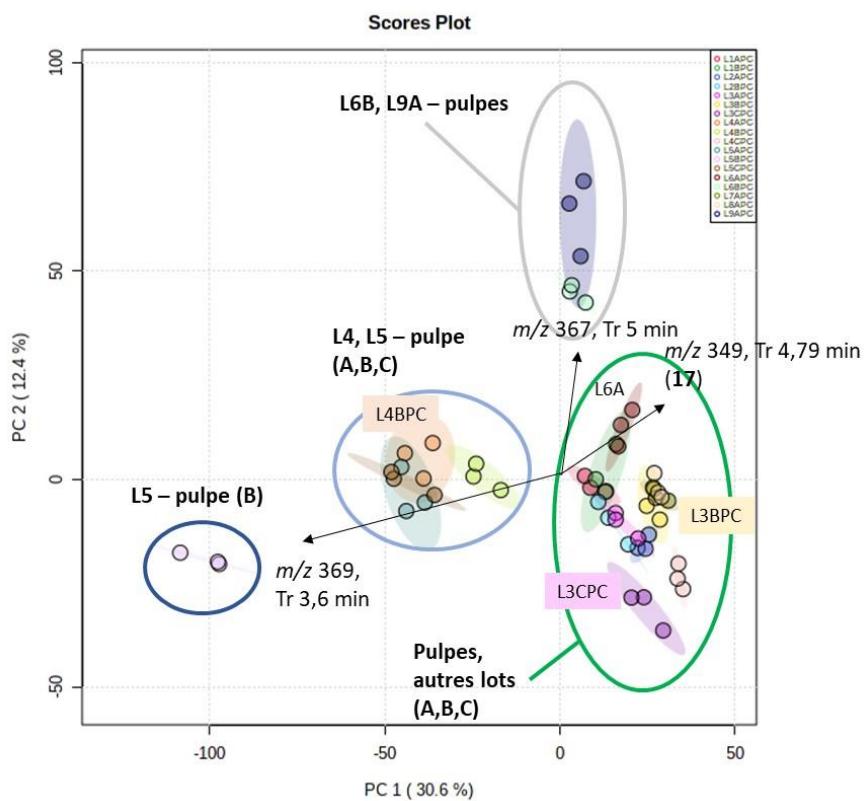


Figure 43 : Analyse PCA sur les décoctés de pulpe et ions principaux du PCA biplot sur PC1, PC2

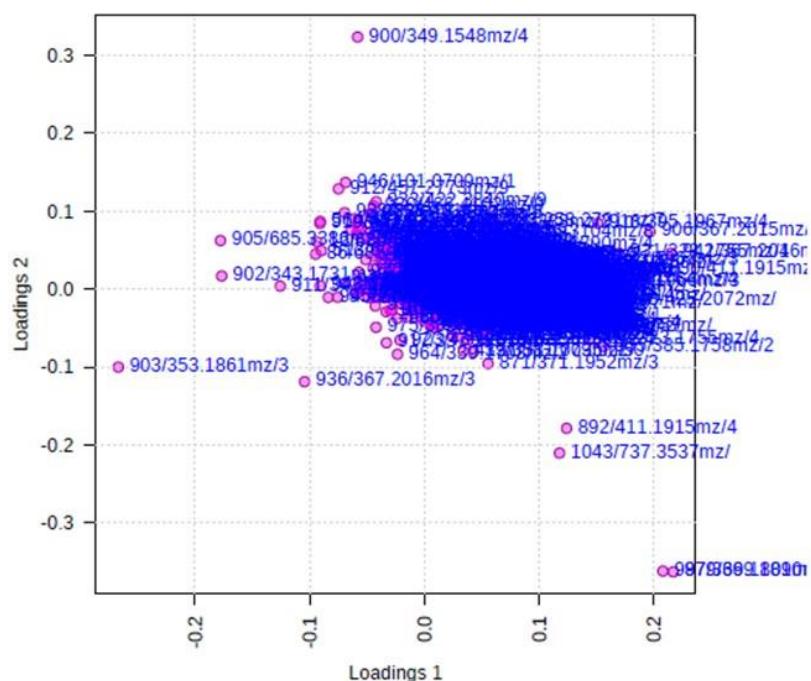


Figure 44 : Analyse PCA sur les décoctés de pulpe : Loading plots PC1 / PC2

Les ions qui induisent le plus de variance sont **17**, comme dans l'analyse PCA précédente, et les ions à *m/z* 367 (Tr 4,8 min) et *m/z* 369 (Tr 3,6 min) qui avaient été indiqués par la Heatmap lors de l'analyse précédente (Figure 28, sur les extraits traditionnels et les macérats aqueux).

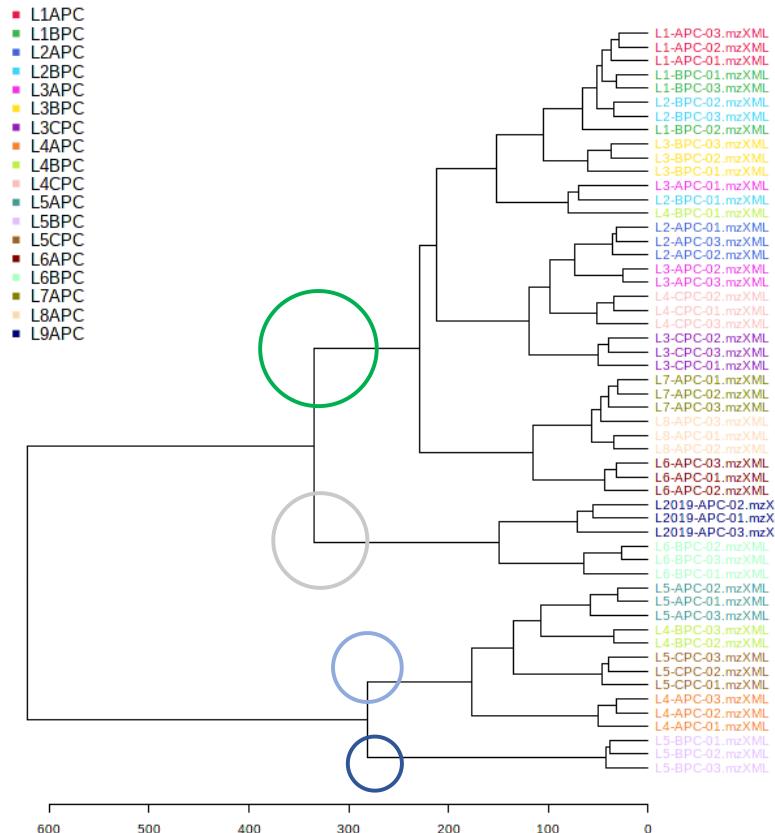


Figure 45 : Analyse des décocots de pulpe : dendrogramme

Hierarchical Clustering Dendrogram - Distance Measure: Euclidean, Clustering Algorithm: Ward

La construction d'un dendrogramme indique l'individualisation observée précédemment et confirme que les fruits à différents degrés de maturité d'un même lot ont tendance à être regroupés, mais pas de manière systématique. La majorité des lots tend à avoir une composition proche. Les lots obtenus en Janvier 2019 (L4, L5) sont regroupés, sans distinction de degré de maturité ou d'origine.

En conclusion : la variabilité inter-lots semble restreinte, les ions discriminants correspondent à des alcaloïdes ; la maturité n'influence que peu la composition. C'est la date de récolte qui semble le plus susceptible d'engendrer des variations.

4.2.4. Comparaison avec les péricarpes et les graines

Les analyses UHPLC-MS/MS menées sur les décocots de pulpes (3 degrés de maturité) ont été complétées par celles des extraits des péricarpes et des graines des mêmes lots. Ces extraits ont été obtenus dans les mêmes conditions (décocction aqueuse : 1 h à reflux) et ont été chromatographiés dans

les mêmes conditions. Les échantillons ont été analysés en triplicats analytiques, et des QC ont été injectés (QC : extraits de graines, de péricarpes, de pulpes, tous échantillons). Les chromatogrammes figurent dans l'annexe 9. Une analyse PCA (figure 33) a été menée sur ces données.⁹ L'analyse explique plus de 55 % de la variance (PC1, PC2). Elle individualise les graines, ainsi que certaines pulpes : les regroupements de celles-ci sont homogènes avec les résultats précédents (voir figure 30 pour la PCA sur pulpes seules).

Les chromatogrammes des décoctés de péricarpe montrent un profil proche de celui des pulpes, confirmé par l'analyse PCA. Les mêmes alcaloïdes majoritaires sont observés, avec une apparente corrélation des abondances relatives des alcaloïdes **14** et **17** par rapport aux extraits de pulpes, pour les différents lots.

Pour les graines, les profils des différents lots sont également proches. La déréplication à l'aide des réseaux moléculaires a donné des résultats décevants en raison d'un problème dans le nettoyage des données, et sera réétudiée. Les composés dérépliqués sont plus abondants que dans les autres organes étudiés.

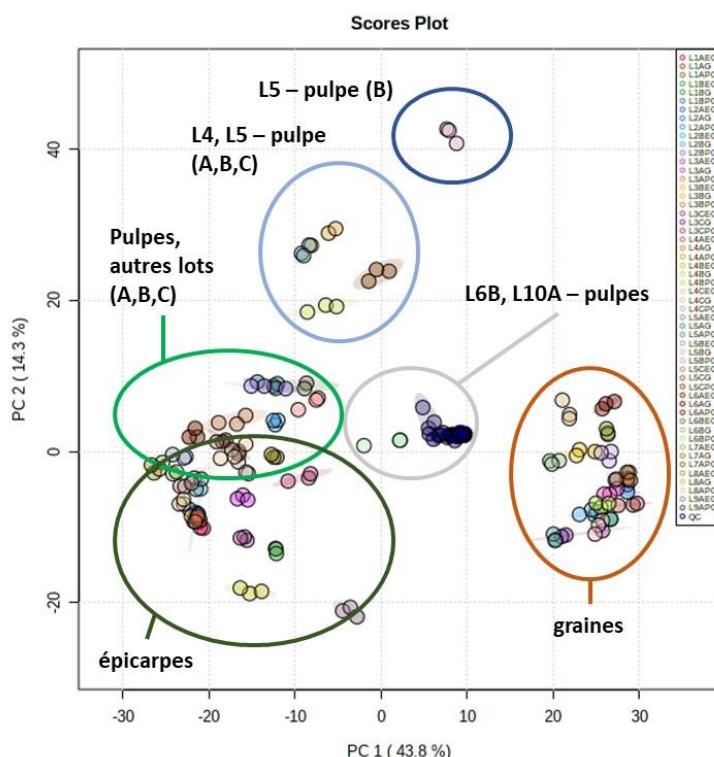


Figure 46 : Analyse PCA sur les extraits de pulpe, de péricarpes et de graines

⁹ (Remplacement des valeurs manquantes restantes par 1/5^e de la LOD, remplacement des valeurs avec > 25 % des déviation standard dans les QC par les valeurs médianes, normalisation par somme avec *pareto scaling*)

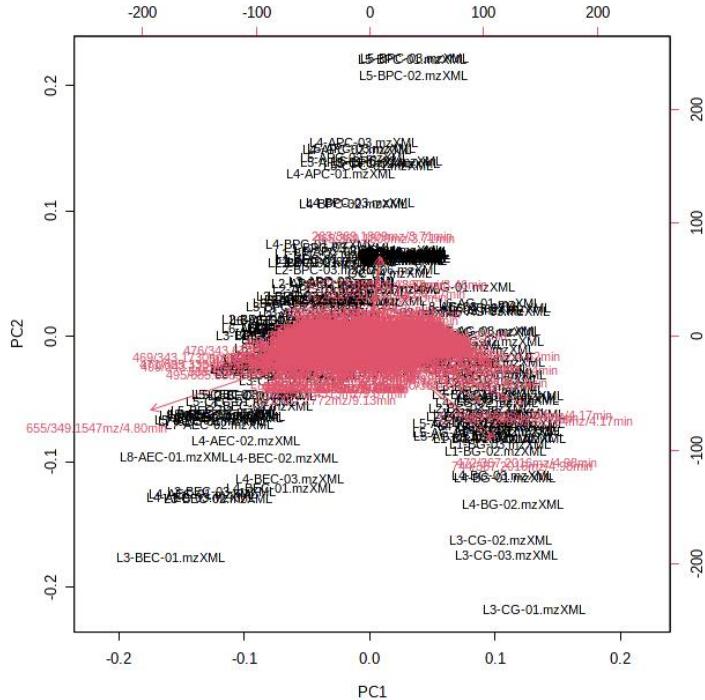


Figure 47 : Analyse PCA sur les extraits de pulpe, de péricarpes et de graines : biplot

Les ions différenciants sont présentés plus loin.

4.2.4.1. Profil UHPLC-MS/MS des péricarpes

Pour les péricarpes, quel que soit le degré de maturité, le composé **17** prédomine. **16** est toujours présent. Des chromatogrammes types à $\lambda = 280$ nm sont présentés dans la figure 35 suivante.

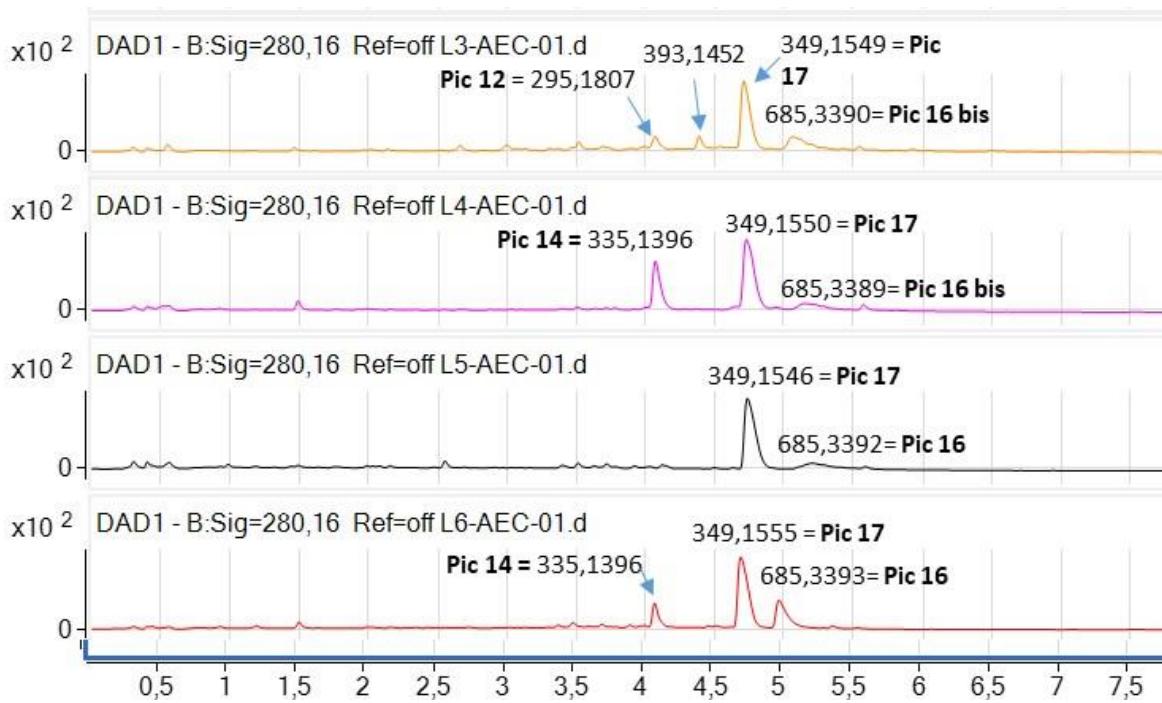


Figure 48 : Chromatogrammes-types d'extraits du péricarpe de P. nitida, $\lambda = 280 \text{ nm}$

Analyse UHPLC-MS/MS, extraits L3AEC à L6AEC ; fruits mûrs. Dans la figure, à **16bis**, il faut lire « **16** ».

Les composés majoritaires détectés et leurs temps de rétention en UHPLC sont indiqués dans la table 20.

Tableau 20 : Alcaloïdes majoritaires dans les décoctés de péricarpe de P. nitida en UHPLC-MS/MS

Pic	Tr (min)	m/z mesuré [M+H] ⁺ ^a	m/z théorique [M+H] ⁺ ^a	Formules brutes (M)	Identité proposée
12	4,10	295,1805	295,1812	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	-
14	4,16	335,1391	335,1401	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	Analogue déméthylé de serpentine ? Rauvotéraphylline ?
	4,44	393,1450	393,1450	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₅	-
16	4,78	349,1547 ^a	349,1537	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	Diastéréoisomère de la Serpentine ?
17	5,12	685,3389 ^a	685,3389	C ₄₂ H ₄₄ N ₄ O ₅	Serpentinine ou 20'-épi-serpentinine ?

^a le cas échéant [M]⁺

4.2.4.2. Profil UHPLC-MS/MS des graines

Dans les graines, les profils alcaloïdiques sont plus complexes. Le degré de maturité ne montre pas de différences majeures de composition, hormis une augmentation de l'intensité des pics correspondant à m/z 309, 1602 (Tr : 3,5 min). le composé **10** prédomine. Les abondances d'un autre ion à la même masse (Tr 4,3 min) et de **13** est variable. Des chromatogrammes types à $\lambda = 280$ nm sont présentés dans la figure 36 suivante.

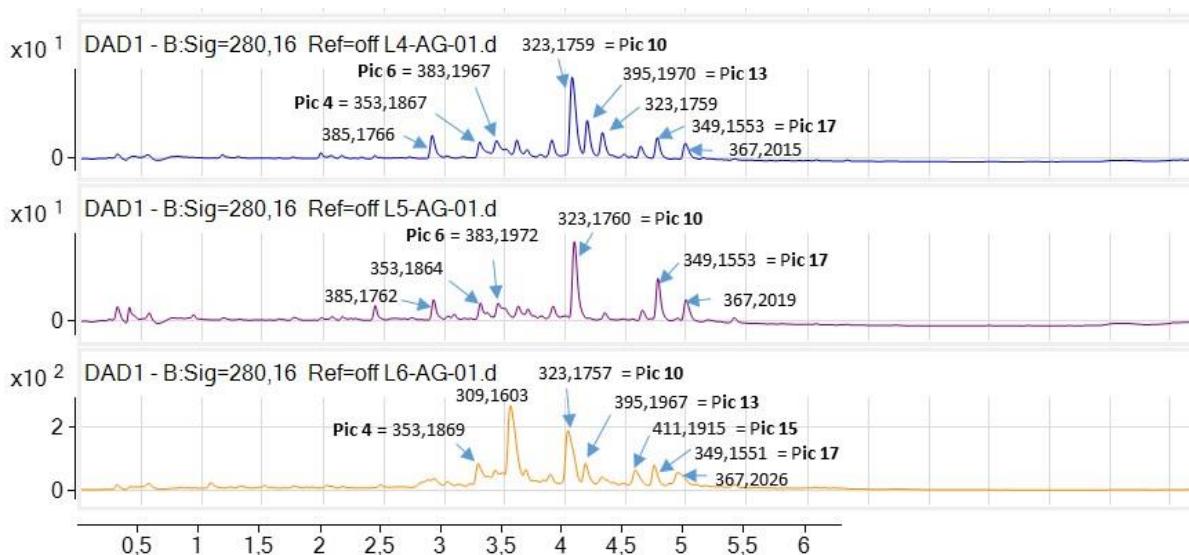


Figure 49 : Chromatogrammes-types d'extraits de graines de P. nitida, $\lambda = 280$ nm

Analyse UHPLC-MS/MS, extraits L4AG à L6AG ; fruits mûrs.

Les composés majoritaires et leurs temps de rétention en UHPLC sont indiqués dans la table 21.

Tableau 21 : Alcaloïdes détectés dans les décocots de graines de P. nitida en UHPLC-MS/MS

Pic	Tr (min)	m/z mesuré [M+H] ⁺ ^a	m/z théorique [M+H] ⁺ ^a	Formules brutes (M)	Identité proposée
	2,94	385,1767	385,1767	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₅	-
4	3,35	353,1867	353,1844	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	Raubasine = Ajmalicine ?
6	3,49	383,1971	383,1977	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	Picraphylline ?
	3,62	309,1603	309,1603		-
10	4,10	323,1756	323,1768	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	Akuammicine ?
13	4,24	395,1970	395,1955	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	Akuammiline ?
	4,37	323,1759	323,1759		Isomère de l'Akuammicine ?
15	4,64	411,1918	411,1902	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	Picraline ?
18	4,78	353,1869	353,1838	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	Akuammigine ?
17	4,85	349,1553 ^a	349,1537	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	Diastéréoisomère de la Serpentine ?
	4,98	367,2020	367,2020	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	-

^a le cas échéant [M]⁺

4.2.4.3. Ions différenciants

L'analyse des données avec Metaboanalyst sous forme de Heatmap (figure 37) montre, comme ions différenciants entre les groupes identifiés par PCA, 8 composés dont la formule brute indique la nature non alcaloïdique (certains associés aux différents organes), parmi les 25 principaux. Les autres ions sont de nature alcaloïdique, avec notamment :

- m/z 737,353 et m/z 369, (a priori **3**, burnamine), associés à certaines pulpes (lots L4, L5) ;
- m/z 337 ($C_{21}H_{24}N_2O_2$), non identifié (31 propositions d'indolomonoterpènes dans le DNP) ;
- m/z 385,17 ($C_{21}H_{24}N_2O_5$) et m/z 367,20 ($C_{22}H_{26}N_2O_3$), différenciants de certains lots de graines (masse mise en évidence dans les pulpes, pouvant correspondre à m/z 367,20 ; de nombreux indolomonoterpènes présentent cette formule brute ; la mélönine A, le picralinal, la pseudo-akuammine, identifiées dans l'espèce, par exemple). L'ion m/z 385 différencie aussi le lot de pulpe L9, comme précédemment, et le péricarpe correspondant.
- m/z 355,18 (**8bis** ; $C_{20}H_{22}N_2O_4$), associé aux graines (lot L6, en particulier).

Les ions **14, 17** apparaissent parmi les ions différenciants, mais pas dans le « top 25 ».

En conclusion, d'un point de vue qualitatif, les ions principaux sont des alcaloïdes indolomonoterpéniques.

La différence pulpe / péricarpe est minime ; les différences de maturité, les lieux de production n'induisent pas de différence objectivable de la composition pour les différents organes étudiés.

Seule la moyenne des échantillons est représentée dans la Heatmap.

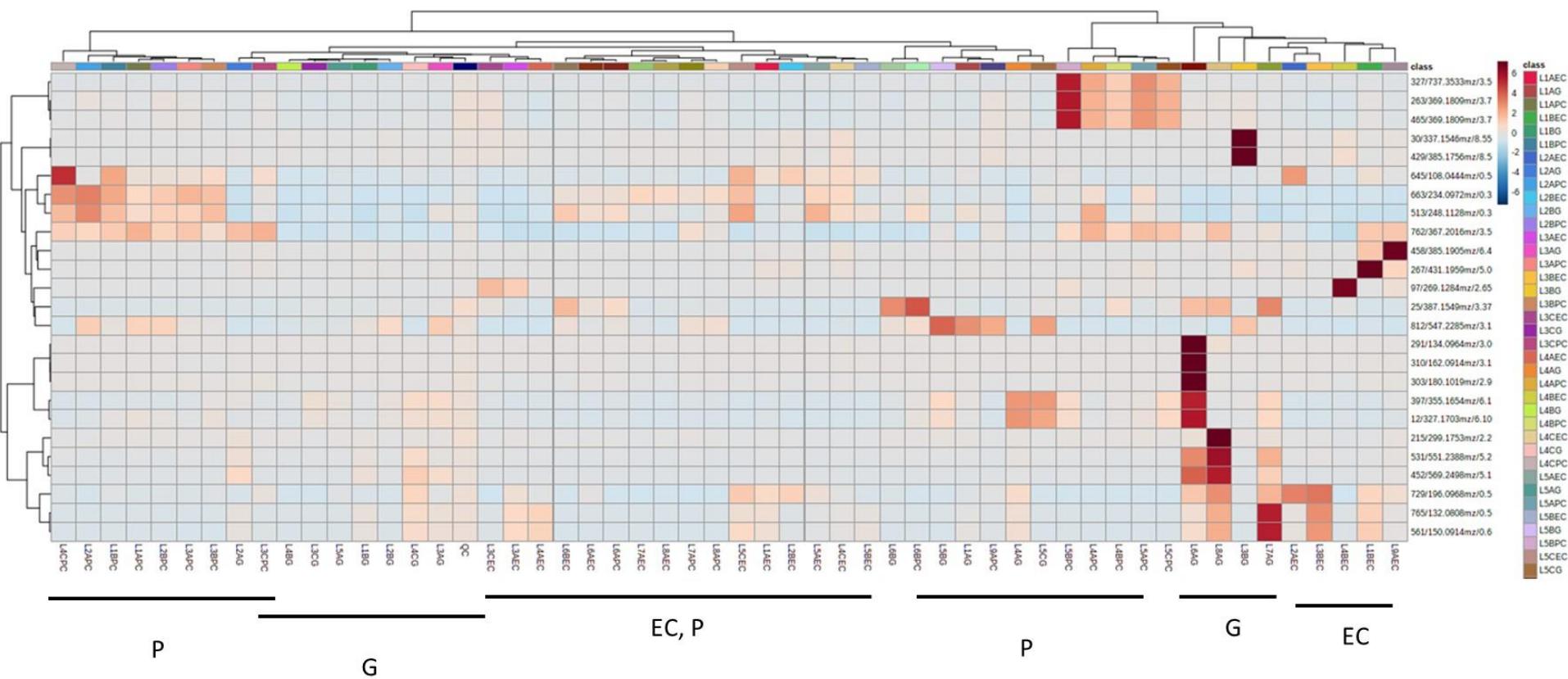


Figure 50 : Heatmap - extraits de pulpes, péricarpes et graines.

Analyses UHPLC-MS/MS - décortiqués de pulpes (3 degrés de maturité), péricarpes et graines, lots L1 à L8, L9.

Codes : n° Lot (L1-8), degré de maturité (A, B, C), drogue végétale : EC : péricarpe, P : pulpe, G : graines

Groupes : moyenne des échantillons. (*Distance Measure: Euclidean ; Clustering Algorithm: Ward*)

4.2.5. Dosage des alcaloïdes totaux des pulpes

Afin d'évaluer quelle quantité d'alcaloïdes est susceptible d'être ingérée par un patient utilisant les fruits de *P. nitida*, nous avons réalisé une purification des alcaloïdes totaux par la méthode usuelle de partage entre l'eau et un solvant organique non miscible (acétate d'éthyle, AcOEt), exploitant la solubilité différentielle des alcaloïdes en fonction du pH (voir partie expérimentale). Les résidus ont été pesés. Cette approche gravimétrique nous semblait plus facile à mettre en œuvre qu'un dosage acidobasique en retour, en raison de la diversité de la basicité des alcaloïdes indolomonoterpéniques (dont les solubilités et les coefficients de partage sont également variés). Ces purifications d'alcaloïdes totaux ont été réalisées à partir d'extraits aqueux de pulpe de type traditionnel, par macération ou par décoction, sur 12 des lots de fruits récoltés. Pour 4 lots, plusieurs degrés de maturité étaient disponibles.

Les résultats sont exprimés en % d'alcaloïdes totaux m/m par rapport à la masse de pulpe fraîche mise en jeu. On rappelle qu'un fruit contient 300 g de pulpe fraîche en moyenne (pour une masse moyenne totale du fruit de 921 g, graines comprises), dont la teneur en eau est de l'ordre de 90 %. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante. La moyenne est de 94 ± 65 mg d'alcaloïdes totaux pour 100 g de pulpe fraîche mise en jeu dans l'extraction aqueuse (soit 9 mg à 239 mg d'alcaloïdes pour 100 g, avec un écart à la moyenne > 69 %, sur 19 échantillons de fruit, en considérant le degré de maturité). On note une forte disparité des résultats, dénotant malheureusement de possibles problèmes de pesée.

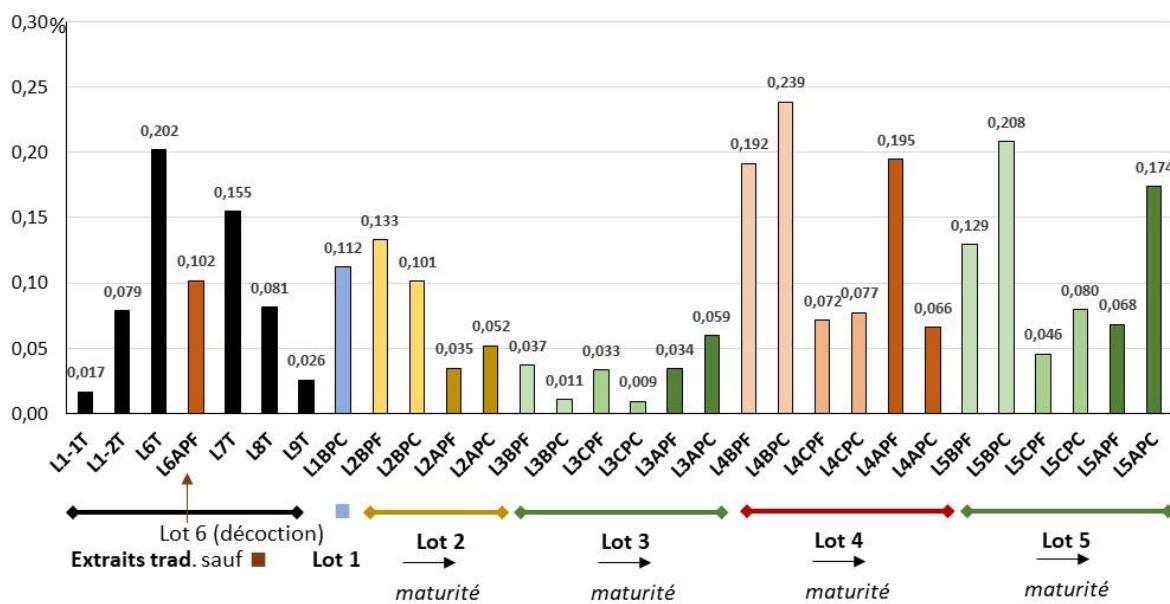


Figure 51 : Estimation de la teneur en alcaloïdes totaux, en % m/m de pulpe (poids frais)

Code des extraits : i) n° Lot (L1-1 à L9) ; ii) degré de maturité du fruit (B : immature, C : maturité moyenne, A : mûr) ; iii) type d'extract (T : traditionnel [tous à partir de fruits mûrs], F : macération, C : décoction). (Par exemple : L8T : Lot 8, extrait traditionnel ; L3CPC : Lot 3, pulpe maturité moyenne (CP), décoction (C))

On n'observe pas de corrélation claire entre la teneur en alcaloïdes et le degré de maturité. Les différences de rendements obtenus par macération (24 h) ou décoction (1 h) pour un même échantillon indiquent la nécessité de réaliser des investigations complémentaires.

Les quantités d'alcaloïdes ingérées par les patients employant des préparations traditionnelles serait en moyenne de 280 mg par prise (\pm 195 mg / prise), soit 560 ± 390 mg/jour. La forte variabilité de teneur constatée ici révèle une forte incertitude relative à cette quantité d'alcaloïdes consommée, et dès lors à l'efficacité de la préparation traditionnelle. Cette dose d'alcaloïdes semble élevée.

4.2.6. Dosage des alcaloïdes majoritaires des pulpes

Nous avons envisagé de doser les alcaloïdes apparaissant comme les plus abondants d'après les chromatogrammes UV observés à $\lambda = 254$ et 280 nm. Ce dosage a porté sur les pics chromatographiques suivants : **3, 4, 5, 14, 17**. Il a été réalisé par CLHP-UV-DAD, dans des conditions chromatographiques identiques à celles employées en CLHP-UV-MS/MS, mais sur un autre appareillage. Il a porté sur 8 extraits obtenus par selon la méthode traditionnelle de macération dans le fruit (extraits T), correspondant à 7 lots de fruits (L1-1, L1-2, L1-3, L1-4, L6, L7, L8), dont 1 lot avec un fruit mûr et un fruit immature traités séparément (extraits L6AT et L6BT, respectivement), soit 8 extraits.

4.2.6.1. Témoins employés

Pour l'établissement de la droite d'étalonnage et la détermination de la validité du dosage (limite de détection – LOD – *Limit of detection* ; limite de quantification – LOQ – *Limit of quantification* ; répétabilité, reproductibilité, justesse), des témoins étaient nécessaires :

- La burnamine **3** ($m/z_{\text{théorique}} = 369,1819$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) était disponible dans la chimiothèque de l'équipe Chimie des substances naturelles de BioCIS ;
- Les produits **4** (raubasine, $m/z_{\text{théorique}} 353,1863$), **5** (une *nor*-raubasine ? ; $m/z_{\text{théorique}} 339,1697$), **14** ($m/z_{\text{théorique}} 335,1380$; probablement une *nor*-serpentine) et **17** ($m/z_{\text{théorique}} 349,1542$ – un épimère de serpentine) ont été isolés à partir des graines de *P. nitida* (extrait préparé par le Dr. Laurent Evanno) ou d'un mélange d'extraits de pulpe (des lots L1-1, L1-2, L1-3, L1-4, L1, L2, L3, L4, L5, en fonction de leurs profils chromatographiques).

L'isolement de ces produits, avec recours à des techniques chromatographiques usuelles (chromatographie moyenne pression, phase normale ; CLHP préparative, phase inverse), est décrit par des schémas de purification qui figurent dans la partie expérimentale de ce manuscrit. Les structures de ces molécules sont en cours d'établissement : les spectres RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC ont été obtenus. Certains devront être réenregistrés en fonction d'une trop faible résolution. Les molécules à m/z th. 395,1958 et 323,1751 n'ont pas pu être obtenues. Un bilan des isolements est proposé dans la partie matériel et méthodes (partie 9), ainsi que les données spectrales obtenues à ce stade (partie 10 : les données RMN obtenues et les attributions des signaux sont rassemblés dans cette partie).

4.2.6.2. Paramètres et validation du dosage

Les lignes directrices de l'EMA ont été suivies pour la validation du dosage (EMA, 2011):

- Chacun des témoins a fait l'objet de l'établissement d'une gamme d'étalonnage comprenant au moins 5 concentrations. Les extraits et les témoins ont été analysés en CLHP-UV, intercalés par des blancs (MeOH).
- La répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été déterminées par une injection de chaque concentration du témoin répétée 3 fois successivement, avec des blancs, allant de la dilution la moins concentrée à la plus concentrée, et a également porté sur des injections multiples d'un extrait.
- La justesse a été mesurée en injectant 3 points de gamme nouvellement préparés à 5 reprises (dans un contexte bioanalytique : sur échantillon « spiké » ; assimilable ici à la précision) ;
- La limite de détection (LOD ; rapport Signal/Bruit > 3) et la limite de quantification (LOQ ; rapport Signal/Bruit > 5) ont été déterminées pour chacun des témoins.

Les droites d'étalonnage ne sont pas présentées, mais la linéarité est indiquée dans le tableau 22 ($R^2 > 0,999$, sauf composé 3 : $R^2 > 0,988$).

Tableau 22 : Paramètres du dosage

N°	Tr (min)	m/z théorique	M (g/mol)	λ (nm)	Gamme (μM)	R ²	LOD	LOQ	Justesse*	Répétabilité (%)**	Reproductibilité (%)**
3	10,6	369,1819	369,1817	280	10 à 500	0,9884	5 μM	10 μM	1,02	2,04	1,12
4	10,7	353,1861	353,1869	280	10 à 200	0,9991	5 μM	10 μM	1,05	3,58	1,42
5	11,4	339,1696	339,1692	254	10 à 800	0,9999	5 μM	10 μM	1,09	0,80	6,09
14	13,6	335,1386	335,1386	254	0,5 à 200	0,9991	0,1 μM	0,5 μM	1,04	2,83	1,74
17	14,6	349,1547	349,1605	254	1 à 200	0,9999	0,5 μM	1 μM	1,01	1,14	0,80

*Justesse (et précision) : concentration calculée /concentration mesurée ; à 50 μM (milieu de gamme), 5 injections d'un échantillon de témoin nouvellement préparé ; résultats comparables sur 2 autres points de gamme ; l'EMA recommande 4 concentrations ; erreur < 15 % selon l'EMA.

** écart-type < 15 % selon l'EMA.

Pour les extraits aqueux bruts à doser, des phénomènes de coélution sont mis en évidence par la forme des pics chromatographiques et les analyses par spectrométrie de masse précédentes. Pour l'intégration des pics d'intérêt dans les extraits, nous avons privilégié la longueur d'onde la plus adaptée en termes d'absorbance et de définition de la base des pics ($\lambda = 254$ ou 280 nm). Les intégrations des pics ont été réalisées sur des intervalles de temps définis par rapport aux chromatogrammes d'ions extraits (EIC) obtenus par ailleurs, conservés pour toutes les mesures, après correction de la ligne de base. La contribution aux absorbances mesurées des composés co-élus appelle à la prudence dans l'interprétation des résultats.

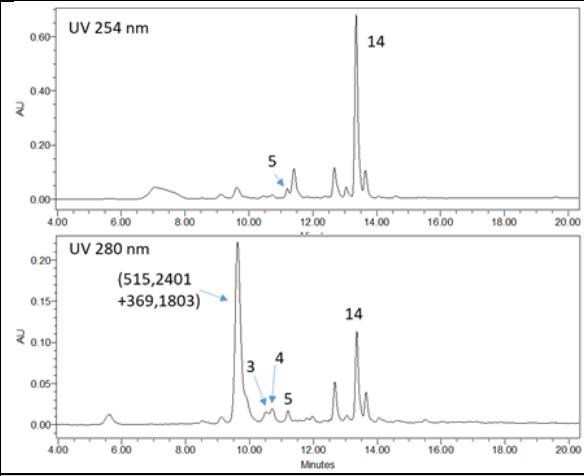
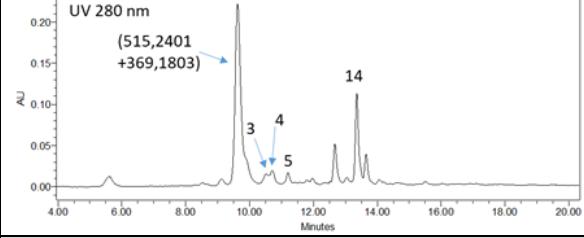
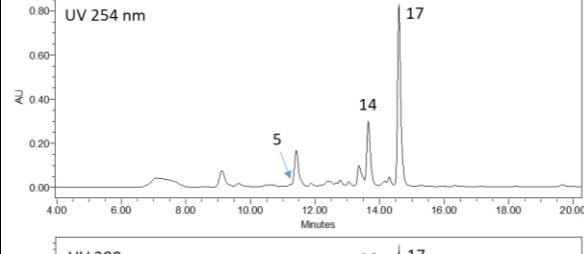
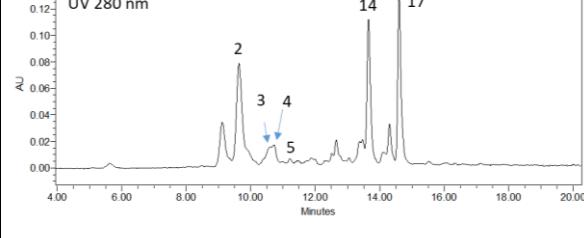
4.2.6.3. Résultats du dosage

Les échantillons à doser, initialement injectés à 10 mg/mL (10 μ L injectés), ont parfois dû être dilués.

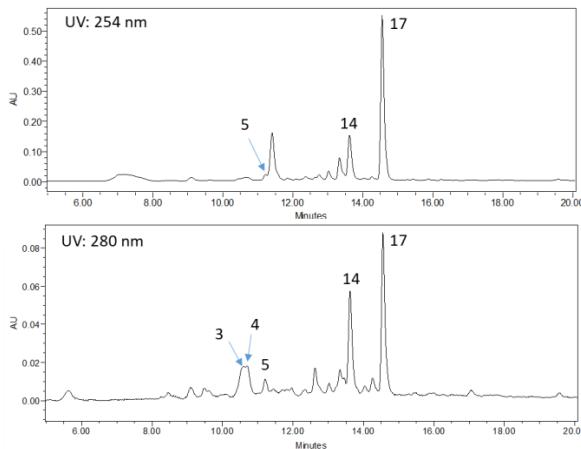
Les résultats sont présentés dans le Tableau 23, en regard des chromatogrammes correspondant. Un résumé des valeurs obtenues est présenté dans le tableau 24.

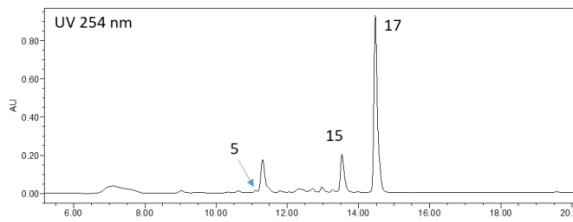
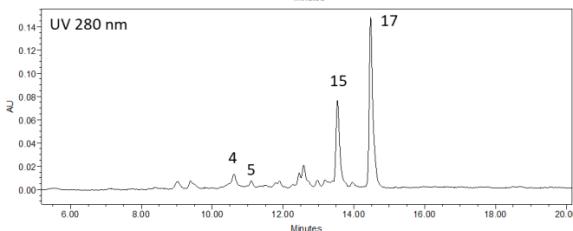
Tableau 23 : Dosage d'alcaloïdes majoritaires dans des extraits traditionnels et par macération de la pulpe de *P. nitida*

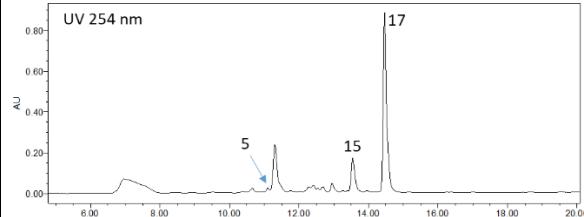
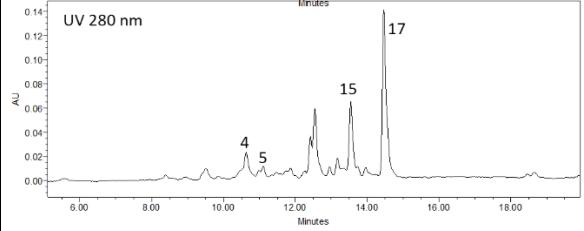
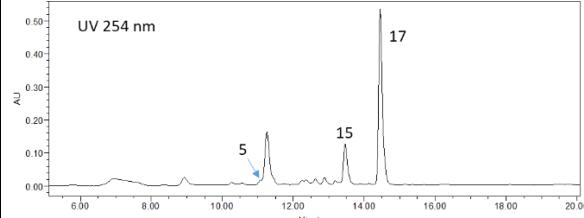
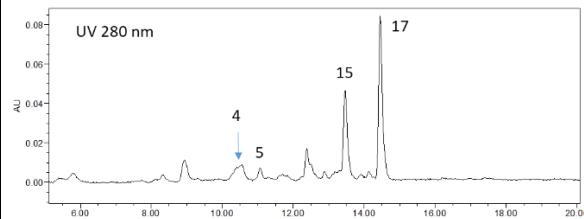
Extrait	Pic	Tr (min)	m/z th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
L1-1T							
	4	10,64	353,1863	280	5	0,01	0,13
	5	11,47	339,1679	254	1,25	0,02	0,25
	14	13,36	335,1380	254	5	0,02	0,18
					Somme :	0,05	0,56

L1-2T	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dil. (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	3	10,51	369,1819	280	1,25	0,07	0,74
	4	10,71	353,1867	280	10	0,02	0,18
	5	11,41	339,1692	254	5	0,04	0,43
	14	13,35	335,1390	254	5	0,05	0,53
					Somme :	0,18	1,88
L1-3T	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	3	10,60	369,1817	280	1,25	0,17	1,85
	4	10,71	353,1869	280	10	0,01	0,16
	5	11,41	339,1692	254	5	0,02	0,24
	14	13,65	335,1386	254	10	0,02	0,20
	17	14,60	349,1605	254	2,5	0,07	0,81
					Somme :	0,29	3,26

L1-4T	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	3	10,61	369,1795	280	1,25	0,10	1,07
	4	10,69	353,1858	280	10	0,01	0,07
	5	11,41	339,1694	254	5	0,01	0,21
	14	13,62	335,1274	254	10	0,01	0,06
	17	14,55	349,1555	254	5	0,03	0,30
					Somme :	0,16	1,71



L6AT	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	4	10,61	353,1857	280	10	0,02	0,27
	5	11,30	339 ,1704	254	5	0,04	0,43
	17	14,47	349,1540	254	1,25	0,04	0,40
 					Somme :	0,1	1,1

L6BT	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraîche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	4	10,63	353,1861	280	5	0,02	0,22
	5	11,30	339,1679	254	5	0,06	0,63
	17	14,46	349,1541	254	2,5	0,09	1,01
					somme	0,17	1,86
L7AT	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraîche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	4	10,54	353,1861	280	10	0,01	0,13
	5	11,26	339,1696	254	5	0,05	0,58
	17	14,45	349,1541	254	2,5	0,16	1,73
					somme	0,22	2,44

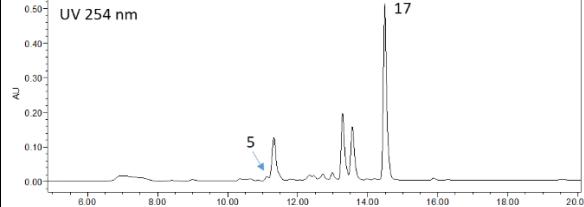
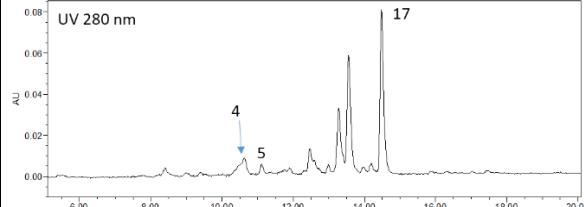
L8AT	Pic	Tr (min)	<i>m/z</i> th. [M+H] ⁺	UV (nm)	Dilution échantillon (mg/mL)	teneur pulpe fraiche (% m/m)	teneur pulpe sèche (% m/m)
	4	10,62	353,1861	280	10	0,02	0,22
	5	11,31	339,1696	254	5	0,03	0,34
	17	14,48	349,1547	254	5	0,05	0,56
					somme	0,1	1,12

Tableau 24 : Dosage d'alcaloïdes majoritaires dans des extraits traditionnels et par macération de la pulpe de *P. nitida* : analyse pour l'ensemble des lots

N°	<i>m/z</i> th.	Teneur dans la pulpe fraîche (% m/m)			
		moyenne	écart-type	min	max
3	369,1817	0,11	0,05	0,06	0,16
4	353,1869	0,02	0,005	0,01	0,02
5	339,1692	0,03	0,02	0,01	0,05
14	335,1386	0,02	0,01	0,01	0,03
17	349,1605	0,07	0,02	0,05	0,09
somme		0,25	0,11	0,14	0,35

Le dosage des alcaloïdes majoritaires présents dans la pulpe a permis d'évaluer la quantité approximative d'alcaloïdes totaux réellement consommée lors de la prise de la préparation traditionnelle. Néanmoins, la faible résolution chromatographique entre certains produits a rendu difficile la détermination de certaines aires, notamment entre les produits **3** et **4**, ou **5** et **8**.

Ce dosage met en évidence des teneurs en alcaloïdes dans la pulpe inférieures aux données obtenues par gravimétrie : la teneur globale en les 3 à 5 alcaloïdes dosés ici est en moyenne 2 fois supérieure à l'estimation gravimétrique de la teneur en alcaloïdes totaux. Les teneurs relatives des extraits entre eux sont similaires pour les 2 méthodes de dosage.

Les quantités d'alcaloïdes ingérées par les patients employant des préparations traditionnelles sont en moyenne de 750 mg par prise (+/- 330 mg / prise), soit 1500 ± 990 mg/ jour. Au regard de la puissante activité pharmacologique en série indolomonoterpénique, ce résultat est surprenant. La forte variabilité de teneur constatée ici révèle une forte incertitude relative à cette quantité d'alcaloïdes réellement consommée, et dès lors à l'efficacité et de la sécurité de la préparation traditionnelle.

L'ensemble de ces résultats montre l'existence d'une variabilité chimique des extraits de *Picralima nitida*, pour laquelle aucune corrélation claire avec la date de récolte, le degré de maturité ou le lieu de provenance ne se dégage. Celle-ci peut être responsable d'une variabilité de l'activité biologique, et peut compromettre des tentatives de standardisation de MTA ou l'émission de recommandations d'emploi.

5. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des fruits de *Picralima nitida*

5.1. Activité antiplasmodiale *in vitro*

La majorité des extraits aqueux ($n = 30$; traditionnels, macérats, décoctions) a pu faire l'objet d'une évaluation d'activité antiplasmodiale sur la souche Fcb1, dans le modèle du MNHN déjà employé pour l'évaluation des recettes au chapitre précédent. Les extraits alcaloïdiques totaux tirés de ces extraits aqueux ont parfois été testés. Les données sont présentées dans la table 25 suivante (extraits et alcaloïdes totaux : % d'inhibition à 100 µg/mL et le cas échéant Cl_{50} en µg/mL) ainsi que sous forme graphique, afin d'en faciliter la lecture (figures 39, 40). Les témoins employés sont les mêmes que dans le chapitre précédent.

Les extraits nommés ici « APF » correspondent aux extraits « AF » de la partie 4.2.

*Tableau 25 : Activité antiplasmodiale des extraits aqueux et alcaloïdiques de *P. nitida* in vitro (inhibition de croissance, *P. falciparum* Fcb1)*

Extraits totaux	% inhibition		Alcaloïdes totaux	% inhibition		Cl_{50} (µg/mL)	
	10 µg/mL	100 µg/mL		10 µg/mL	100 µg/mL	moy.	écart-type
L1-2T	3	43	L1-2T ALC	20	97	12	2,8
L1-3T	1	28	L1-3T ALC	17	95	16,5	4,9
L1-4T	10	16	L1-4T ALC	13	99	13,5	0,7
L1APC	0	22	-	nd	nd	nd	nd
L1APF	0	20	L1A ALC	25	96	nd	nd
L1BPC	0	34	-	nd	nd	nd	nd
L1BPF	0	23	L1B ALC	43	91	3	1,4
L2APC	0	21	L2APC ALC	48	98	10	0,0
L2APF	0	8	L2APF ALC	38	99	11,5	0,7
L2BPC	0	28	L2BPC ALC	57	95	6	0,0
L2BPF	0	18	L2BPF ALC	46	96	7,5	2,1
L3APC	0	20	L3APC ALC	33	98	8	1,4
L3APF	0	15	L3APF ALC	36	99	10	2,8
L3BPC	0	46	L3BPC ALC	88	96	2	1,4
L3BPF	0	23	L3BPF ALC	48	99	8	2,8
L3CPC	0	22	L3CPC ALC	40	89	4	0,0
L3CPF	0	18	L3CPF ALC	34	98	7,5	0,7
L4APC	0	12	L4APC ALC	47	99	8	1,4
L4APF	nd	nd	L4APF ALC	40	99	8,5	0,7
L4BPC	0	45	L4BPC ALC	nd	nd	0,55	0,1
L4BPF	0	22	L4BPF ALC	46	99	4,5	0,7
L4CPC	0	22	L4CPC ALC	37	95	5	1,4
L4CPF	0	21	L4CPF ALC	67	98	5	1,4
L5APC	28	31	L5APC ALC	38	99	10	1,4
L5APF	0	13	L5APF ALC	55	99	5	0,0
L5BPC	0	21	L5BPC ALC	40	97	10,5	0,7

Extraits totaux	% inhibition		Alcaloïdes totaux	% inhibition		Cl ₅₀ (µg/mL)	
	10 µg/mL	100 µg/mL		10 µg/mL	100 µg/mL	moy.	écart-type
L5BPF	0	50	L5BPF ALC	39	98	6,5	0,7
L5CPC	0	26	L5CPC ALC	nd	nd	10	0,0
L5CPF	0	11	L5CPF ALC	51	98	6	4,2
L6T	nd	nd	L6T ALC	nd	nd	2	0,0
L6APC	nd	nd	L6APC ALC	nd	nd	nd	nd
L6APF	nd	nd	L6APF ALC	nd	nd	8,5	2,1
L6BPC	nd	nd	L6BPC ALC	nd	nd	6	0,0
L7T	nd	nd	L7T ALC	nd	nd	nd	nd
L7APF	nd	nd	L7APF ALC	nd	nd	1,35	0,9
L8T	nd	nd	L8T ALC	nd	nd	6	0,0
L8APF	nd	nd	L8APF ALC	nd	nd	11,5	2,1
L9ECF (péridécarpe, à froid)	nd	nd	L9ECF ALC	nd	nd	25	0,0
<i>moyenne (%)</i>	1,2	23,7	<i>moyenne (%) ou *µg/mL</i>	45,3	97,0	7,2*	
<i>écart-type</i>	0,0	16,6	<i>écart-type</i>	6,7	0,6	1,0*	

Les extraits présentent une inhibition de 23,7±16,6 % de la croissance des parasites à 100 µg/mL, et sont généralement inactifs à 10 µg/mL. Pour les extraits alcaloïdiques, l'inhibition est de l'ordre de 100 % à 100 µg/mL, de 45,3±6,7 % à 10 µg/mL et la Cl₅₀ moyenne est de 7,2±1 µg/mL.

On rappellera que, d'une part, un extrait de graines avait montré une activité antiplasmodiale *in vivo* dans un modèle similaire (Okokon, 2007) et que d'autre part, un extrait de fruit n'avait pas montré de toxicité importante par voie orale chez la Souris (Nnamdi, 2015). A notre connaissance, notre étude est la première réalisée *in vivo* sur le péridécarpe et la pulpe du fruit. Ces résultats particulièrement encourageants nous incitent à la poursuite de ces travaux, en utilisant notamment l'extrait de pulpe à plus forte dose.

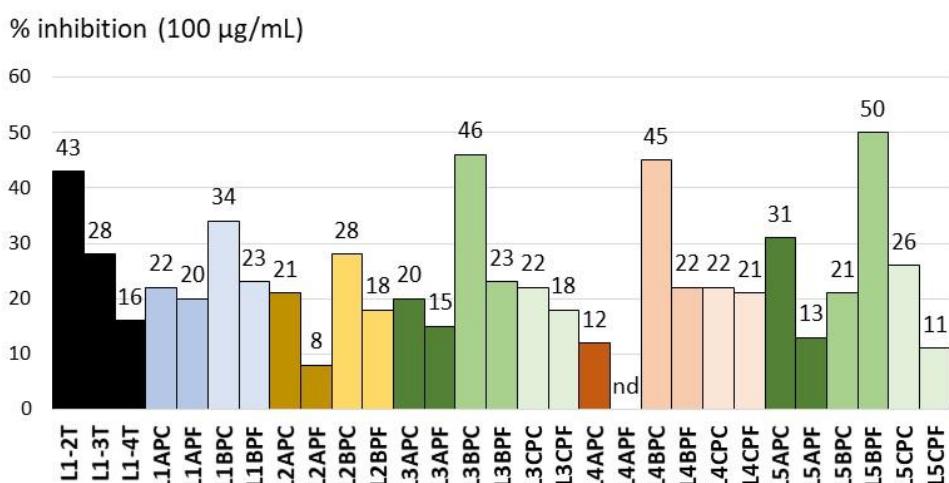


Figure 52 : Activité antiplasmodiale des extraits aqueux de *P. nitida* *in vitro* (% d'inhibition de croissance, *P. falciparum* Fcb1)

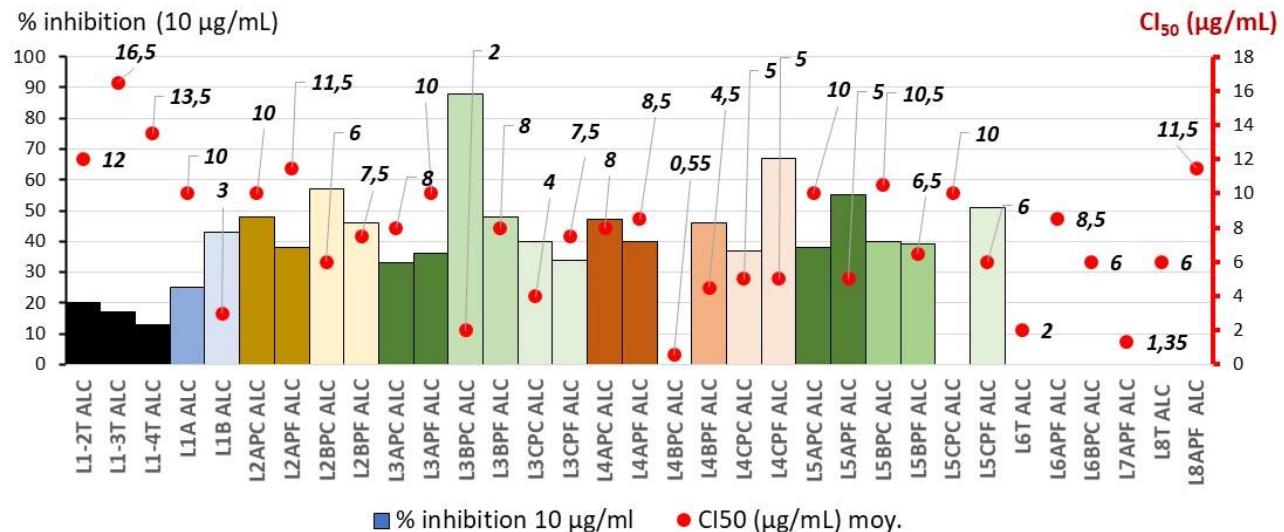


Figure 53 : Activité antiplasmodiale des extraits alcaloïdiques de *P. nitida* in vitro (% d'inhibition de croissance à 10 µg/mL et Cl₅₀ (µg/mL), en rouge, *P. falciparum* Fcb1)

On n'observe pas de corrélation modélisable entre teneur estimée en alcaloïdes totaux des extraits aqueux et activité de ces derniers, même après correction par l'activité par les valeurs d'inhibition (à 10 µg /mL ou la Cl₅₀ des extraits alcaloïdiques correspondant).

Les alcaloïdes isolés (voir partie « Dosage », voir Matériel et méthodes – chapitre 3, partie 10) ont également été testés dans le même modèle. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (les identités sont hypothétiques à ce stade, et proposées sur la base de l'analyse par la méthode des réseaux moléculaires et les premiers spectres RMN obtenus, qui n'infirment pas ces hypothèses).

Tableau 26 : Activités antiplasmodiales in vitro des alcaloïdes isolés à partir de *P. nitida* (% d'inhibition de croissance, *P. falciparum* Fcb1)

Composés	Identité	m/z théorique [M+H] ⁺	Cl ₅₀ moyenne (µM)	écart-type (µM)
4	ajmalicine (=raubasine) ?	353,1844	10,5	0,7
5	dérivé déméthylé de raubasine	339,1697	8,5	3,5
7	-	341,1928	nd	
8	corynanthéidal ?	297,1888	7,5	2,1
11	<i>non encore déterminé</i>	293,1657	9	5,7
12	<i>non encore déterminé</i>	295,1725	10,5	6,4
14	déméthyl-serpentine ?	335,1372	23,5	0,7
17	epi-serpentine ?	349,1542	23	8,5
chloroquine (nM)			38,4 nM	7,7 nM

Les données obtenues sont en accord avec celles déjà publiées. Les produits les plus abondants ne sont pas les plus actifs. La corrélation entre la teneur relative de ces différents composés et les activités des totums alcaloïdiques semble difficile à établir.

L'activité des extraits ne semble pas être imputable à une molécule en particulier. Une éventuelle synergie d'action entre les molécules pourrait être étudiée afin d'expliquer l'activité élevée de certains extraits alcaloïdiques totaux dont les molécules constitutives testées séparément ont une activité modérée.

5.2. Activités antiplasmodiales *in vivo*

En complément de ces données *in vitro*, nous avons réalisé un essai *in vivo* pilote chez la Souris infectée par *Plasmodium berghei* (chloroquine-sensible), en administrant par voie orale des extraits de *P. nitida* (après lyophilisation et dilution dans l'eau distillée à concentration adéquate). Ces extraits étaient :

- l'extrait par macération à froid du lot L9 (L9AF) à 2 mg/kg/j ;
- la décoction du péricarpe de ce même lot (L9EC) à 2 et 10 mg/kg/jour ;

en comparaison avec l'artéméthérine (12 mg/kg/jour), la chloroquine (10 mg/kg/jour) et une solution saline comme témoin négatif. Chaque groupe était constitué de 8 animaux. La parasitémie a été mesurée quotidiennement, par comptage de 1000 hématies, à 6 jours. La dose de 2 mg/kg/jour a été choisie au regard de la quantité d'extrait traditionnel théoriquement ingérée par un malade.

Le travail présenté dans cette partie a été réalisé avec le Dr. Landry Kouakou, du laboratoire de pharmacologie de la faculté de pharmacie de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan), en collaboration avec le Dr. Karim Tuo de l'Institut Pasteur d'Abidjan.

Les extraits à la dose de 2 mg/kg/jour ont montré une tendance à la diminution de la parasitémie à J6, cependant non significative par rapport au témoin négatif, et avec une différence significative par rapport aux molécules de référence (qui suppriment la parasitémie). En revanche, l'extrait de péricarpe à 10 mg/kg/jour a entraîné une diminution nette de la parasitémie, statistiquement significative par rapport au témoin négatif, et sans différence significative par rapport aux molécules de référence à J6. Aucun signe de toxicité n'a été observé.

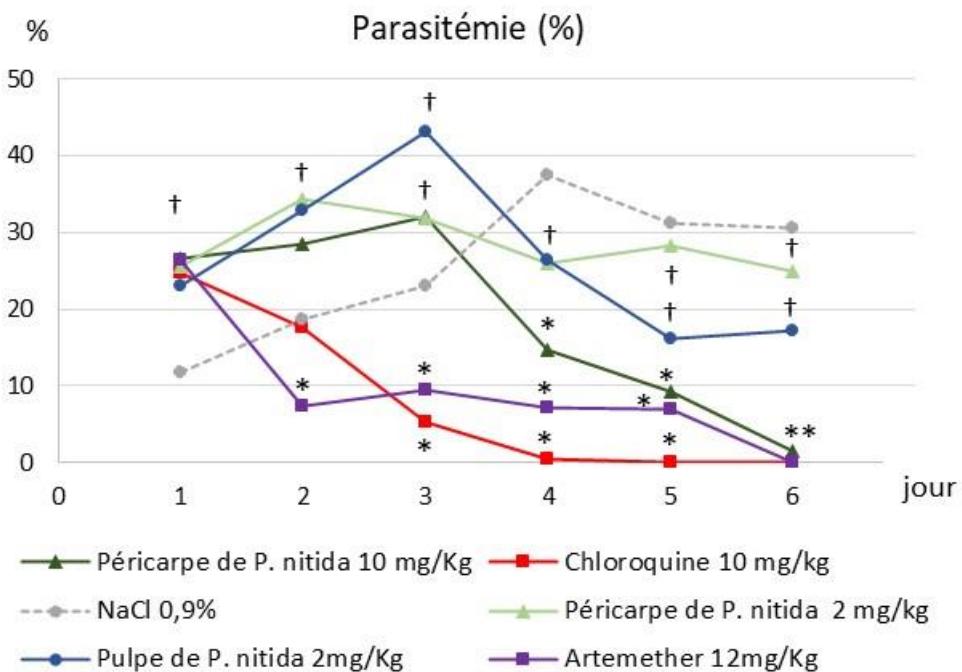


Figure 54 : Evaluation pilote in vivo d'extraits de pulpe et de péricarpe de P. nitida chez la Souris infectée par P. berghei.

P. nitida : lot n°9 ; Pulpe : extrait par macération à froid (extrait L9AF) ; péricarpe : décocté (extrait L9EC) ; * p < 0,05 et ** p < 0,01, par rapport au témoin négatif ; † p < 0,05 par rapport à la chloroquine et à l'artéméthér (analyse statistique : ANOVA ; comparaison multiple de Dunnett) ; n = 8 animaux par groupe.

Tableau 27 : Evaluation pilote in vivo d'extraits de pulpe et de péricarpe de P. nitida chez la Souris infectée par P. berghei : parasitémie (%)

Jour	Molécules de référence		Extraits (codes) de <i>P. nitida</i>			NaCl 0,9 %
	Chloroquine 10 mg/kg	Artemether 12 mg/kg	Pulpe (L9-AF) 2 mg/kg	Péricarpe (L9-EC) 2 mg/kg	Péricarpe (L9-EC) 10 mg/kg	
J1	24,8 %	26,4 %	23,0 %	25,5 %	26,6 %	11,6 %
J2	17,5 %	7,3 %	33,0 %	34,3 %	28,4 %	18,6 %
J3	5,2 %	9,4 %	43,2 %	31,9 %	32,0 %	23,0 %
J4	0,4 %	7,1 %	26,4 %	26,0 %	14,7 %	37,4 %
J5	0 %	0 %	16,2 %	28,3 %	9,2 %	31,3 %
J6	0 %	0 %	17,2 %	25,0 %	1,4 %	30,6 %

6. Etude de *Picralima nitida* : Conclusions et perspectives

Bien connue en médecine traditionnelle d'Afrique occidentale, *Picralima nitida* est souvent décrite pour son utilisation dans la prise en charge du diabète. L'espèce est également citée, comme de nombreuses autres Apocynaceae, en thérapeutique antipaludique. Les écorces de tiges ou de tronc, les racines et les graines sont les organes les plus utilisés. Des travaux nombreux ont ainsi déjà été menés sur les écorces, les racines, les graines et le péricarpe de fruits, rapportant des informations sur la composition chimique et les activités antiparasitaires de ces organes. Concernant la pulpe du fruit, elle n'a été que très peu étudiée tant au plan chimique que pharmacologique.

L'investigation du fruit que nous avons entreprise dans ce travail, a porté sur la pulpe principalement, comparée ensuite aux autres parties du fruit (graines et péricarpe). Quatorze lots recueillis à des périodes et de provenances différentes ont été étudiés afin de comparer leurs profils chimiques. Certains ont été divisés en sous-lots en fonction du degré de maturité des fruits les composant. Ce sont systématiquement les extraits employés en thérapeutique traditionnelle qui ont été étudiés.

Pour rappel, la démarche a été :

- la déréplication CLHP-UV-HRMS/MS d'un extrait traditionnel de pulpe (macération) avec exploitation de la méthode des réseaux moléculaires et emploi de la MIADB du Dr. M. Beniddir, dans un but d'identification préliminaire des alcaloïdes présents ;
- la comparaison macérâts / décoctés, en fonction du degré de maturité, en CLHP-UV-HRMS/MS et par une analyse métabolomique de type PCA ;
- la comparaison en UHPLC-UV-HRMS/MS de décoctés de pulpe, de péricarpes de graines avec analyse métabolomique.

Le nombre d'extraits étudié à chacune de ces étapes est indiqué en introduction de la partie 4 de ce chapitre.

La suite a été :

- l'estimation de la teneur en alcaloïdes totaux (gravimétrie après purification) de préparations traditionnelles (30 extraits de type macérâts ou décoctés) ;
- le dosage de 5 alcaloïdes dans 8 extraits traditionnels obtenus par macération, avec validation analytique du dosage.

Cette étape a nécessité l'obtention de témoins à partir de la plante. Les travaux de fractionnement et de purification de la pulpe, mais aussi des graines de *P. nitida* sont décrits dans la partie matériel et méthodes (5 produits partiellement caractérisés, dont la structure plane reste à confirmer et dont stéréochimie reste à établir ; 18 alcaloïdes à identifier, dont certains à repurifier).

Une étude biologique a ensuite été menée, avec l'évaluation :

- de l'activité antiplasmodiale *in vitro* sur la souche Fcb1 de *Plasmodium falciparum* (37 extraits aqueux, 33 extraits alcaloïdiques totaux, quelques alcaloïdes isolés) ;
- de l'activité antiplasmodiale *in vivo* (*P. berghei*, Souris) d'un extrait traditionnel de pulpe et d'un décocté de péricarpe.

L'analyse chromatographique et métabolomique a permis de mettre en évidence une relative homogénéité en termes d'identité des alcaloïdes indolomonoterpéniques majoritaires présents dans la pulpe : ce sont la burnamine (3), un dérivé de type *nor*-serpentine (14), des épimères de serpentine (16, 17) et un composé restant à identifier (5) mais que nous avons pu purifier et qui correspondrait à

un dérivé déméthylé de raubasine. La raubasine (ajmalicine, **4**), le corynanthéidal (**8**), l'akuammicine (**10**), la picraline (**15**), l'akuammigine (**18**) sont également présentes. Ces derniers produits, décrits dans les graines et/ou dans le péricarpe, sont connus pour avoir un potentiel antiplasmodial.

L'analyse de variabilité a permis de mettre en évidence les molécules responsables des différences entre lots de pulpe : le potentiel de variation est assez important, avec des composés tour à tour majoritaires ou minoritaires (**14**, **17...**) mais nous n'avons pas réussi à le corrélérer avec des différences d'activité biologique.

D'autre part, la comparaison de profils alcaloïdiques par approche métabolomique montre :

- que le degré de maturité du fruit n'a qu'une moindre influence sur le profil alcaloïdique ;
- que les péricarpes et les pulpes ont des compositions sensiblement similaires, avec une assez forte variabilité inter-lots ;
- que les graines ont une composition sensiblement différente des autres parties, celle-ci étant globalement homogène.

Une estimation gravimétrique de la quantité d'alcaloïdes dans les extraits traditionnels de pulpes et le dosage de cinq des alcaloïdes majoritaires dans des macérats de pulpe ont permis d'évaluer la quantité d'alcaloïdes totaux consommée par le malade. Ce travail indique que des doses très importantes d'alcaloïdes sont ingérées : elles sont de l'ordre à 1 g par jour. Ces doses sont variables, et dépendent manifestement de la teneur intrinsèque des fruits en alcaloïdes, mais aussi de la taille de ces fruits. Ce résultat pose question quant à la sécurité d'emploi de cette drogue végétale, les alcaloïdes indolomonoterpéniques présentant des activités pharmacologiques marquées. Toutefois, les travaux de Koffi NG *et al.* ont rapporté que les extraits de graines, consommés traditionnellement à la dose de 6,6 g par jour, n'ont montré aucune toxicité aigue chez la souris. Notre étude a rapporté une dose similaire consommée en extrait de pulpe (6,8 g par jour). L'analyse chromatographique et métabolomique a montré une composition en alcaloïdes plus complexe dans la graine que dans la pulpe. Cela laisse penser que la dose d'extrait de pulpe administrée pourrait ne pas être toxique chez l'homme. Toutefois des études de toxicité sont nécessaires pour s'assurer de l'innocuité de l'extrait.

Les différents extraits obtenus ont montré une activité antiplasmodiale *in vitro* modérée à importante, bien attribuable aux alcaloïdes. Un décocté de pulpe a donné des résultats encourageants par voie orale, dans un modèle murin d'infection plasmodiale : une diminution de la parasitémie à J6 est observée. Elle n'est pas significative par rapport au témoin négatif, mais l'extrait n'a à ce stade été testé qu'à la dose faible de 2 mg/kg/jour. En revanche, on observe une diminution nette de la parasitémie avec l'extrait de péricarpe à 10 mg/kg/jour, statistiquement significative par rapport au témoin négatif, non différente significativement des molécules de référence employées à doses usuelles. Hors, l'analyse chromatographique et métabolomique montre des compositions proches pour les extraits de pulpe et de péricarpe.

L'étude du fruit de *Picralima nitida* a donc permis de caractériser – au moins partiellement – cette drogue végétale exploitée dans la prise en charge du paludisme, pathologie pour laquelle elle a manifestement un potentiel. Le caractère renouvelable de cette drogue végétale et son obtention facile pourraient en faire un bon candidat pour le développement d'un MTA.

Beaucoup des travaux entrepris ici restent malheureusement encore à finaliser.

En perspectives, on peut proposer :

- la reprise des analyses des décoctés par la méthode des réseaux moléculaires avec une amélioration de la déréplication, seulement partielle ici ;
 - l'incorporation des données biologiques dans les réseaux moléculaires (étiquetage des nœuds en fonction de l'activité mesurée) afin de visualiser plus facilement les contributions respectives des molécules dans l'activité des totums ;
 - l'incorporation des données biologiques dans l'analyse métabolomique afin d'identifier les composés responsables de l'activité ou de différences d'activité ;
 - la confirmation de l'identité des composés **3, 5, 14, 16, 17** ainsi que l'élucidation de la structure des autres composés isolés, **a à m** (en cours) ; l'évaluation biologique de ces derniers composés ;
 - la poursuite de l'étude chimique des extraits de pulpe : l'obtention d'autres lots, de manière systématique, avec récoltes « à la source » régulières, permettrait potentiellement de comprendre les facteurs de variation du contenu en alcaloïdes ;
 - la poursuite de l'évaluation *in vivo* sur des extraits aqueux de pulpe, à plus forte dose ;
 - une comparaison avec des extraits alcooliques ou hydro-alcooliques, plus faciles à traiter en l'absence de lyophylisateur, si une étude de faisabilité de développement de MTA était jugée opportune par le PNPMT ;
 - la réalisation d'études toxicologiques chez le rongeur (des protocoles en administration aigue, subchronique et chronique sont proposés par l'OCDE) ;
 - un suivi de patients usuellement consommateurs de ce fruit, afin de vérifier l'impact du traitement sur leurs symptômes, leur température corporelle, leur parasitème, et de surveiller la survenue d'effets indésirables.
- développer un MTA antimalarial homologué à base de plantes médicinales avec évaluation scientifique et biologique.

Conclusion générale

En conclusion, et en se fondant sur les conclusions et perspectives des chapitres 2 (p 84) et 3 (p 156), on peut émettre plusieurs remarques, spécifiquement relatives à ce travail ou de portée générale.

Malgré l'avènement des nouvelles combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et la mise en place de stratégies prophylactiques efficaces et d'approches vaccinales, le paludisme demeure un problème de santé publique majeur en Afrique subsaharienne. Le recours aux approches traditionnelles existe, notamment en Côte d'Ivoire.

Le Ministère de la Santé de la Côte d'Ivoire, suivant les recommandations de l'OMS, a entrepris la promotion de la médecine traditionnelle et des produits qui en sont issus, à travers le PNPMT. Celui-ci réalise en effet le recensement des tradipraticiens et de leurs préparations et recettes traditionnelles, maintenant souvent produites de manière générique. Mais demeure la problématique de l'évaluation scientifique de la qualité, de l'efficacité et de l'innocuité de ces produits, historiquement proposés à la vente au public, mais dont l'aspect standardisé et moderne est une nouveauté relative.

Notre étude avait pour but de recenser des plantes et recettes proposées par la tradition pour traiter le paludisme, en observant l'évolution de celle-ci telle que véhiculée sur les marchés aux plantes médicinales (comparaison de relevés de terrain originaux avec ceux publiés). Cette approche ethnobotanique s'est aussi focalisée, en partenariat avec le PNPMT, sur la traduction de la tradition dans une offre commerciale de produits manufacturés. Au regard des dossiers relatifs à l'enregistrement de MTA actuellement appliquées en Côte d'Ivoire, on ne peut que constater la non adhésion des acteurs et leur incapacité à se conformer à des exigences plus propres au secteur industriel pharmaceutique établi qu'à un secteur manufacturier en phase de développement. Notre travail constitue un état des lieux relatif à la présentation de produits de type MTA ainsi qu'une contribution à un enregistrement par les autorités de produits à base de plantes sur une base scientifique.

Le phytochimiste et le pharmacien ont ici des rôles importants à jouer. L'émission de recommandations basiques et adaptées, inspirées de l'OMS, sur la présentation des MTA, sur l'approvisionnement en plantes, sur les bonnes pratiques en matière de *sourcing*, de stockage, de transformation semble essentielle. En termes de contrôle, le recours à des approches simples (telles que le contrôle botanique macroscopique et microscopique ou la CCM) serait à encourager. Les formules commercialisées étant souvent complexes et les approvisionnements en plantes mal définis, il est dommage que la technique des réseaux moléculaires appliquée à des données de CLHP-HRMS/MS, permettant des comparaisons directes de profils de plantes constitutives et de produits finis, n'ait pu être pleinement exploitée (aucun résultat n'est d'ailleurs présenté dans le manuscrit mais cet aspect continuera d'être investigué). L'exploitation des données obtenues par de telles techniques dans le cadre de la mise en place de méthodes de contrôle plus simples nous semble pertinente.

Nous espérons une collaboration efficace entre le Ministère de la Santé à travers le PNPMT, l'AIRP et le Laboratoire national de Santé Publique (LNSP), mais aussi le Ministère de l'Enseignement Supérieur à travers l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, en concertation avec les tradipraticiens, les fournisseurs de plantes, les fabricants de produits.

Notre contribution à l'étude du fruit de *Picralima nitida*, qui a notamment exploité des outils métabolomiques, est originale et a permis de mettre en évidence une relative homogénéité en termes d'identité des alcaloïdes indolomonoterpéniques majoritaires présents dans la pulpe. Les différents extraits obtenus ont montré une activité antiplasmodiale *in vitro* modérée à importante, bien

attribuable aux alcaloïdes et une activité *in vivo* attestée par une diminution de la parasitémie à J6 chez la souris infectée par *P. berghei*. Elle confirme un intérêt potentiel de certaines préparations à base de pulpe, mais pose des questions en termes de recommandations à émettre pour les praticiens et les patients. Les données obtenues doivent être complétées, et posent la question de la variabilité de ce matériel végétal, écueil potentiellement important dans le cadre de la conception de MTA mais aussi de la maîtrise du rapport bénéfice / risque de recours phytothérapeutiques empiriques, la seule référence à la tradition pouvant apparaître insuffisante pour garantir des soins de qualité.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes du Chapitre 2 : Ethnobotanique

1. Enquête au marché d'Adjamé

Quatorze vendeuses proposant des recettes antipaludiques ont été retenues. Après avoir été informées de l'objet de l'enquête et avoir accepté d'y participer, elles ont été interrogées au cours d'entretiens individuels, selon un format semi directif. L'interrogatoire était focalisé sur le traitement du paludisme. Le terme employé était explicitement « paludisme », jugé comme étant assez bien connu par la population générale, sans barrière linguistique. Les recettes proposées ont fait l'objet de questions spécifiques, avec un inventaire des plantes employées comme remède ainsi que les modes de préparation de ces recettes.

Un échantillon de chacune des plantes a été acheté auprès des vendeuses. Le coût de la botte de feuilles de plantes (environ 300 g) était en général de 500 F CFA (7 centimes d'euros).

Les espèces sélectionnées ont été identifiées au Centre National Floristique d'Abidjan par Monsieur Assi Jean, technicien spécialiste des plantes médicinales locales, et déclarées au point focal de conservation de la biodiversité dans le cadre du protocole de Nagoya (Convention sur la Biodiversité, CBD) sur l'accès et le partage des avantages (Conférence des parties à la convention sur la diversité biologique - Accords de Nagoya, 2010).

2. Collecte et identification des plantes

Les échantillons végétaux ont été récoltés à l'état sauvage en milieu forestier à Adiopodoumé, en bordure du CNRA (Centre National de Recherche Agronomique), en octobre 2018.

3. Collecte et identification des plantes

Les échantillons d'herbier sont conservés au laboratoire de pharmacognosie de l'UFR sciences pharmaceutiques et biologiques (SPB). Les numéros d'herbier sont les suivants : Noms d'espèce, date. Les plantes sont mentionnées en annexe 7.

L'identification a été effectuée comme précédemment au Centre National de Floristique.

4. Traitement du matériel végétal

Le matériel végétal (voir annexe 8) a été séché à température ambiante dans une atmosphère ventilée. Les extraits de plantes pour analyse par CLHP – MS/MS et évaluation d'activité antipaludique *in vitro* (analyses non finalisées, pas montrées dans ce manuscrit) ont été réalisées par extraction H₂O, EtOH/H₂O 1 : 1 ; EtOH (ratio plante / solvant 1 : 1).

5. Réalisation des extraits de recettes, produits

Les recettes et produits traditionnels ont fait l'objet d'un traitement permettant d'obtenir des extraits. En effet les formes liquides ont subi une évaporation à siccité sous pression réduite, pendant que les formes « poudres » ont fait l'objet d'extraction au MeOH et EtOH /H₂O 1 : 1. Après filtration, les extraits obtenus étaient évaporés jusqu'à siccité sous pression réduite.

Matériel et méthodes du Chapitre 3 : Etude du fruit de *Picralima nitida*

1. Matériel

Les données de masse exacte HRESIMS ont été enregistrées sur un spectromètre de masse Agilent 6530 Accurate-Mass QTOF® en mode ion positif. Des cartouches de silice Grace® de 330 g, 120 g et 12g ont été utilisées pour les chromatographies flash avec un appareil de chromatographie en phase liquide Armen®. Une colonne préparative C₁₈ Sunfire® L (50*210 mm ; 5µm) a été utilisée pour les séparations par HPLC préparative.

Le dosage en CLHP-UV a été réalisé sur une chaîne CLHP « Waters 1525 binary pump » équipée d'un injecteur « Waters 717 plus Autosampler », d'un détecteur à barette de diode (190-600 nm) « Waters 2996 », d'une colonne C₁₈ Sunfire® Waters analytique (5 µm, 4,6 mm x 150 mm) et du logiciel Empower pro®.

Les purifications par CLHP préparative a été réalisée sur une chaîne CLHP « Water Delta Prep » équipée d'un détecteur à barrette de diodes (190-600 nm) « Waters 2996 », d'une colonne C18 Sunfire® Waters analytique (5 µm, 4,6 mm x 150 mm) et du logiciel Empower Pro®.

Les spectres ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un appareil Bruker AM-300 (300 MHz) en utilisant le MeOD et le CDCl₃ comme solvants. Les signaux des solvants ont été utilisés comme références. Les multiplicités sont décrites par les abréviations suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, bs = broad singlet, singulet large.

2. Matériel végétal, lots de fruits

Le matériel végétal était constitué de fruits de *Picralima nitida* (Stapf) Th. et H. Durand (Apocynaceae) provenant de Côte d'Ivoire. La partie du fruit utilisée pour l'obtention de la recette traditionnelle était la pulpe. Les autres parties du fruit et de l'arbre (écorce de tronc, feuilles et racines) ont été utilisées pour mettre en évidence la variabilité de la composition chimique en fonction de l'organe.

Les fruits ont été recueillis sur plusieurs marchés de plantes médicinales d'Abidjan entre 2016 et 2019. Il s'agissait du marché de Cocody Palmeraie, marché de Yopougon Siporex, marché d'Adjamé, marché de Yopougon Selmer, marché de Treichville. Selons les marchandes, leurs provenances étaient trois villes, Alépé, Agboville et Bonoua, toutes peu éloignées de la capitale économique : Abidjan. Un échantillon a été obtenu au centre de floristique IBAAN (Institut Botanique Ake-Assi Laurent d'Andokoi). Les échantillons (fruits frais) n'ont pas été déposés en herbier. Des échantillons de graines ont été conservés au laboratoire, avec les références : AA_PN_codes des lots correspondants.

L'écorce de tige, les feuilles et les racines ont été recueillies dans la forêt d'Adiopodoumé en Janvier 2019 par un botaniste, Mr Téhé Emile. Ils ont été lavés et séchés. Les échantillons d'herbier sont conservés à Abidjan, en interne au laboratoire (n° AA_PN_EC_2019 / AA_PN_F_2019 / AA_PN_R_2019).

Pertes à la dessication

Les pertes à la dessication ont été déterminées sur des aliquots d'environ 1 g, à l'étuve à 100°C (jusqu'à obtention d'une masse constante).

Tableau 28 : Pertes à la dessiccation moyennes des différentes parties du fruit utilisées

Fruits mûrs/non mûrs	Partie du fruit	Perte à la dessiccation (moyenne) (%)
Fruits mûrs (A)	Pulpe	90,88
	Graines	41,39
	Ecorce	69,44
Fruits non mûrs (B)	Pulpe	89,03
	Graines	62,69
	Ecorce	79,17
Fruits moyennement mûrs (C)	Pulpe	90,49
	Graines	29,16
	Ecorce	59,0

3. Extractions

Préparation traditionnelle

Le fruit est coupé en 2, vidé de ses graines, rempli avec de l'eau distillée (60 -100 mL selon la taille du fruit, pour un ratio m/v d'environ 2,4 par rapport à la masse de la pulpe à l'état frais et du péricarpe), qui est laissée à macérer jusqu'au lendemain (env. 24 h). L'eau est récupérée, l'extrait est filtré sur papier filtre et l'extrait est évaporé à siccité par lyophilisation ou éventuellement entraînement azéotropique avec EtOH sous pression réduite.

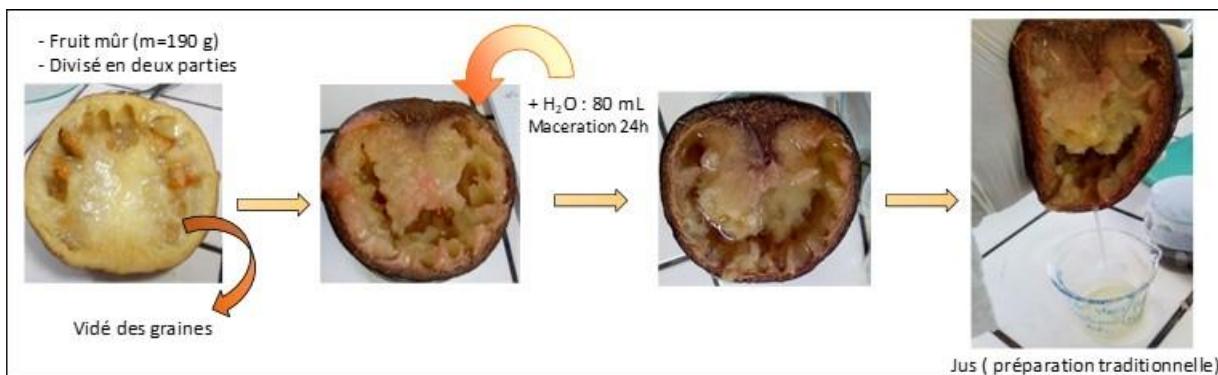


Figure 55 : Mode de préparation de l'extrait traditionnel de pulpe de P. nitida

Préparation des macérats aqueux

La pulpe est séparée de l'épicarpe et des graines, conservée au congélateur. Chaque échantillon encore congelé est broyé dans un mortier. La pulpe pilée a été divisée en deux parties égales, le cas échéant (pour réalisation de 2 extraits distincts). La macération aqueuse est réalisée à température ambiante, jusqu'au lendemain (24 h), sous agitation, avec 2 mL d'eau par mg de pulpe fraîche.

Préparation des décoctés

Les parties extraites par décoction aqueuse étaient la pulpe du fruit, son épicarpe (parfois désigné « écorce du fruit » dans ce document), et les graines. Les péricarpes et les graines ont été séchés sur la paillasse à température du laboratoire (sous climatisation à 24 °C). Les drogues végétales sont broyées (pulpe : à l'état frais, voir plus haut).

La drogue végétale est portée à ébullition pendant 1 heure, avec 2 mL d'eau par mg de pulpe fraîche ou de mg de péricarpe ou de graines.

Les extraits ont été réduits à siccité après filtration sur papier filtre, par lyophilisation ou le cas échéant par évaporation sous flux d'azote ou sous pression réduite à 60 °C par entraînement azéotropique.

Les rendements d'extraction sont présentés ci-dessous.

Tableau 29 : Rendements d'extraction : pulpes du fruit de P. nitida

N° de lot	Code extract**	Mode d'extraction	Masse mat. 1 ^{re} végétale (g)*	Masse extrait (g)	Rendement (%)
Bilan des extractions de la pulpe de fruits mûrs par la méthode traditionnelle **					
L1-1	L1-1T	traditionnel	450	10,08	2,24
L1-2	L1-2T	traditionnel	638	7,0514	1,1
L1-3	L1-3T	traditionnel	650	4,15	0,638
L1-4	L1-4T	traditionnel	780	13	1,66
L5	L5AT	traditionnel	968	8,91	0,92
L6	L6AT	traditionnel	260	11,963	4,6
L6	L6BT	traditionnel	260	12,401	4,76
L7	L7AT	traditionnel	318	20,05	6,3
L8	L8AT	traditionnel	410	15,68	3,82
L9	L9T	traditionnel	402	4,016	0,99
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					<i>2,7 ± 2,0 %</i>

*Masse : pulpe + péricarpe ; **AP=pulpe de fruit mûr, AB= pulpe de fruit immature ; T=extrait par préparation traditionnelle dans le fruit

Bilan des extractions de la pulpe de fruits mûrs par macération					
L1	L1APF	macération	500	28,7	5,74
L2	L2APF	macération	1500	26,099	1,74
L3	L3APF	macération	550	8,906	1,62
L4	L4APF	macération	200	10,684	5,34
L5	L5APF	macération	65	3,192	4,91
L6	L6APF	macération	310	6,721	2,17
L7	L7APF	macération	357	4,002	1,12
L8	L8APF	macération	407	3,2	0,78
L9	L9APF	macération	ND	192,6	-
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					<i>2,93 ± 2,0 %</i>

**AP= pulpe de fruit mûr, F= macération (à froid)

Bilan des extractions de la pulpe de fruits mûrs par décoction					
L1	L1APC	décoction	500	24,46	4,89
L2	L2APC	décoction	1500	58,007	3,86
L3	L3APC	décoction	550	12,919	2,35
L4	L4APC	décoction	200	5,882	2,94
L5	L5APC	décoction	65	3,733	5,74
L6	L6APC	décoction	399	9,811	2,45
L7	L7APC	décoction	439	20,33	4,63
L8	L8APC	décoction	537	9,989	1,86
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					3,59 ± 1,30 %
<i>**BP : maturité moyenne, pulpe ; F : macération (à froid)</i>					
Bilan des extractions de la pulpe de fruits non mûrs par macération					
L1	L1BPF	macération	500	18,769	3,75
L2	L2BPF	macération	400	5,059	1,26
L3	L3BPF	macération	550	4,724	0,86
L4	L4BPF	macération	100	3,818	3,81
L5	L5BPF	macération	59	3,225	5,46
L6	L6BPF	macération	559	11,678	2,08
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					2,87 ± 1,93 %
<i>**BP : immature, pulpe ; F : macération (à froid)</i>					
Bilan des extractions de la pulpe de fruits non mûrs par décoction					
L1	L1BPC	décoction	500	18,213	3,64
L2	L2BPC	décoction	400	16,144	4,03
L3	L3BPC	décoction	550	2,352	0,42
L4	L4BPC	décoction	100	6,178	6,18
L5	L5BPC	décoction	59	2,335	3,95
L6	L6BPC	décoction	457	13,188	2,88
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					3,51 ± 1,87 %
<i>**BP : immature, pulpe ; C : décoction (à chaud)</i>					
Bilan des extractions de la pulpe de fruits de maturité moyenne par macération					
L3	L3CPF	macération	900	11,537	1,28
L4	L4CPF	macération	600	30,669	5,11
L5	L5CPF	macération	75	4,199	5,59
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					3,99 ± 2,36 %
<i>**CP : maturité moyenne, pulpe ; F : macération (à froid)</i>					
Bilan des extractions de la pulpe de fruits de maturité moyenne par décoction					
L3	L3CPC	décoction	900	7,952	0,88
L4	L4CPC	décoction	600	38,958	6,49
L5	L5CPC	décoction	75	4,266	5,68
<i>Rendement moyen ± écart-type :</i>					4,35 ± 3,03 %
<i>**CP : maturité moyenne, pulpe ; C : décoction (à chaud)</i>					

On remarque : i) une forte variabilité des rendements d'extraction ; ii) que L3 et L8 donnent des rendements d'extraction faibles.

Tableau 30 : Rendements d'extraction : graines et péricarpes de *P. nitida* (décoctions)

N° de lot	Code extrait	Maturité fruit	Drogue	Masse matériel végétal (g)	Masse extrait (g)	Rendement %
L1	L1AG	fruits mûrs	graines	500	28,7	5,74
L2	L2AG	fruits mûrs	graines	1500	26,099	1,74
L3	L3AG	fruits mûrs	graines	550	8,906	1,62
L4	L4AG	fruits mûrs	graines	200	10,684	5,34
L5	L5AG	fruits mûrs	graines	65	3,192	4,91
Rendement moyen : 3,87 %						
L1	L1AEC	fruits mûrs	péricarpe	500	24,46	4,89
L2	L2AEC	fruits mûrs	péricarpe	1500	58,007	3,86
L3	L3AEC	fruits mûrs	péricarpe	550	12,919	2,35
L4	L4AEC	fruits mûrs	péricarpe	200	5,882	2,94
L5	L5AEC	fruits mûrs	péricarpe	65	3,733	5,74
Rendement moyen : 3,95 %						
L1	L1BG	immatures	graines	500	18,769	3,75
L2	L2BG	immatures	graines	400	5,059	1,26
L3	L3BG	immatures	graines	550	4,724	0,86
L4	L4BG	immatures	graines	100	3,818	3,818
L5	L5BG	immatures	graines	59	3,225	5,46
Rendement moyen : 3,03 %						
L1	L1BEC	immatures	péricarpe	500	18,213	3,64
L2	L2BEC	immatures	péricarpe	400	16,144	4,03
L3	L3BEC	immatures	péricarpe	550	2,352	0,43
L4	L4BEC	immatures	péricarpe	100	6,178	6,178
L5	L5BEC	immatures	péricarpe	59	2,335	3,95
Rendement moyen : 3,64 %						
L3	L3CG	moyennement mûrs	péricarpe	900	11,537	1,28
L4	L4CG	moyennement mûrs	péricarpe	600	-	-
L5	L5CG	moyennement mûrs	péricarpe	75	4,199	5,59
Rendement moyen : 3,43 %						
L3	L3CEC	moyennement mûrs	péricarpe	900	7,952	0,88
L4	L4CEC	moyennement mûrs	péricarpe	600	38,958	6,49
L5	L5CEC	75	4,266	75	4,266	5,69
Rendement moyen : 4,35 %						

Extractions alcaloïdiques

Les extraits aqueux bruts de pulpe ont subi une extraction alcaloïdique selon le protocole ci-après décrit, dans la proportion de 5 g pour 100 mL de solvant.

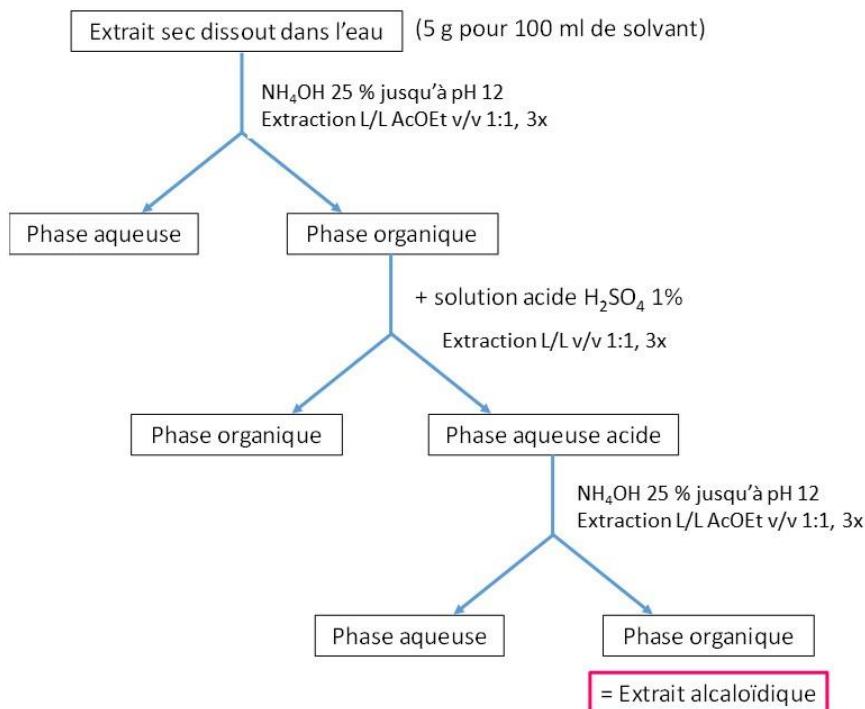


Figure 56 : Schéma d'obtention des alcaloïdes totaux

4. Analyse chromatographiques CLHP-UV-MS/MS

Les expériences de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse tandem haute résolution (MS/MS pour *Mass Spectrometry / Mass Spectrometry*) ont été réalisées avec une chaîne de marque Agilent série 1260 équipée d'une pompe quaternaire, d'un échantilleur automatique et d'un four à colonne, couplée en série avec un détecteur UV à barrettes de diode (DAD : *Diode Array Detector*) et à un Spectromètre de masse quadrupôle / temps de vol (ToF : *Time-of-Flight*) 6530 AccurateMass QTOF® utilisant une interface d'électrospray (DI-ESI-QTOF MS).

La phase stationnaire employée pour la séparation des métabolites était une colonne de silice greffée de marque Sunfire® C₁₈ (2,1 x 15 cm, 5 µm) équipée d'une précolonне. La phase mobile était constituée d'un mélange H₂O MilliQ additionnée de 0,1 % d'acide formique (AF) / méthanol (MeOH), en gradient. Les conditions élutives étaient un gradient de 5 à 100 % de MeOH en 30 minutes. La colonne était placée dans un four thermostaté à la température de 35 °C.

Les échantillons étaient préparés à la concentration de 10 mg/mL, et le volume injecté était de 10 µL. Les paramètres de la source Dual-ESI étaient auparavant optimisés et ajustés comme suit : mode positif, tension de pulvérisation 3,5 k ; skimmer : 300 V ; tension du fragmenteur, 200 V ; température du gaz de séchage 320°C ; débit de gaz de séchage 10 L/min et pression du nébuliseur 40 psi. De l'azote (pureté de 99,5 %) a été utilisé comme gaz de séchage et de nébulisation.

Les conditions d'analyses sont les suivantes : CLHP-ESI(+)-Q/Tof ; mode Auto MS/MS ; énergies de collision : top 3 : 30, 50 et 70 eV puis moyennage des spectres ; temps d'exclusion : 50 msec.

5. Analyse chromatographiques UHPLC-UV-MS/MS

Des analyses de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC : *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) couplée à un DAD la spectrométrie de masse tandem haute résolution (MS/MS) ont été réalisées pour les décotés de pulpe, des graines et des péricarpes.

Ces analyses en UHPLC-UV-DAD-MS/MS (ESI-Q/ToF) ont été menées en mode positif, de m/z 100 à 1200 en mode auto MS/MS. La séparation chromatographique est réalisée en phase inverse sur silice octadécyl-silylée, avec une Colonne C₁₈ Sunfire® Waters 3,6 µm, 4,6 mm x 150 mm), équipée d'une précolonne correspondante. Les conditions séparatives consistaient en un gradient H₂O + 0,1% AF / acetonitrile (ACN), avec une proportion d'ACN allant de 5 à 100% en 8 minutes. Le débit était de 0,250 mL/min. La concentration des échantillons était de 10 mg/mL ; le volume injecté de 2 µL.

Les conditions MS/MS : énergie de collision : 30, 50, 70 eV, avec réalisation d'une moyenne des spectres. La fragmentation a été réalisée en Top 3 (fragmentation des 3 ions les plus intenses en MS). Le temps d'exclusion était de 120 msec.

6. Réseaux moléculaires

Les réseaux moléculaires (ou réseaux de similarité spectrale) (*Molecular Networks*) correspondent à une approche chimio-informatique développée par le laboratoire dirigé par P. Dorenstein à l'Université de Californie de San Diego. Elle permet d'organiser et de visualiser des données MS/MS sous la forme d'un réseau bidimensionnel représentant des similarités spectrales entre analytes. Cet outil repose sur le fait que des molécules structurellement proches partagent des voies de fragmentation similaires en spectrométrie de masse tandem, conduisant à des fragments ou des pertes de neutre en commun. Chaque spectre de masse tandem, associé à un analyte, est représenté sous forme d'un nœud (« *node* »). Des degrés de similarité entre nœuds peuvent être calculés. Les spectres apparentés sont associés entre eux dans des agrégats (« *clusters* »). L'utilisation de réseaux moléculaires permet : de dresser une cartographie d'un ou plusieurs échantillons, d'identifier un analyte comparativement à un spectre MS/MS de référence ; de détecter un ensemble d'analogues structuraux d'un tel analyte identifié ; de permettre la comparaison fine entre les analyses MS/MS de différents échantillons.

Les chromatogrammes obtenus par CLHP couplée à la spectrométrie de masse tandem MS/MS ont été traités grâce au mode « Find by Auto MS/MS » du logiciel MassHunter® (Agilent Technologies, 2012), puis ont été traités avec le logiciel MZine2 (Katajamaa, 2006) (élimination du bruit de fond, élimination des isotopes, alignement des chromatogrammes), puis exportés en format « .mgf ». Les fichiers ont été téléchargés sur la plateforme *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, site internet). Cette plateforme est dédiée à la déréplication et l'interprétation des données MS/MS et permet de générer des réseaux moléculaires. La lecture des résultats se fait via le logiciel Cytoscape® (Shannon, 2019) qui permet de visualiser le réseau et d'annoter les nœuds et clusters.

Une comparaison des données est réalisée avec la base de données hébergée par le GNPS, qui comporte une base de données d'alcaloïdes indolomonoterpéniques collaborative mise en place sous la direction du Dr. Mehdi Beniddir dans notre UMR, dénommée MIADB (Monoterpene Indole Alkaloids Data Base), forte de plus de 170 témoins. Un « match » (correspondance) entre une molécule de l'extrait et un spectre de référence de la MIADB correspond à une masse exacte identique et au moins trois fragments MS² communs. Une comparaison des temps de rétention, des spectres UV et des spectres MS/MS est ensuite réalisée manuellement pour vérification. Cette stratégie est usuellement

employée au laboratoire. Les données obtenues sont également comparées au DNP (Dictionary of Natural Products), disponible au laboratoire (DNP, 2020).

7. Etude métabolomique sur les extraits de fruits

L'analyse CLHP-MS/MS est réalisée dans les conditions précédentes, en UHPLC – MS/MS.

Préparation des échantillons : les extraits à analyser sont préparés à la concentration de 10 mg/mL dans du méthanol. Les échantillons « contrôle qualité » (QC) sont préparés par mélange de volumes fixes (1mL) de chaque échantillon analysé.

L'analyse par LC-HRMS/MS a impliqué les éléments suivants :

- chaque échantillon est analysé en triplicat ;
- l'ordre de passage des échantillons est déterminé par un tri aléatoire, réalisé par un tirage au sort.
- un blanc (méthanol) et un QC sont intercalés tous les trois échantillons.

Une génération d'un fichier regroupant les données au format csv est réalisée de la manière suivante : les données sont exportées au format mgf à partir du logiciel MassHunter®. Une conversion au format MZXML grâce au logiciel MSconvert (Chambers, 2012) est nécessaire pour un traitement par le logiciel MZmine2 (Katajamaa 2006 ; Pluskal, 2010), permettant de générer de façon spécifique un fichier csv utilisable par Métaboanalyst.

L'analyse a été réalisée avec le serveur Metaboanalyst (version 4) (Chong, 2019) : le fichier .csv est déposé et soumis à analyse : après élimination des données manquantes, une normalisation est réalisée par rapport au groupe QC (*quality control* : échantillons poolés pour une première analyse, puis normalisation par médiane (ou somme le cas échéant)) et par mise à l'échelle des données par *Pareto scaling*.

8. Dosage d'alcaloïdes individuels par CLHP-UV

La chaîne chromatographique (Waters) employée était constituée d'un injecteur automatique Autosampler 717 plus, d'une pompe binaire 1525 binary pump, d'un détecteur 2996 Photodiode Array Detector et d'un four à colonne. Les données ont recueillies et analysées avec logiciel Empower Pro® software (2002 Waters Corporation) (Empower, 2002).

Les extraits et les témoins ont été analysés en HPLC-UV, intercalés par des blancs, dans les conditions suivantes : un éluant constitué de méthanol et d'eau (+0,1 % d'acide formique) avec un gradient de méthanol allant 5 à 100% en 30 minutes, sur une colonne C₁₈ Sunfire® (Waters) (voir les analyses CLHP – MS/MS), équipée d'une précolonne adaptée, thermostatée à 35°C, à un débit de 1mL/min. Le volume d'injection était de 10 µL.

Chacun des témoins a fait l'objet de l'établissement d'une gamme d'étalonnage comprenant au moins 5 concentrations. Après une intégration des pics (sur des intervalles de temps définis), les aires de pic des témoins ont été mesurées et une droite d'étalonnage a été générée pour chacun en prenant en compte la moyenne des valeurs obtenues pour chaque concentration. La répétabilité de la méthode était assurée par une injection de chaque concentration répétée 3 fois successivement, avec des blancs, allant de la dilution la moins concentrée à la plus concentrée. Une reproductibilité analytique était réalisée en reprenant le protocole réalisé initialement à une date différente.

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été déterminées pour chacun des témoins. Pour la LOD : le signal devait être 3 fois supérieur au bruit de fond (rapport Signal/Bruit > 3) ; pour la LOQ, le signal devait être 5 fois supérieur au bruit de fond. Des séries de dilution des témoins ont été employées (dilutions en série au demi et au dixième du point de gamme le plus bas).

Pour réaliser le dosage des extraits, initialement dilués à 10 mg/mL certains ont été dilués à 5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 1,5 mg/mL. Après avoir identifié sur les chromatogrammes des lots dosés les pics correspondant aux molécules-témoins à doser, les aires de pics ont été relevées et la concentration molaire a été calculée grâce aux droites d'étalonnage des témoins. Les concentrations ont ensuite été rapportées aux différents extraits natifs et à la pulpe d'origine.

9. Purification d'alcaloïdes de *Picralima nitida*

9.1. Extraction

Le matériel végétal était constitué de pulpe de fruits de *P. nitida* (Stapf) Th. et H. Durand.

Après extraction aqueuse de la pulpe des différents lots de fruits recueillis, nous avons souhaité doser les alcaloïdes majoritaires présents dans les différents échantillons obtenus.

Pour cela nous avions besoin de témoins de dosage, sur la base des molécules dérépliquées dans l'extrait brut L1-1T (AA PN JPF 23052018). L'échantillothèque du laboratoire nous a permis d'obtenir 2 molécules sur les 9 plus abondantes : la burnamine et la picraline. Mais la picraline n'a pas pu être utilisée comme témoin de dosage elle n'était pas suffisamment propre.

Dans l'optique d'obtenir les témoins alcaloïdiques de dosage, nous avons entrepris de réaliser une extraction alcaloïdique. Cependant les extraits aqueux des différents lots étaient insuffisants pour une telle extraction. Tous les extraits aqueux ont donc été rassemblés, après avoir conservé un aliquote de chacun, pour obtenir une masse pondérale de 369,90 g d'extrait aqueux.

Cet extrait a ensuite subi une extraction alcaloïdique après alcalinisation avec du NH₄OH (25%), il a été extrait avec de l'AcOEt à température ambiante, pendant 24 h. L'extrait brut AcOEt a été filtré sous vide et concentré par évaporation sous pression réduite. Cet extrait d'un volume d'environ 1 L a subi une contre-extraction liquide/liquide avec une solution acide à 1 % (2,5 L), suivie d'une alcalinisation de la fraction aqueuse avec une solution concentrée de NH₄OH jusqu'à pH 10, et une extraction des alcaloïdes libérés avec AcOEt. La fraction AcOEt a été tirée à sec par évaporation rotative à 35°C, pour obtenir une masse de 7 g d'extrait alcaloïdique, soit un rendement d'extraction de 2,10 %.

C'est cet extrait alcaloïdique qui a été fractionné afin de purifier les alcaloïdes ciblés.

9.2. Fractionnement et isolement

L'extrait alcaloïdique a été fractionné par chromatographie flash sur silica® 330 g en utilisant un gradient de CH₂Cl₂/ MeOH (100 : 0 à 0 : 100). Le débit était fixé à 100 mL/min. La séparation par chromatographie flash a permis d'obtenir 16 fractions regroupées selon leur profil chromatographique en CCM. Ces fractions ont été analysées par HPLC-TOF-HRESIMS en vue de mettre en évidence les molécules caractéristiques. Les fractions d'intérêt les plus abondantes (AA F5, F6 et F12) ont été sélectionnées pour purification.

9.3. Fractionnement de l'extrait alcaloïdique total de pulpe de fruit de *P. nitida*

Le schéma de fractionnement est décrit dans les figures suivantes (les masses des fractions et produits y sont indiquées en mg). Les étapes de fractionnement ont été réalisées par chromatographie sur colonne ouverte de gel de Sephadex® LH20 ; par chromatographie moyenne pression en phase normale sur gel de silice ou en phase inverse sur gel de silice greffée (octadécysilylée, C₁₈) ; par chromatographie liquide haute-performance semi-préparative en phase inverse (colonne Sunfire® C₁₈, 50 x 250 mm, 5 µm), sur une chaîne chromatographique Waters. Les fractions chromatographiques ont été rassemblées sur la base de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM ; gel de silice fluorescente ; révélation : vanilline sulfurique ou réactif de Dragendorff ou Chlorure de cérium) ou en CLHP-UV ou en CLHP-UV-MS/MS. Les évaporations ont été réalisées sous pression réduite.

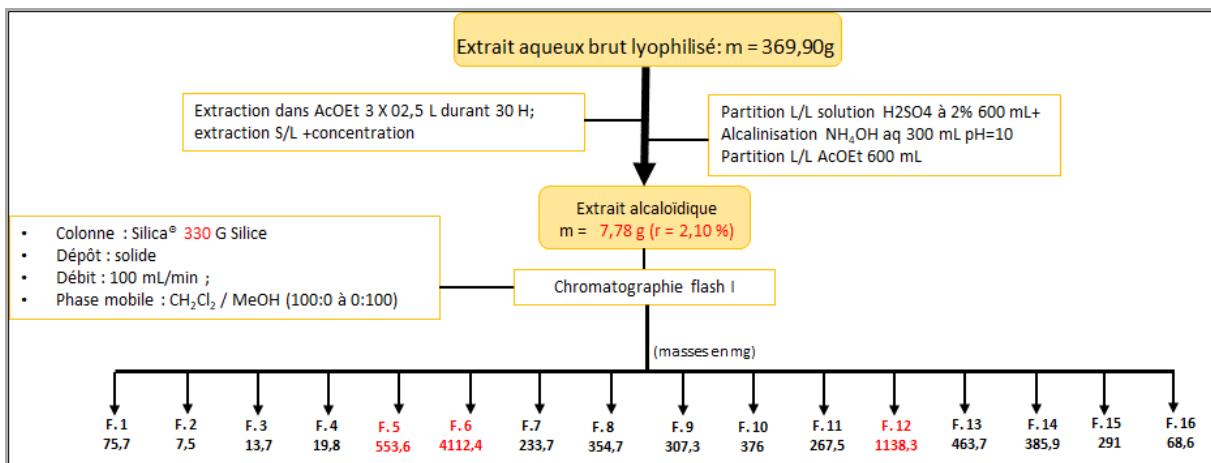


Figure 57 : Schéma d'obtention et de fractionnement de l'extrait alcaloïdique (rappel : les extraits aqueux sont rassemblés)

Le fractionnement de F5 permet l'obtention du pic **18** (Akuammigine, 4,6 mg) (figure 45).

Le fractionnement de F6 permet d'obtenir le pic **14** (*m/z* 353,18, pouvant correspondre à la raubasine **4** (en cours d'analyse). Il permet également d'obtenir le produit indiqué F6-5-5-4 qui correspond au produit 8-bis. Ce produit à *m/z* 355,16, de Tr 15,4 min lors de l'analyse par CLHP-UV-MS/MS de l'extrait L1-1T, donnait un match avec la yohimbine (le Tr du témoin yohimbine étant différent (figure 46)). Le fractionnement de F12 donne les produits **9** (*m/z* 293,16) (0,9 mg), **11** (*m/z* 295,116) (2,8 mg), **12** (*m/z* 295,17) (4 mg), **16**, **17** (*m/z* 349,15) (29,7 mg).

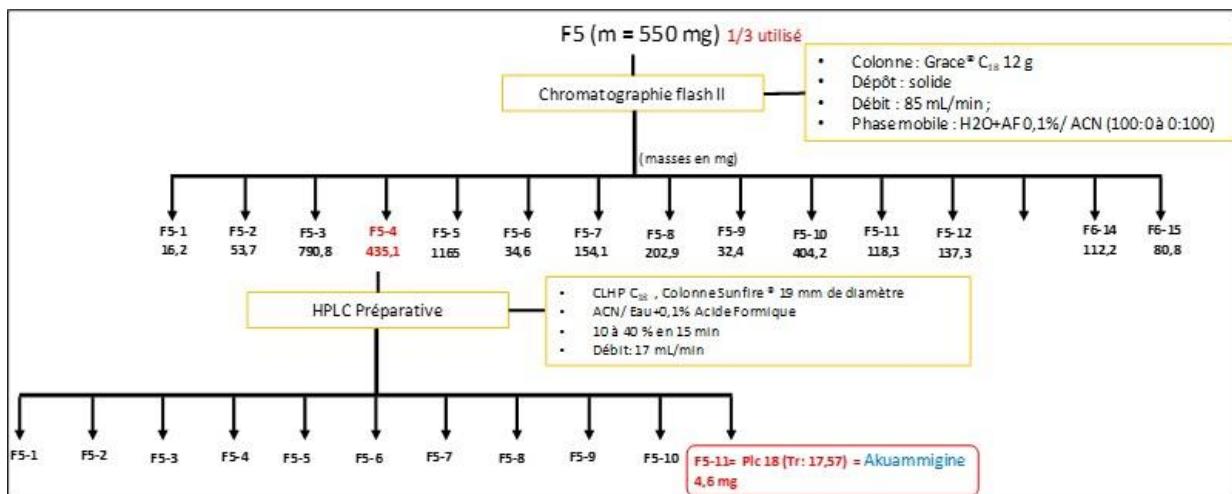


Figure 58 : Schéma de fractionnement de la fraction F5

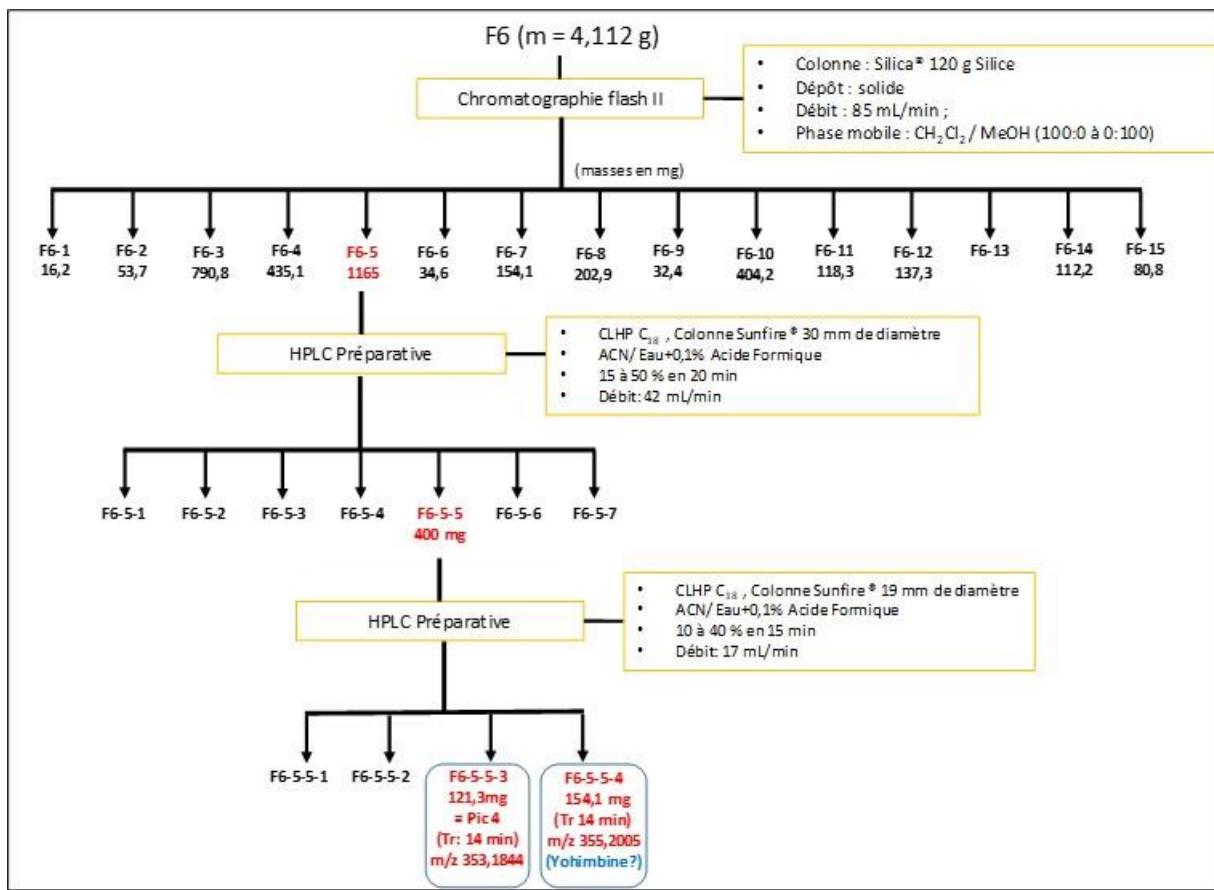


Figure 59 : Schéma de fractionnement de la fraction F6
Le produit indiqué F6-5-5-4 dans cette figure est le produit **8-bis**.

Le travail sur F12 donne les produits **9, 11, 12, 16, 17** (figure 47).

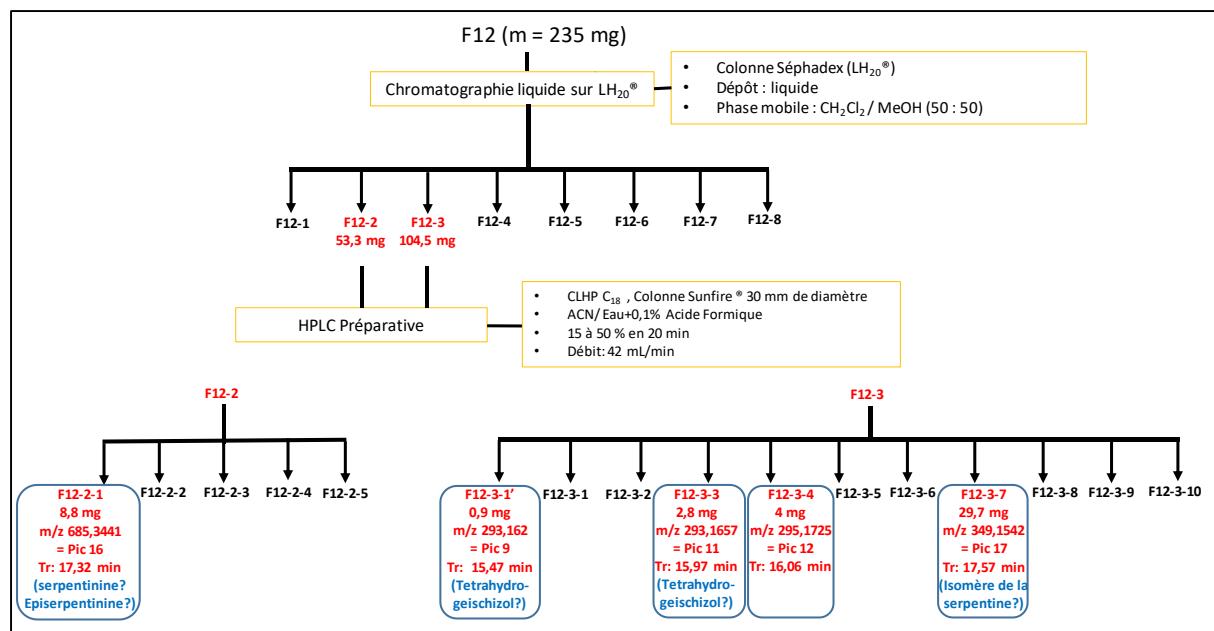


Figure 60 : Schéma de fractionnement de la fraction F12

Obtention d'alcaloïdes témoins à partir des extraits alcaloïdiques d'un extrait de graines

Certains témoins issus de l'extrait alcaloïdique de la pulpe étaient en mélange avec d'autres molécules et difficiles à purifier. Egalement présents dans l'extrait d'épicarpe de fruit et dans les graines, nous les avons purifiés à partir de ces extraits (L4EC : extrait aqueux de péricarpe du lot L4 ; PNG : extrait alcaloïdique de graines, disponible au laboratoire (lot non répertorié dans ce manuscrit, obtenu en Côte d'Ivoire par le Dr Landry Kablan). Le fractionnement de L4EC donne 14 produits (figure 48).

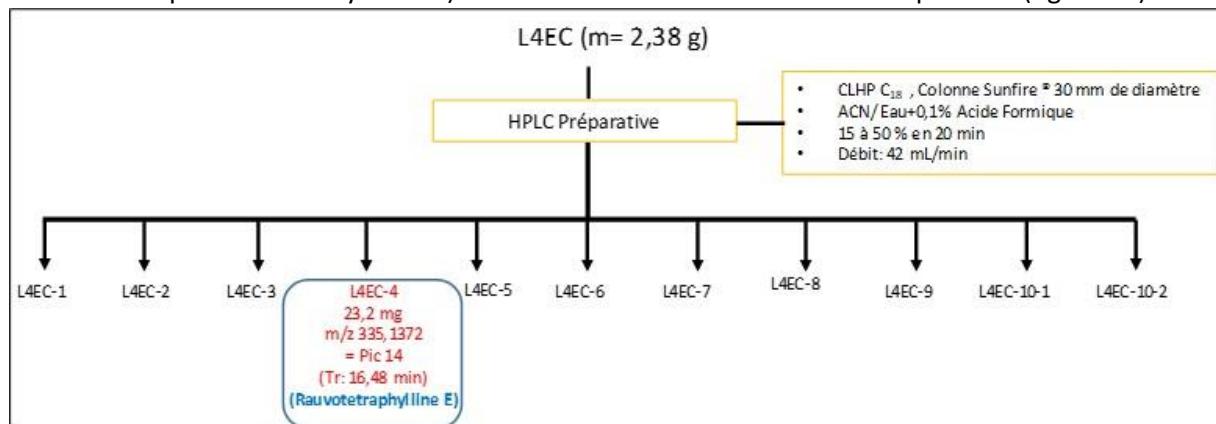


Figure 61 : Schéma de fractionnement de l'extrait L4EC

Pic 14 : identité non déterminée ; correspond à la formule de la Rauvotetraphylline E dans le DNP.

Le fractionnement de l'extrait de graines PNG donne les produits **5** (m/z 339) (5 mg), **6** (m/z 383,19) et **8** (m/z 297,18) (figure 49).

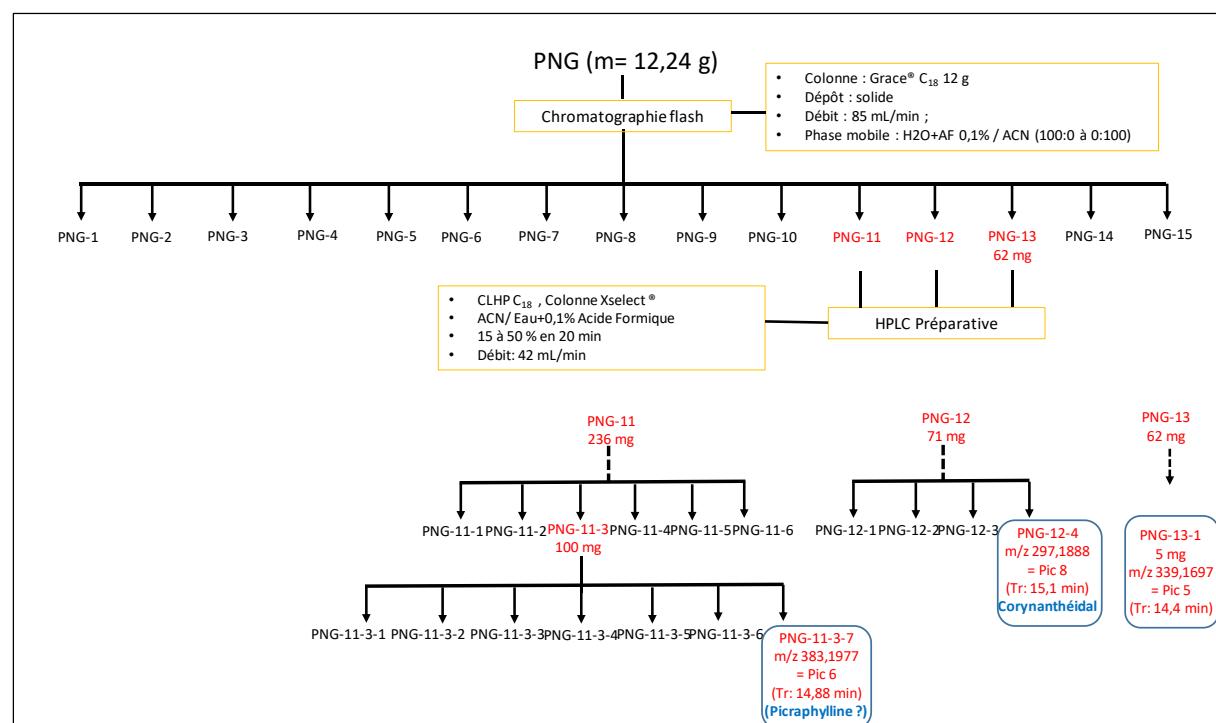


Figure 62 : Schéma de fractionnement de l'extrait PNG

Tableau 31 : Bilan des composés isolés ou en cours d'isolement

Cp n°	m/z	Tr CLHP (min)	Formule brute	Adduit	Score MassHunter (%)*	Match MIADB (score %)**	Source (pulpe / graines / péricarpe)	identité réelle ou potentielle	RMN 1D	RMN 2D	RMN NOESY	A repurifier
4	353,1872	13,71	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	94,1		Pulpe	Ajmalicine (=raubasine) ?	X	X	X	
5	339,1837	14,49	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	95,3		Pulpe					
6	383,1968	14,88	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	99,33		Graines	Akuammine ?				X
8	297,1972	15,14	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O	[M+H] ⁺	96,41	0,874	Graines	Corynanthéidal				
8bis	355,1986	13,88	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	98,37	0,831	Pulpe	Diastéréoisomère de la yohimbine				X
11	293,1668	15,97	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O	[M+H] ⁺	97,08		Pulpe					
12	295,1814	16,06	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O	[M+H] ⁺	97,47		Pulpe					
14	335,1398	16,53	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	[M] ⁺	96,84		Pulpe, Péricarpe	Déméthyl serpentine= rauvotéraphylline?	X	X	X	
16	343,1865 (685,3396)	17,32	C ₄₅ H ₄₂ N ₅ O ₂	[M+2H] ²⁺ ([M+H] ⁺)	97,77		Pulpe, Péricarpe	Epi-serpentinine?				X
17	349,1554	17,57	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M] ⁺	96,04	0,726	Pulpe, Péricarpe	Diastéréoisomère de la serpentine	X	X	X	
18	353,1867	17,57	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	97,33		Pulpe	Akuammigine	X	X		
19	363,173	18,99	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	91,01		Pulpe					X
Autres alcaloïdes isolés à partir de la pulpe												
a	339,171	9,72	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	96,15		Pulpe					
b	351,1735	9,72	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	93,65		Pulpe					X

Cp n°	m/z	Tr CLHP (min)	Formule brute	Adduit	Score MassHunter (%)*	Match MIADB (score %)**	Source (pulpe / graines / péricarpe)	identité réelle ou potentielle	RMN 1D	RMN 2D	RMN NOESY	A repurifier
c	351,1728 (701,3353)	10,29	C ₄₇ H ₄₄ N ₂ O ₄	[M+2H] ²⁺ ([M+H] ⁺)	95,91		Pulpe					
d	341,1592 (681,3093)	10,3	C ₄₇ H ₄₀ N ₂ O ₃	[M+2H] ²⁺	97,06		Pulpe					
e	435,1966	11,21	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	99,56		Pulpe					
f	349,1588	10,54	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	94,7		Pulpe					X
g	447,1926	10,87	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	97,41		Pulpe					X
h	387,1552	9,37	C ₂₁ H ₂₃ CIN ₂ O ₃	[M+H] ⁺	91,32		Pulpe					X
Autres alcaloïdes isolés à partir de la pulpe												
i	397,2124	8,90	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	97,64		Graines					X
j	431,1727	9,14	C ₂₃ H ₂₇ CIN ₂ O ₄	[M+H] ⁺	99,41		Graines					X
k	381,2176	10,53	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	99,53		Graines					X
l	337,1919	12,72	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	98,24		Graines					X
Alcaloïde isolé à partir du péricarpe												
m	421,1845	18,94	C ₂₇ H ₂₂ N ₃ O ₂		97,97		Péricarpe					

* certitude sur la formule brute, proposée par le logiciel MassHunter®

** score de la correspondance avec un témoin sur Cytoscape®

10. Produits obtenus :

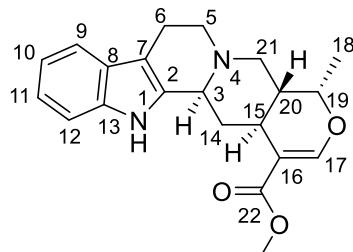
Le tableau 31 récapitule quels produits ont été isolés ou sont en cours d'isolement dans ce travail. Comme mentionné précédemment, les données RMN ^1H , ^{13}C et 2D (HSQC, HMBC, NOESY) sont en cours d'obtention (notées « X » dans le tableau 31 lorsqu'elles ont été obtenues). Les données disponibles ont été comparées à celles de la littérature. Les spectres IR, les pouvoirs rotatoires, les spectres de dichroïsme circulaire sont encore à obtenir. Les configurations relatives et absolues restent indéterminées pour ces produits pour lesquels des hypothèses structurales sont proposées ici.

Pour les composés désignés **a** à **m**, les Tr indiqués correspondent aux temps de rétention dans l'analyse chromatographique en CLHP-UV-MS/MS de ces composés dans les conditions suivantes : MeOH / H_2O + Acide formique 1%, gradient MeOH 5 à 100 en 30 minutes.

Les composés **4**, **5**, **14**, **17** et **18**, isolés de fruits de *P. nitida*, ont fait l'objet d'analyses RMN. Ils se sont tous révélés être des alcaloïdes indolomonoterpéniques en série hétéroyohimbane. Leur numérotation se base sur celle convenue pour ces molécules.

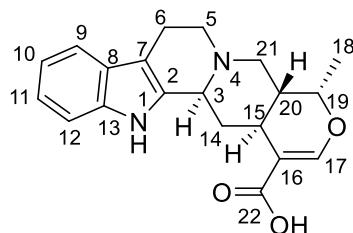
Nous ne présenterons que les résultats obtenus pour les produits dont les analyses spectrales ont été finalisées. Les résultats finaux feront l'objet de valorisation, une fois consolidés.

- Composé **4** ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z mesuré = 353,1844 ; m/z théorique = 353, 1860 ; $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$) : raubasine (ajmalicine) ? (éventuellement : diastéréoisomère ? Des épimères / diépimères / triépimères en 3, 19, 20 de la raubasine sont répertoriés par le DNP).



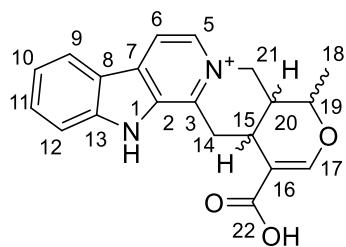
Structure de la Raubasine (Höfle G., 1980)

- Composé **5** ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z mesuré = 339,1837 ; m/z théorique = 339, 1703 ; $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$) :



Proposition : analogue déméthylé de la Raubasine (Höfle G., 1980)

- Composé **14** ($m/z = 335,1401$) : Analogue déméthylé de serpentine ? rauvotéraphylline E ? acide serpentinique ?

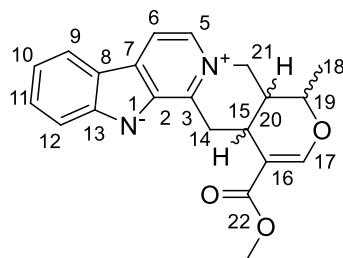


Structure possible, à confirmer ; stéréochimie non déterminée (ici : rauvotéraphylline E) (Gao Y., 2012 ; Wang C-H., 2013)

Tableau 32 : Attribution des signaux RMN 1H et ^{13}C du composé **14** (MeOD ; 300MHz) (cf annexes 9)

Position	δ 1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2	-	135,3
3	-	142,1
5	8,47 (d ; 9)	133,9
6	8,50 (s)	116,8
7	-	133,4
8	-	121,5
9	8,37 (d ; 6)	124,1
10	7,47 (m)	123,1
11	7,64 (s)	133,0
12	7,78 (s)	113,9
13	-	145,5
14	4,64 (d ; 9) 3,37 (s)	25,3 -
15	3,12 (s)	28,1
16	-	112,6
17	7,51 (m)	155,7
18	1,48 (d ; 6)	18,6
19	3,97 (s)	72,0
20	2,53	37,3
21	5,03 (d ; 12) 4,64 (d ; 9)	55,8 -
22	-	168,8

- Composé **17** ($m/z = 349,1537$) : Diastéréoisomère de la Serpentine ? - *Epi*-serpentine ?

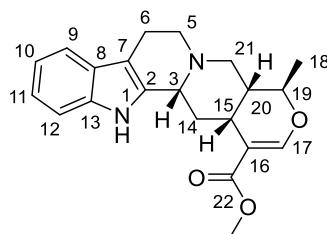


Structure possible, à confirmer avec la cristallographie et le dichroïsme circulaire :
diastéréoisomère de la Serpentine ? (Wachsmuth O., 2002).

Tableau 33 : Attribution des signaux RMN 1H et ^{13}C du composé **17** ($MeOD ; 300Mz$) (cf annexes 9).

Position	$\delta ^1H$ (ppm)	$\delta ^{13}C$ (ppm)
2	-	135,3
3	-	141,3
5	8,45	134,0
6	8,48 (s)	117,0
7	-	133,4
8	-	121,4
9	8,33 (d ; 6)	124,1
10	7,44 (d ; 6)	123,1
11	7,76 (m)	133,0
12	7,75 (m)	113,9
13	-	145,5
14	3,17 (d ; 6)	27,5
	?	
15	2,55 (s)	37,1
16	-	109,2
17	7,71(s)	157,1
18	1,48 (d ; 6,0)	18,6
19	4,01(s)	72,5
20	3,80 (s)	52,0
21	5,02(s)	55,7
	4,66(d ; 9)	-
22	-	168,8
23	3,35 (s)	49,9

- Composé **18** ($m/z = 353,1838$) : Akuammigine ?



Structure de l'Akuammigine (Lounasmaa, 1979)

11. Test d'activité antiplasmodiale *in vitro*

11.1. Souches W2, ND6

Les essais sont réalisés sur les souches de *Plasmodium falciparum* 3D7 (chloroquine-sensible) et W2 (chloroquine-résistante) obtenues auprès du *Malaria French National Reference Center* (centre national de référence : CNR Paludisme, Hôpital Bichat, Paris), maintenues dans des érythrocytes O+ humains dans le milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Life Technologies) supplémenté (25 mM HEPES (Sigma), 25 mM NaHCO₃ (Sigma), 0,5% Albumax II (Invitrogen, Life Technologies), à 37 °C, dans les conditions et Trager et Jensen. Les évaluations d'activités sont réalisées suivant un protocole déjà décrit, à l'aide d'une suspension d'érythrocytes à 1 % de parasitémie, dont > 85 % de parasites au stade anneau (Vasquez-Ocmín, 2020 ; Vasquez-Ocmín, 2021). Des dilutions sérielles d'extraits et de produits sont testées. La chloroquine est employée comme témoin.

L'incubation avec les produits à tester est réalisée pendant 44 h at 37 °C. Après incubation, les plaques sont soumises à 3 cycles congélation / décongélation pour lyser les cellules. La suspension obtenue est diluée dans un tampon de lyse (10 mM NaCl, 1 mM Tris HCl pH 8, 2,5 mM EDTA pH 8, 0,05 % SDS, 0,01 mg/mL protéinase K et 1X SYBR Green), au 1 :10.

Une amplification génétique est réalisée par PCR avec le Master epRealplex cycler® (Eppendorf, France) suivant le programme : 90 °C pendant 1 min, passage de 90 °C à 10 °C en 5 min, lecture de la fluorescence du SYBR Green avec un fluorimètre à 10 °C pendant 1 min et seconde lecture à 10 °C pendant 2 min. Les échantillons ont été testés en dupliques, avec répétition du test pour des valeurs de fluorescence différentes. La concentration provoquant une inhibition de la croissance de 50% (CI₅₀) a été obtenue à partir de la courbe de concentration-réponse du composé et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes ± écarts-types

11.2. Souche Fcb1

Les essais sont réalisés suivant un protocole déjà décrit (Vasquez-Ocmín, 2020). La souche résistante à la chloroquine FcB1/ Colombie de *Plasmodium falciparum* appartient à la collection du Muséum National d'Histoire naturelle de Paris (n° MNHN-CEU-224-PfFcB1). Les parasites ont été maintenus *in vitro* dans des érythrocytes humains, dans un milieu RPMI 1640 additionné de 8% (v/v) de sérum humain inactivé par la chaleur à 37°C sous une atmosphère composée de 3% de CO₂, 6% d'O₂ et 91% de N₂. Les globules rouges humains et le sérum ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang Ile de France sous l'agrément C-CPSL-UNT n°13/EFS/126. La sensibilité *in vitro* aux médicaments a été mesurée par incorporation de [3H]-hypoxanthine. Des solutions mères de médicaments ont été préparées dans du DMSO. Pour les essais, ces solutions ont été diluées en série deux fois avec 100 µL de milieu de culture dans les plaques à 96 puits. Des cultures de parasites asynchrones (100 µL, 1% de parasitémie et 1% d'hématocrite final) ont ensuite été ajoutées à chaque puits et incubées pendant 24h à 37°C avant l'ajout de 0,5 µCi de [3H]-hypoxanthine (GE Healthcare ; 1 à 5 Ci.mmol/mL) par puit. Après une nouvelle incubation de 24h, les plaques ont été congelées et décongelées. Les lysats cellulaires ont ensuite été collectés sur des filtres en fibre de verre et comptés dans un spectromètre à scintillation liquide. L'inhibition de la croissance pour chaque concentration de composé a été déterminée par comparaison de la radioactivité incorporée dans la culture traitée avec celle de la culture témoin maintenue sur la même plaque. La concentration provoquant une inhibition de la croissance de 50 % (CI₅₀) a été obtenue à partir de la courbe de concentration-réponse du composé et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes ± écarts-types déterminés à partir de

trois expériences indépendantes. Le diphosphate de chloroquine (Sigma, pureté > 99 %) est utilisé comme témoin positif, a été acheté auprès de.

12. Test d'activité antiplasmodiale *in vivo*

Les animaux (mâle ou femelle) utilisés étaient des souris Swiss albinos, pesant 25 ± 2 g. Avant l'expérimentation, les animaux ont été mis à jeun pendant 4 h avec un accès libre à l'eau.

Décongélation et inoculation de *Plasmodium berghei* aux souris :

Le tube contenant *Plasmodium berghei* (souche ATCC-MRA-415, n° de lot 24 515 338 MR4 ATCC Manassas, Virginie; stade érythrocytaire) est retiré de l'azote liquide (-196 °C) et placé dans un bain marie à 37 °C, sous agitation douce, pendant 1 minute, dans le but de décongeler la souche. Le contenu du cryotube est transféré dans un tube Falcon de 15 mL, auquel un volume égal de la solution de décongélation (NaCl 3,5 %) est ajouté à l'aide d'une micropipette. Le mélange obtenu est alors centrifugé à 2000 tours /min pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette et le culot contenant les parasites est suspendu dans un volume égal de sérum physiologique (NaCl 0,9 %). Après homogénéisation, un volume de 100 µL est prélevé à l'aide d'une seringue à insuline et injecté par voie intraperitoneale à chaque souris donneuse. La parasitémie des souris est évaluée 4 jours après l'infestation ; les animaux présentant de fortes parasitémies (> 20 %) sont sélectionnés. Les souris donneuses infestées sont placées chacune dans une jarre en plastique translucide hermétiquement fermée contenant du coton imprégné d'éther diéthylique dans le but de les endormir. Un prélèvement sanguin est effectué sous PSM 2 (prélèvement à l'aide d'une aiguille 25G en rasant l'animal au niveau de la région du cou, dans un tube contenant de l'EDTA pour éviter toute différence de parasitémie. Une partie du sang parasité est prélevée pour la Numération de Formule Sanguine (200 µL de sang). L'autre partie est transférée dans un tube Falcon de 15 mL, puis centrifugé à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Le sérum et les globules blancs sont enlevés à l'aide d'une pipette. Un volume (x mL) du culot parasité est dilué dans y mL de sérum physiologique (NaCl, 0,9 %) de sorte que 200 µL de sang contiennent 1×10^7 globules rouges. Ce volume est injecté à d'autres souris pour infestation et pour évaluation des produits. La parasitémie de chaque souris test est évaluée quotidiennement (goutte de sang prélevée à la queue).

Echantillons testés : pour la macération traditionnelle de pulpe de *P. nitida*, nous avons estimé à 325 mL au plus le volume administré (2 fois par jour) pour le traitement du paludisme, généralement pendant 5 jours. Un extrait de pulpe du fruit mûr de *P. nitida* (Lot 9) réalisé par macération à froid (extrait L9-AF) est employé. La lyophilisation de ce volume de l'extrait a conduit à l'obtention de 6,8945 g de résidus, soit 0,0212 g par mL d'extrait natif (non filtré). Pour un adulte de 70 kg, la dose usuelle en équivalent lyophylisat est de 0,198 mg/kg/jour. Pour l'administration aux animaux, l'extrait sec est dilué dans l'eau, à 0,03 mg/mL. L'administration est réalisée une fois par jour, par gavage. L'extrait de péricarpe de *P. nitida* du même lot de fruits (Lot 9 ; extrait L9-EC) est étudié à la même dose et à une dose 5 fois supérieure.

Evaluation de l'activité antiplasmodiale : Le test de Riley a été employé. 8 animaux sont utilisés par groupe : Groupe 1 : Témoin négatif (reçoit une solution saline (NaCl 0,9 %) ; Groupe 2 : Témoin chloroquine ; Groupe 3 : Témoin artéméthér ; Groupe 4 : Extrait L9-AF, 2 mg/kg ; Groupe 4 : Extrait L9-EC, 2 mg/kg ; Groupe 5 : Extrait L9-EC, 10 mg/kg. Tous les lots de souris sont traités une fois par jour, pendant 5 jours successifs (J1 -J5). Pour chaque lot de souris la parasitémie est évaluée chaque jour pendant 6 jours successifs.

Détermination de la parasitémie : la parasitémie a été déterminée au microscope dans une cellule de Malassez, en comptant un nombre total de 1000 globules rouges. Le pourcentage de cellules parasitées a été calculé selon la formule : $\text{Parasitémie (\%)} = [(Nb \text{ de GR infectés} / Nb \text{ total de GR}] \times 100$.

Analyse statistique : les données ont été analysées avec le logiciel Graph Pad Prism (version 7.0). La comparaison des différents pourcentages de parasitémie a été possible grâce au test ANOVA (analyse de variance non paramétrique) et à la comparaison multiple de Dunnett's au risque α égal à 5 %. La codification pour une différence statistiquement significative a été la suivante : * : $p < 0,05$: différence significative ; ** : $p < 0,01$: différence très significative.

Références bibliographiques

- Abiodun F., Imieje V., Erharuyi O., Ahomafor J., Jacob M.R., Khan S.I., Hamann M.T. , 2014. Evaluation of three medicinal plant extracts against plasmodium falciparum and selected microorganisms. African Journal of Traditional Complement Alternative Medecin 11, n° 4 (2014): 142-46.
- Académie nationale de pharmacie, 2021. Dictionnaire (en ligne), définition « paludisme », consulté en mai 2021 ; accessible à : <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Paludisme>.
- Adiko M., Bouttier S., Lambert S., Okpekon T.A., Ake-Assi L. Kablan B.J., Champy P., 2014. Phytothérapie traditionnelle des conjonctivites en milieu urbain Ivoirien: enquête sur les deux marchés aux plantes médicinales d'Abidjan. Botany Letters. Acta Botanica Gallica, 161(1), 33–45.
- AFC- Association française des professionnels de la cueillette de plantes sauvages. Charte de l'AFC, 2020 ; accessible à <http://www.cueillettes-pro.org/CHARTE-DE-L-AFC-104.html>.
- Agbodeka K., Gbekley H.E., Karou S.D., Anani K., Simpore J., 2017. Activité antiplasmodiale des plantes médicinales d 'Afrique de l'Ouest : Revue de la littérature. International Journal of innovation and Scientific Research 28, n° 2 (2017): 121-29.
- Agilent Technologies, 2010. Agilent MassHunter workstation software, 2010.
- Agilent Technologies, 2012. Logiciel pour le poste de travail Agilent MassHunter – Analyse qualitative – Guide de familiarisation. Agilent Technologies, Inc. 2012(documentation technique).
- Aguwa C.N., Ukwe C.V., Inya-Agha I., Okonta J.M., 2001. Antidiabetic effect of Picralima nitida aqueous seed extract in experimental rabbit model. Journal of Natural Remedies 1, n° 2 (2001): 135-39. <https://doi.org/10.18311/jnr/2001/22>.
- Akabassi G.C., Padonou E.A., Chadare F.J., Assogbadjo A.E., 2017. Importance ethnobotanique et valeur d 'usage de Picralima nitida (staph) au Sud-Bénin (Afrique de l 'Ouest). International Journal of Biological and Chemical Sciences. 11(5). October (2017): 1979-1993.
- Aké Assi Laurent, 1961. Contribution à l'étude floristique de la Côte d'Ivoire et des territoires limitrophes. Paris : Université de Paris, 1961, 289 p. multigr. Thèse de Sciences, Université de Paris : Paris, 1961/01/25) <https://horizon.documentation.ird.fr/>.
- Aké Assi L., 1984. Flore de la Côte d'Ivoire : étude descriptive et biogéographique, avec quelques notes ethnobotaniques. Thèse Université d'Abidjan, 1984 ; notice à : https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/detailstatic.aspx?INSTANCE=exploitation&RSC_BASE=HORIZON&RSC_DOCID=21702.
- Akoubet A., Alcover C., Otogo E., Beniddir Mehdi , Evano L., Kone-Bamba D., Champy P., 2017. Analyse d'un extrait aqueux de fruit de Picralima nitida: déréplication utilisant les réseaux moléculaires. Poster. 7ème édition de la journée de l'Ecole doctorale: Innovation thérapeutique, du fondamental à l'appliqué, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, 23 Juin 2017, Paris. Poster primé (2ème prix, chimie).
- Akoubet, A., 2018. Réglementation des médicaments à base de plantes en Côte d'Ivoire : Etat des lieux. Mémoire de Diplôme Interuniversitaire Phytothérapie et Aromathérapie, Universités Paris Descartes et Paris-Sud 11, 23p.

Alcover F.C., Bernadat G., Kabran F.A., Le Pogam P., Leblanc K., Fox Ramos A.E., Gallard J.-F., Mouray E., Grellier P., Poupon E., Beniddir M.A., 2020. Molecular Networking Reveals Serpentine-Related Bisindole Alkaloids from *Picralima nitida*, a Previously Well-Investigated Species . Journal of Natural Products, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01247>.

Alexandre D., 1980. Caractère saisonnier de la fructification dans une forêt hygrophile de Côte-d'Ivoire. Terre et vie. Revue d'écologie appliquée Paris 34, n° 3 (1980): 335-59.

Amari, A., et al. 2009. Enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle en Côte d'Ivoire : enjeux et stratégie. Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. 10 (1) 87-90. EDUCI.

Amari, A., Kablan B.J., Pabst J.Y., et al., 2008. La législation pharmaceutique européenne comme contribution à la réglementation des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle africaine. Ethnopharmacologia 2008, 42, 29-35. Décembre 2008.

Ambe, A. et al., 2002. Diversité des plantes médicinales et ethnotaxonomie en pays malinké de Côte d'Ivoire. In : Des sources du savoir aux médicaments du futur : actes du 4e congrès européen d'ethnopharmacologie (p331-338).

Ambe, A., 2006. Inventaire de la flore et étude structurale de la végétation d'une parcelle de la forêt classée de Monogaga sud (San-Pedro, Côte d'Ivoire). Mémoire de DEA, Université de cocody, Abidjan 78p.

Anoma G., Ake Assi L., 1989. Flore de la Côte d'Ivoire : disparition de nombreuses espèces due à la destruction inconsidérée de l'espace naturel. Le cas de *Monanthotaxis capea* (E.G. et A. Camus) Verdc. (Annonaceae). Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 1989, 136(3-4), 27-31.

Anosa G.N., Udegbunam R.I., Okoro J.O., Okoroafor O.N., 2014. In vivo antimalarial activities of *Enantia polycarpa* stem bark against *Plasmodium berghei* *berghei* in mice. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153, 531-534.

Arens H., Borbe H., Ulbrich B., Stackigt J., 1982. Detection of pericine, a new CNS-active indole alkaloid from *Picralima nitida* cell suspension culture by opiate receptor binding studies. Planta Medica 46, n° 4 (1982): 210-14. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971216>.

Arora N., Anbalagan L.C., Pannu A.K., 2021. Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? Risk Management and Health Policy. 2021, 14, 1033-1039.

Arrêté N° 409/MSP du 28 Décembre 2001, modifié par les arrêtés n°158 MSHP/CAB du 21 juin 2007 et n° 253/MSHP/CAB du 10 septembre 2007, portant création, organisation et fonctionnement du Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT).

Ansa-Asamoah R., Kapadia G.J., Lloyd H.A., Sokoloski E.A., 1990. Picratidine, a new indole alkaloid from *picralima nitida* seeds. Journal of Natural Products 53, n° 4 (1990): 975-77.
<https://doi.org/10.1021/np50070a032>.

Aubréville, A., 1959. La flore forestière de la Côte d'Ivoire. Deuxième édition révisée. Vol. 3 TOME 2, 1959, CTFT, Nogent-sur-Marne.

Benayad S., Ahamada K., Lewin G., Evanno L., Poupon E., 2016. Preakuammicine: A long-awaited missing link in the biosynthesis of monoterpane indole alkaloids, European Journal of Organic Chemistry, 2016, 2016, 1494-1499.

Béné K., Camara D., Fofie N.B.Y., Kanga Y., Yapi A.B., Yapo Y.C., Ambe S.A., Zihiri G.N., 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le Département de Transua, District du Zanzan (Côte d'Ivoire). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.27, Issue 2: 4230-4250.

Beniddir M., 2018. MTBLS142: Collected tandem mass spectrometry data on monoterpane indole alkaloids from natural product chemistry research. Déposé sur la base de données Metabolights en 2018 ; accessible à <https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS142/descriptors>.

Beniddir M.A., Fox Ramos A.E., Evanno E., Poupon E., Champy P., 2019. Natural products targeting strategies involving Molecular Networking: Different manners, one goal. *Natural Products Report*, 2019, 36, 960-980.

Bickii J., Feuya T.G.R., Tchouankeu J.-C., Tsamo E., 2007. Antimalarial activity in crude extracts of some Cameroonian medicinal plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2007. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v4i1.31200>.

Bla K. B., Trebissou J., Bidie A., Assi Y.J., Zihiri N.G., 2015. Étude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées chez les Baoulé- N'Gban de Toumodi dans le Centre de la Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*. 85(1):7775– 7783.

Bonneau N., Baloul L., Ndob I.B., Sénejoux F., Champy P., 2017. The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis. *Food chemistry*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.042>.

Booker A., Johnston D., Heinrich M., 2012. Value chains of herbal medicines—Research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2012, 140, 624-633.

Bouquet, A Debray, 1974. Plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Travaux et documents de L'O.R.S.T.O.M. 32^e éd., 231p. Imprimerie Louis-Jean, 1974. ISBN 2-7099-0341-5.
<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:06894>.

Boutefnouchet S. (Ed.), 2020. Pharmacognosie. Obtention et propriétés des substances actives médicamenteuses d'origine naturelle. Elsevier Masson.

Bruneton, J. 2015. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 5e éd., Paris, Tec&Doc, 2009, 1288 p.

Brunkent, U., Schmidt M., Dressler S., Janssen T., Thiombiano A., Zizka, G., 2008. West African Plants. A photo guide. West african plants, 2008.
http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=14&id=2359#image=5033.

Byng J.W., Smets E.F., Vugt R.V., Bidault E., Davidson C., Kenicer G., Chase M.W., Christenhusz M.J.M., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society* 181 (2016): 1-20.

Byng J.W., Smets E.F., Vugt R.V., Bidault E., Davidson C., Kenicer G., Chase M.W., Maarten J.M. Christenhusz M.J.M., 2018. (PDF) The phylogeny of angiosperms poster: a visual summary of APG IV family relationships and floral diversity. The Gloral Flora 1, January (2018): 4-7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/322554838_The_phylogeny_of_angiosperms_poster_a_visual_summary_of_APG_IV_family_relationships_and_floral_diversity [accessed Nov 12 2021]. The

phylogeny of angiosperms poster: a visual summary of APG IV family relationships and floral diversity

Carte démographique de la Côte d'Ivoire. Encyclopédie Larousse, site internet consulté le 26/09/2019. https://www.larousse.fr/encyclopedie/pays/C%C3%B4te_dIvoire/114843.

Carte des départements de Côte d'Ivoire. <http://www.carte-du-monde.net/pays-434-carte-departements-cote-d-ivoire.html> (consulté le 26/09/2019).

Cartographie des systèmes d'approvisionnement et de distribution des médicaments et autres produits de santé en Côte d'Ivoire. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, OMS, Fonds Français MUSKOKA.

CDC, 2020. Centers for Disease Control and Prevention (en ligne), page "Malaria", mise à jour en novembre 2020, accessible à : <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>.

Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodei D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics (Logiciel MSConvert). Accessible à : <http://proteowizard.sourceforge.net/tools.shtml> .

Chidiebere M.E., Omoja V., Ekere S.O., Uchendu C., 2015. Effects of ethanolic fruit extract of Picralima nitida (Stapf) on fertility of pregnant rats. Comparative Clinical Pathology, 2015, 24, 269-273.

Chong J., Wishart D.S., Xia J., 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis . Current Protocols in Bioinformatics 68, n° 1 (2019): 1-128. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>.

Conférence des parties à la convention sur la diversité biologique- Accords de Nagoya. Dixième réunion ; Nagoya, Japon, 18–29 octobre 2010. UNEP/CBD/COP/10/27 pp 187 – 375.

Coulibaly, B., Kouassi K.C., Kroa E., Konaté I., Kouassi K.E., Djaman A.J., 2018. Evaluation de la qualité microbiologique des médicaments traditionnels améliorés (MTA) vendus dans six communes d'Abidjan (Côte d'Ivoire). European Scientific Journal. May 2018 édition Vol.14, N°15 ISSN : 1857-7881 (Print)e-ISSN 1857-7431.

Cycle parasitaire du Plasmodium. https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Cycle_parasitaire, consulté le 26/09/2019.

Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T., 2019. Cytoscape : A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. accessible à <https://cytoscape.org/>.

Décret n°2016-24 du 27 Janvier 2016 portant code d'éthique et de déontologie des praticiens de médecine et de pharmacopée traditionnelle.

Dénou A., Koudouvo K., Togola A., Haïdara M., Dembélé S.M. , Ballo F.N. , Sanogo R. , Diallo D., Gbeassor M., 2017. Savoir traditionnel sur les plantes antipaludiques à propriétés analgésiques, utilisées dans le district de Bamako (Mali). Journal of Applied Biosciences, 2017.112 :10985-10995.

Dewick P.M., 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd edn., Wiley, 2009.

DGCCRF, page web consacrée aux compléments alimentaires : ; consulté en mai 2021, accessible à : <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/s%C3%A9curit%C3%A9/produits-alimentaires/complements-alimentaires#0>.

Diaby, B., Kroa E., Niaré A., Coulibaly D., Traoré Y., Giani S., Coulibaly A., Niaré B., Guindo A. Keita M.T., Sylla A.O., Sanogo R., Douumbo O.K., 2011. Connaissances, attitudes et pratiques des tradipraticiens de la santé de la ville d'Abidjan sur le paludisme. *Mali Médical* 2011. TOME XXVI N°3. 8-12.

Dictionnaire of Natural Products, CRC Press, version 29, 2020. Accessible à :
<https://dnp.chemnetbase.com/>.

Direction de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires de Côte d'Ivoire (DPML), 2010. Modalités de déclaration des unités artisanales de fabrication de produits de santé. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, Côte d'Ivoire.

Direction de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires de Côte d'Ivoire (DPML), 2010. Modalités d'enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, Côte d'Ivoire.

Direction de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires de Côte d'Ivoire (DPML), 2010. Modalités d'enregistrement des produits de santé issus des unités artisanales de fabrication. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, Côte d'Ivoire.

Direction de la Pharmacie, du Médicament et des Laboratoires de Côte d'Ivoire (DPML), 2010. Formulaire de demande d'une autorisation de commercialisation. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, Côte d'Ivoire.

Dro B., Soro D., Koné M.W., Bakayoko A., Kamanzi K., 2013. Evaluation de l'abondance de plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle dans le Nord de la Côte d'Ivoire. *Journal of Animal and Plant Sciences*, Vol.17, Issue 3: 2631-2646.

Duwiejua M., E. Woode E., Obiri D.D., 2002. Pseudo-akuammigine, an alkaloid from *Picralima nitida* seeds, has anti-inflammatory and analgesic actions in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, n° 1 (2002): 73-79. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00058-2).

Empower PDA Software. Getting started guide. WATERS CORPORATION, 34 Maple Street Milford, MA 01757, WAT053020TP, Revision 1,2002.

Enquête de prévalence parasitaire du paludisme et de l'anémie, 2016. Institut National de la Statistique (INS), Ministère du plan et du développement (MPD) ; Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique (MSHP), Abidjan, Côte d'Ivoire ; The DHS Program, ICF, Rockville, Maryland, USA, Décembre 20163.

Erharuyi O., Falodun A., Langer P., 2014. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Picralima nitida* (Apocynaceae) in tropical diseases: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60182-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60182-0).

European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2006. Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for starting Materials of Herbal origin. EMA, Londres, 2006, Doc. Ref. EMEA/HMPC/246816/2005 ; accessible à :
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-good-agricultural-collection-practice-gacp-starting-materials-herbal-origin_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011. Guideline on bioanalytical method validation, 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2, 21 July 2011

European Medicines Agency (EMEA) / Herbal Medicinal Products Committee, 2006. Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for Starting Materials of Herbal Origin. Emea, February, 1–11.

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). *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 4, n° 3 (2004): 37-45.
https://doi.org/10.1300/J157v04n03_04.

FAO / OMS – normes alimentaires internationales
<http://www.fao.org/3/y5307f/y5307f01.htm#TopOfPage> ; consulté en mai 2021.

Fox Ramos A.E. et al., 2017. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *Journal of Natural Products* 80, n° 4 (2017): 1007-14.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01013>.

Fox Ramos A.E., Le Pogam P., Charlotte Alcover C., Otogo N'Nang E., Cauchie G., Hazni H., et al., 2019. Collected tandem mass spectrometry data on monoterpane indole alkaloids from natural product chemistry research. *Scientific Data*, 2019, 6(1),15. DOI: 10.1038/s41597-019-0028-3.

François G., Ake A. L., Holenz J., Bringmann G., 1996. Constituents of *Picralima nitida* display pronounced inhibitory activities against asexual erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 54, n° 2-3 (1996): 113-17. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01456-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01456-0).

GAO Yuan, ZHOU Dong-Sheng, KONG Ling-Mei, HAI Ping, LI Yan, WANG Fei, LIU Ji-Kai, 2012. Rauvotetraphyllines A–E, new indole alkaloids from *Rauvolfia tetraphylla*. *Natural Products and Bioprospective*, 2012, 2, 65–69. DOI 10.1007/s13659-012-0012-5.

Gasquet, M., 1993. Evaluation in vitro and in vivo of traditional antimalarial « Malaria 5 ». *Fitoterapia*, Volume LXIV, N°5.

Ghisleni D.D.M., Braga De Souza M., Kikuchi I.S., Brasoveanu M., Nemtanu M.R., Dua K., Pinto A.T., 2016. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, 22, 4624-87.

Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS). Site internet disponible à :
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>.

Hamet R., 1951. Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le " *Picralima nitida* " (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale*, 1951, 31(347-348), 465-485.

Höfle G., Heinstein P., J. Stöckigt J., Zenk M.H., 1980. 'H-NMR Analysis of Ajmalicine-Type Alkaloids of the 3α Series. *Planta medica ; Journal of Medicinal Plant Research*, 1980, Vol. 40, pp. 120-126, O HippokratesVerlag GmbH.

Houghton P.J., Howes M.-J., Lee C.C., Steventon G., 2007. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 110(3), 391-400.

Igboasoiyi, A. C., Essien, E. E., Eseyin, O. A., Ubam, G. 2007. Screening of the seed of *Picralima nitida* for hypoglycaemic activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, n° 5 (2007): 828-30.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.828.830>.

Institut National de la Statistique (INS), Ministère du plan et du développement (MPD) ; Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique (MSHP), Abidjan, Côte d'Ivoire, 2016. Enquête de prévalence parasitaire du paludisme et de l'anémie.

International Union for the Conservation of Nature, 2020.

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01811789.1989.10826950> (consulté en mars 2020).

International Union for the Conservation of Nature (IUCN), Red List, 2021. site web, accessible à : <https://www.iucnredlist.org/search> (consultation mai 2021). Recherche sur carte : polygone encadrant la Côte d'Ivoire, dont enclaves de pays voisins ; pour le pays : 128 plantes recensées, dont les mêmes 6 espèces en danger important.

Inya-Agha S.I., Ezea S.C., Odukoya O.A., 2006. Evaluation of *Picralima nitida*: Hypoglycaemic activity, toxicity and analytical standards. International Journal of Pharmacology, 2006, 2(5), 576-580.

Iwu M., Klayman D.L., Chase C., Tally J.D., Andersen S.L., 1994. Alkaloids of *Picralima nitida* used for treatment of protozoal disease. United States patent N° 5,290,553, issued 1994.

Iwu M., Klayman D.L., 1992. Evaluation of the in vitro antimalarial activity of *Picralima nitida* extracts. Journal of Ethnopharmacology, 1992 : 133-135. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90012-G).

Kapadia G.K., Angerhofer C.K., Ansa-Asamoah R., 1993. Akuammine : An Antimalarial Indolemonoterpene Alkaloid of *Picralima nitida* Seeds Rhazimine from *Rhazya stricta* : A Dual Inhibitor of Arachidonic Acid Metabolism and Platelet Activating Factor-Induced Platelet Aggregation. *Planta medica*, 59, n° 88 (1993): 0-1.

Katajamaa M., Miettinen J., Orešič M., 2006. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data, Bioinformatics 2006, 22, 634-636.

Kerharo J., Bouquet A., 1950. Mission d'étude de la pharmacopée indigène en Afrique de l'Ouest Francophone. Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire - Haute-Volta. Office de la recherche scientifique Outre-Mer. Ministère de la France d'Outre-Mer. Editions Vigot Frères, 1950, 301 p.

Kipre O. M'B.R., Silue K.D., Bouabré G.M., Zihiri G.D., Dhaman A.J., 2017. Enquête ethnopharmacologique des plantes antipaludiques dans le département d'Agboville, sud-est de la Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 109: 10618-10629.

Kitajima M., Kogure N., Yamaguchi K., Takayama H., Aimi N., 2003. Structure reinvestigation of gelsemoxonine, a constituent of *Gelsemium elegans*, reveals a novel, azetidine-containing indole alkaloid. *Organic Letters*, 2003, 5, 2075-2078.

Kneifel W., Czech E., Kopp B., 2002. Microbial contamination of medicinal plants-a review. *Planta Medica*, 2002, 68, 5-15.

Knölker H.J., 2016. The alkaloids, Elsevier Science, 2016.

Koffi N.G., Emma A., Stéphane D., 2014. Evaluation of *Picralima nitida* acute toxicity in the mouse. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 2014, 4(3), 18-22.

Komlaga G., Agyare C., Dickson R.A., Mensah M.L.K., Annan K., Loiseau P.M., Champy P., 2002. Ethnobotanical survey of medicinal plants and finished herbal antimalarials in Ashanti region, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 172, 333-346.

Koné P., 2004. La valorisation de la médecine traditionnelle. Edition CEDA, Abidjan, décembre 2004.

Koné W., Kamanzi A., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D., Dosso M., 2004. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93 ; 43–49.

Kouamé K., Witabouna, K. M., 2017. Evaluation des conditions de traitement et de stockage des plantes médicinales sur les marchés du district d'Abidjan . European Scientific Journal, January 2017, Edition vol.13, No.3 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431 P15. DOI: <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n3p396> .

Kouitcheu L.B.M., Penlap V., Kouam J., Bonaventure T., Fomum Z.T., 2006. Evaluation of antidiarrhoeal activity of the fruit-rind of *Picralima nitida* (Apocynaceae). *African Journal of Traditional Complement Alternative Medecin (J. Trad. CAM)*, 3, n° 4 (2006): 66-73.

Kouitcheu L.B.M., Kouam J., Paul A., Etoa F. X., 2008. Phytochemical screening and toxicological profile of methanolic extract of *Picralima nitida* fruit-rind (Apocynaceae). *Toxicological and Environmental Chemistry* 90, n°4 (2008): 815-828. <https://doi.org/10.1080/02772240701747556>.

Kouitcheu L.B.M. et al., 2013. The anti-shigellosis activity of the methanol extract of *Picralima nitida* on *Shigella dysenteriae* type I induced diarrhoea in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13 (2013). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-211> .

Koulibaly, A. Monian M., Ackah J., Kone M.W., Traore K., 2016. Etude ethnobotanique des plantes médicinales : cas des affections les plus fréquentes d'une région agricole Daloa (Centre Ouest, Côte d'Ivoire). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 2016. Vol.31, Issue 2: 5021-5032.

Kroa E., Koulai D.J.J., Doh K.S., Gbogbo M., Morokant M.I., Coulibaly G.S., Anderson C.F.M., et al., 2016. Recensement des médicaments traditionnels dans les centres de médecine traditionnelle dans la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire. *Ethnopharmacologia* , N°55, Avril 2016.

Kumar S., Singh A., Bajpai V., Srivastava M., Singh B.P., 2016. Structural characterization of monoterpane indole alkaloids in ethanolic extracts of *Rauvolfia* species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, n° 6 (2016): 363-73. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.04.008> .

Ledouble, Guy, 1964. Alcaloïdes du *Picralima nitida* Staph, Apocynacées (8e mémoire), Etude des feuilles et des racines. Isolement de deux alcaloïdes nouveaux : la picraphylline et la picracine. Annales pharmaceutiques francaises. Elsevier Masson, 1964.

Lehmann H., 2014. Le médicament à base de plantes en Europe : statut, enregistrement, contrôles. Thèse, Université de Strasbourg, 2014.

Lifongo L.L., Simoben C.V., Ntie-Kang F., Babiaka S.B., Judson P.N., 2014. A Bioactivity Versus Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants from Nigeria, West Africa. *Natural Products and Bioprospecting* 4, n° 1 (2014): 1-19. <https://doi.org/10.1007/s13659-014-0005-7> .

Liu W., Liu, Y., Youyou T., 2016. Significance of winning the 2015 Prize in Physiology or Medecine. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016 ; 6(1) :1-2.

Loi N 2015-536 du 20 juillet 2015 relative à l'exercice et à l'organisation de la médecine et de la pharmacopée traditionnelles.

Loumpangou N.C., Tsiba G., 2016. Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant activity of the polar extracts *Picralima nitida* Staph. (Apocynaceae) family ». ~ 198 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5, n° 4 (2016): 198-204. ISSN : 2349-8234.

Lounasmaa M., KAN S.K., 1979. A 400 MHz 1H NMR study of the eight basic heteroyohimbine alkaloids. *Tetrahedron*, 36, pp. 160-161

Louppe D., Brink M., Cobbinah J.R., Chauvet M., Siemonsma J.S., 2008. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(1) :Bois d'oeuvre 1. Vol. 7. 1, 2008.

Madeira L., Galante P.A.F., Budu A., Azevedo M.F., Malnic B., Garcia C.R.S., 2008. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS ONE* 3, n° 3 (2008). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001889>.

Manouan, N., N'Guessan B.B., Kroa E., Tiembré I., 2010. Identification des acteurs de la médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire : cas du District Autonome d'Abidjan. *Ethnopharmacologia*, N°46, 75-80. Décembre 2010.

Mbegbu C.E., Omoja V.U., Ekere O.S., Okoye C.N, Uchendu C.N., 2014. Effects of ethanolic extract of picralima fruit on fertility of pregnant rate. *Comparative Clinical Pathology* 24, n° 2 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1888-8>.

Munyangi J., Cornet-Vernet L., Idumbo M., Lu C., Lutgen P., Perrones C., Ngombe N., Bianga J., et al., 2019. Artemisia annua and Artemisia afra tea infusions vs. artesunate-amodiaquine (ASAQ) in treating Plasmodium falciparum malaria in a large scale, double blind, randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 2019, 57, 49-56.

Munyangi J., Cornet-Vernet L., Idumbo M., Lu C., Lutgen P., Perrones C., Ngombe N., et al., 2020. Retraction notice to Artemisia annua and Artemisia afra tea infusions vs. artesunate-amodiaquine (ASAQ) in treating Plasmodium falciparum malaria in a large scale, double blind, randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 2020, 78, 78:153304.

Nazar N., Goyder D.J., Clarkson J.J., Mahmood T., Chase M.W., 2013. The taxonomy and systematics of Apocynaceae: Where we stand in 2012. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2013, 171(3), 482-490.

Newman D.J., Cragg G.M., 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 2020, 83(3):770-803.

Ngaïssona P., Nkounkou Loumpangou C., Fa N., Koane J.-N., Gouollaly Tsiba, Syssa-Magalé J., Ouamba J., 2016. Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant activity of the polar extracts Picralima nitida Stapf. (Apocynaceae) family. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2016, 5(4), 198-204.

N'Guessan, K., 2008. Plantes médicinales et pratiques médicinales traditionnelles chez les peuples Abbey et Krobou du département d'Agboville (Côte d'Ivoire). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Cocody, Abidjan, 335 p.

N'Guessan K., Tra Bi F.H., Koné M.W., 2009. Étude ethnopharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle chez les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte d'Ivoire). *Ethnopharmacologia*, n°44, p 42-50.

Nnamdi S., Uju Dibua M.E., Ikpa T.F., 2015. Screening of fruit pulp extracts of Picralima nitida against in vitro cultures of Plasmodium falciparum and acute oral toxicity in white albino mice. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2015, 9(1), 430-437.

Noedl H., Se Y., Schaecher K., Smith B.L., Socheat D., Fukuda M.M., 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359:2619–2620.

Nonclercq, M., 1989. Du quinquina à la quinine. In : Revues d'Histoire de la pharmacie, 77ème année, n°281-282, 1989. Bicentenaire de la naissance de Joseph Pelletier (1788-1842) et 75ème anniversaire de la fondation de la société d'histoire de la Pharmacie. P.215.

Normile D., 2015. Nobel for antimalarial drug highlights East-West divide. Science Mag. 16 Oct 2015: Vol. 350, Issue 6258, pp. 265. DOI: 10.1126/science.350.6258.265.

Nwabor O. F., Dibua U.M.-E., Nnamonu, E.I., Odiachi O., Dickson I. Okoro O.J, 2014. Pulp extracts of Picralima nitida: a larvicidal agent in malaria vector control. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 4, n° 8 (2014): 69-73.

Nwankwo N.E., Nwodo O.F.C., Ekwueme F.N., Chime J.O., Amalunweze A.E., 2015. In Vitro study on the effect of treatment with Picralima nitida seed extract on haemozoin formation in Plasmodium berghei Infected Mice. International Journal of Scientific and Engineering Research 6, n° 6 (2015): 1000-1008.

Nwankwo N.E., 2017. Effect of seed extract of Picralima nitida on haematological parameters of malaria-infected albino mice and its interference with the serum electrolyte levels. Ife Journal of Science, 19, n° 2 (2017): 379. <https://doi.org/10.4314/ijss.v19i2.18> .

O'Connor S.E., Maresh J.J., 2006. Chemistry and biology of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. Natural Products Report, 2006, 23, 532-547.

Okokon J.E., Antia B.S., Igboasoiyi A.C., Essien E.E., Mbagwu H.O.C., 2007. Evaluation of antiplasmodial activity of ethanolic seed extract of Picralima nitida. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 111, 464-467.

Okonta J. M., Aguwa C.N., 2007. Evaluation of hypoglycemic activity of glycosides and alkaloids extracts of Picralima nitida (Apocynaceae) seed. International Journal of Pharmacology, Vol. 3. 6, 2007. <https://doi.org/10.3923/ijp.2007.505.509> .

Okunji C.O., Iwu M.M., Ito Y., Smith P.L., 2005. Preparative separation of indole alkaloids from the rind of Picralima nitida (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-zone-refining countercurrent chromatography. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 28, n° 5 (2005): 775-83. <https://doi.org/10.1081/JLC-200048915> .

Olufunsho A., Couliadiy A.G.V., Oluyemi A.G., Sunday A., Omoseyindemi B., Busia K., 2019. Toxicological evaluation of Picralima nitida in rodents. Journal of Ethnopharmacology 236, n° February (2019): 205-19. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.008> .

OMS, 2000. Résolution AFR/RL50/R35, Outils pour l'institutionnalisation de la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé de la région africaine de l'OMS, Ouagadougou.

OMS, 2002. Stratégie pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005, Genève.

OMS, 2003. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. OMS, Genève, 80 p. (ISBN: 92 4 154627 1). [Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. 1-84. OMS].

OMS, 2004. Nouveaux principes directeurs de l'OMS visant à promouvoir l'usage rationnel des médicaments alternatifs. Genève Juin 2004 OMS.

OMS, 2013. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. World Health Organization, Genève, 78p. [ISBN 97892 4150609 0].

OMS, 2015. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization.

OMS, 2018. WHO Malaria World Report 2018. World Health Organization, Genève, 210 p. (accessible à : <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/en/>).

OMS, 2019. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. World Health Organization, Genève, 228 p. [ISBN 978-92-4-151543-6].

OMS, 2020. World malaria report. World Health Organization, Genève, 299 p. (accessible à : <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>).

OMS, 2021. Malaria vaccine implementation programme (site web de l'OMS), consulté en mai 2021 ; accessible à : <https://www.who.int/initiatives/malaria-vaccine-implementation-programme>.

Osuala F.N., Odoh, U.E., 2017. Isolation and characterization of anti- sickling bioactive compounds from seeds of *Picralima nitida* Staph (Apocynaceae). Asian Journal of Pharmaceutical technology and Innovation, 05, n° 23 (2017): 79-85.

Otoo L., Koffuor G., Ansah C., Mensah K., Benneh C., Ben I., 2015. Assessment of an ethanolic seed extract of *Picralima nitida* ((Stapf) Th. and H. Durand) on reproductive hormones and its safety for use. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4, n° 4 (2015): 293.
<https://doi.org/10.5455/jice.20151030085004>.

Ouattara D., 2006. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales significatives utilisées dans la région de Divo (sud forestier de la Côte d'Ivoire) et à la diagnose du poivrier de Guinée : *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae). Thèse de Doctorat, Université de Cocody, Abidjan, 184p.

Perspective monde- Population totale de Côte d'Ivoire.

<http://perspective.usherbrooke.ca/bilan/tend/CIV/fr/SP.POP.TOTL.html>. Consulté le 17042019.

Pharmacopée Européenne, 10e éd., EDQM, Conseil de l'Europe, 2021 : monographies Ph.Eur. 2.6.31 ; 5.1.4 ; 5.1.8.

Pharmacopée Ivoirienne 1ère édition, 2019. Ministère de la santé et de l'hygiène publique, République de Côte d'Ivoire. CNDJ (centre national de documentation juridique) Abidjan, Juillet 2019. 206p., ISBN 978-2-918466-63-4.

Piba S., Tra Bi F.H., Konan D., Bitignon B.G.A., Bakayoko A., 2015. Inventaire et disponibilité des plantes médicinales dans la forêt classée de yapo-abbé, en côte d'ivoire. European Scientific Journal, August 2015, édition vol.11, No.24 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431.

Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 11:395.

Programme National de Développement de l'Activité Pharmaceutique (PNDAP), 2016.

Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), 2019, communiqué.
<http://www.pnlpci.org/index.php/32-news/politics/white-house/79-cote-d-ivoire-plus-de-3-000-cas-de-deces-lies-au-paludisme-en-2017-officiel#> consulté le 26/09/2019.

Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT), République de Côte d'Ivoire. Politique nationale de promotion de la médecine traditionnelle, mars 2014, 36 p. ; rapport accessible à :

<https://www.sante.gouv.ci/userfiles/file/POLITIQUE%20NATIONALE%20DE%20PROMOTION%20DE%20LA%20MT.pdf>

Qu Y., Simonescu R., De Luca V., 2016. Monoterpene indole alkaloids from the fruit of *Tabernaemontana litoralis* and differential alkaloid composition in various fruit components, *Journal of Natural Products*, 2016, 79, 3143-3147.

Raymond-Hamet, 1951. Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le "Picralima nitida" (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale*, 31, n° 347 (1951): 465-85. <https://doi.org/10.3406/jatba.1951.6438>.

Répartition de l'endémie palustre.

https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Répartition_dans_le_monde. Consulté le 17042019.

République de Côte d'Ivoire, 2015. Loi N° 2015-536 du 20 juillet 2015 relative à l'exercice et à l'organisation de la médecine et de la pharmacopée traditionnelles. JOCI Texte n°1500570, accessible à : <https://absch.cbd.int/api/v2013/documents/DA005F73-3324-9F8C-DF78-CCCA1544532E/attachments/Textes%20de%20loi%20Pdf1.pdf>.

République de Côte d'Ivoire, 2016. Décret n°2016-24 du 27 Janvier 2016 portant code d'éthique et de déontologie des praticiens de médecine et de pharmacopée traditionnelle. *Journal Officiel de la République de Côte d'Ivoire*, 2016, 26 février ; accessible à <https://admin.juriafrica.com/lex/décret-2016-24-27-janvier-2016-30130.htm>.

République de Côte d'Ivoire, Ministère de la santé et de la lutte contre le SIDA. Arrêté N° 409/MSP du 28 Décembre 2001 portant création, organisation et fonctionnement du Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle (PNPMT), *Journal officiel de la République de Côte d'Ivoire*, 2007. Cet arrêté a été modifié par les arrêtés n°158 MSHP/CAB du 21 juin 2007 et n° 253/MSHP/CAB du 10 septembre 2007.

République de Côte d'Ivoire, 5e rapport national sur la diversité biologique (mars 2014), 106 p (pas d'ISBN ni d'éditeur mentionné) ; disponible sur le site de la Convention sur la Diversité Biologique, à : <https://www.cbd.int/doc/world/ci/ci-nr-05-fr.pdf>.

Ressources végétales de l'Afrique tropicale : « Picralima nitida » ; site internet ; consulté en mars 2019 ; accessible à : [https://uses.plantnet-project.org/fr/Picralima_nitida_\(PROTA\)](https://uses.plantnet-project.org/fr/Picralima_nitida_(PROTA)).

Salery M., 2007. Activité antipaludique de la Girolline, étude in vitro et in vivo. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 154 p. P4.

Shittu H., Gray A., Furman B., Young L., 2010. Glucose uptake stimulatory effect of akuammicine from *Picralima nitida* (Apocynaceae). *Phytochemistry Letters*, 3, n° 1 (2010): 53-55. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.11.003>.

Schymanski E.L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H.P., Hollender J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environmental Science and Technology*, 2014, 4, 2097-2098.

Simoes-Pires C., Hostettmann K., Haouala A., Cuendet M., Falquet J., Graz B., Christen P., 2014. Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. The example of *Argemone mexicana*. *International Journal of Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 2014, 4(3), 338-346.

Site de la Convention sur la biodiversité : « The Nagoya protocol on access and benefit sharing » ; consulté en mai 2021 ; accessible à : <https://www.cbd.int/abs/>.

Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, 2017. Groupe recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des RPC 2007, consulté en mai 2019, accessible à : <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>.

Solomon I., Ekandem G.J., Oyebadejo S.A, Okon E.A, 2014. Chronic oral consumption of éthanolic extract of *Picralima nitida* (Akuamma) seed induced histopathological changes on the testes of adult wistar rats. International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences, 3, n° 4 (2014): 71-77.

Soro S., Djakalia O., Mathieu E.W., N'guessan K.E., Traore D., 2014. Usages traditionnels de quelques espèces végétales de la forêt marécageuse classée de port Gauthier, en zone côtière au sud-ouest de la Côte d'Ivoire. European Scientific Journal. January 2014 Edition vol.10, No.3 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431. <https://doi.org/10.19044/esj.2014.v10n3p%p>.

Sunmonu T.O., Oloyede O.B., Owolarafe T.A., Yakubu M.T., Dosumu O.O., 2014. Toxicopathological evaluation of *Picralima nitida* seed aqueous extract in Wistar rats. Turkish Journal of Biochemistry, 39, n° 2 (2014): 119-25. <https://doi.org/10.5505/tjb.2014.83997>.

Sylla Y., Silue D.K., Ouattara K., Kone M.W., 2018. Etude ethnobotanique des plantes utilisées contre le paludisme par les tradithérapeutes et herboristes dans le district d'Abidjan (Côte d'Ivoire). International Journal of Biological and Chemical Sciences. 12(3): 1380-1400, June 2018.

SYNADIET, Les compléments alimentaires - Schéma récapitulatif des obligations réglementaires ; consulté en mai 2021, accessible à :

https://www.synadiet.org/sites/default/files/page/files/shemaca80x60_bd.pdf.

Szabó L.F. Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine. Molecules, 2008, 13, 1875-1896.

Tane P., Tene M., Sterner O., 2002. Picranitine, a new indole alkaloid from *Picralima Nitida* (Apocynaceae). Bull. Chem. Soc. Ethiop. 16, n° 2 (2002): 165-68.

Tano K., 2015. Etude de l'activité antiplasmodiale de divers extraits de *Terminalia glaucescens* (Combrétaceae) et de *Erigeron floribundus* (Astéracées). Profil toxicologique en vue de la formulation de médicaments traditionnels améliorés (MTA) antipaludiques. Thèse d'exercice, UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques- SPB, 2015, 198p.

Tela Botanica. <http://www.tela-botanica.org/apd-nn-75604-illustrations>.

Teugwa C.M., Mejato P.C., Zofou D., Tchinda B.T., Boyom F.F., 2013. Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae) ». BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-175>.

The plant list. The Plant List (2010). Version 1. Published on the Internet, 2010. <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

Titanji V.P.K., Zofou D., Ngemenya M.N., 2008. The antimalarial potential of medicinal plants used for the treatment of malaria in Cameroonian folk medicine. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM, 5, n° 3 (2008): 302-21.

Tuo K., 2015. Criblage phytochimique, activité antioxydante et antiplasmodiale in vitro de cinq plantes utilisées traditionnellement en Côte d'Ivoire contre le paludisme. Doctorat d'Université Thèse Unique, Université Félix Houphouët Boigny.

UEMOA, 2010. Règlement N° 06/2010/ CM/ UEMOA relatif aux procédures d'homologation des produits pharmaceutiques à usage humain dans les états membres de l'UEMOA.

UEMOA, 2012. Plan de fabrication pharmaceutique pour l'Afrique. Union africaine. Addis-Abeba, Novembre 2012. 112p.

Vasquez-Ocmín P.G., Gadea A., Cojean S., Martí G., Pomel S., Van Baelen A.-C., et al., 2021. Metabolomic approach of the antiprotozoal activity of medicinal Piper species used in Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 264, 113262.

Vasquez-Ocmín P.G., Gallard J.-F., Baelen A.-C.V., Leblanc K., Cojean S., Mouray E., Grellier P., et al., 2020. Antiplasmodial biodereplication based on highly efficient methods. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11828802.v1>.

Wachsmuth O., Matusch R., 2002. Anhydronium bases from *Rauvolfia serpentina*. *Phytochemistry*, 61 (2002) 705–709.

Wang Chun-Hua, Zhang Yu, Jiang Miao-Miao, 2013. Indole alkaloids from the roots of *Catharanthus roseus*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 49, No. 6, January, 2014.

Wang M.X., Carver J.J., Phelan V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., (...), Dorrestein P.C., Bandeira N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34, n°8 (2016): 828-37. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.

Wharf C. and United Kingdom, 2012. Guideline on bioanalytical method validation . Table of contents, 44, n° July 2011 (2012): 1-23.

Willcox, M., 2011. Improved Traditional Phytotherapies in Current Use for the Clinical Treatment of Malaria. *Planta medica*, 2011; 77: 662–671. DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1250548> © Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart · New York ·ISSN 0032-0943.

Wosu L., IBE C.C., 1989. Use of extracts of *Picralima nitida* bark in the treatment of experimental trypanosomiasis: a preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology*, 25, n° 3 (1989): 263-68. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90032-9).

Yapi, AB., 2013. Inventaire des plantes médicinales de la famille des Asteraceae des marchés de la commune d'Abobo (Abidjan, Côte d'Ivoire). Mémoire de Master II de botanique, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, 50p.

Yessoufou A., Gbenou J., Grissa O., Hichami A., Simonin A.M., Tabka Z., et al., 2013. Anti-hyperglycemic effects of three medicinal plants in diabetic pregnancy: Modulation of T cell proliferation ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, n° December (2013). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-77>.

Zirihi GN., 2006. Etude botanique, pharmacologique et phytochimique de quelques plantes antipaludiques et/ou immunogènes utilisées chez les Bétés du département d'Issia dans l'Ouest de la Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Cocody, Abidjan, 126 p.

Annexes

Annexe 1 : Modalités d'enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments, Côte d'Ivoire (DPML, 2010)

MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DIRECTION DE LA PHARMACIE
ET DU MEDICAMENT

MODALITES ENREGISTREMENT DES MEDICAMENTS ISSUS DE LA PHARMACOPEE TRADITIONNELLE ET DES PHYTO-MEDICAMENTS

Les médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments, quelles que soient leurs origines, ne peuvent être débités, importés, mis en vente ou vendus en République de Côte d'Ivoire, qu'après avoir été enregistrés au Ministère de la Santé Publique, dans les conditions résumées ci-dessous.

A-PERSONNES AUTORISEES

- Praticiens de la médecine traditionnelle agréés
- Tout établissement légalement constitué.
- Agence de représentation et de promotion de produits parapharmaceutiques

B-CONDITIONS D'ENREGISTREMENT

Un dossier complet de demande d'autorisation de commercialisation des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des phyto-médicaments comprend:

A- Une lettre de demande d'autorisation de commercialisation, en trois (03) exemplaires adressée au Ministre en charge de la Santé, sous le couvert de la Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM). Cette lettre de demande, rédigée en français, est nécessaire pour chaque forme galénique, chaque formule et pour chaque dosage. Elle mentionne:

- a) La nature de la demande;
- b) Les noms et adresses du titulaire de l'autorisation de commercialisation dans le pays d'origine, du (des) fabricant(s), et du demandeur
- c) Le nom commercial du produit, le dosage, la forme et la présentation;
- d) Les indications principales;
- e) Le prix grossiste hors taxe en francs CFA dans le pays d'origine et en Côte d'Ivoire;

NB : Toute demande d'autorisation de commercialisation doit être accompagnée d'un formulaire dûment rempli. La date de dépôt de la demande correspond à la date de réception du dossier complet

Page : 1/3

52, Bd de Marseille, BP V 5 ABIDJAN (COTE D'IVOIRE) Tél. : (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

B- Un résumé des caractéristiques du produit fini (RCP) ou fiche signalétique, rédigé en français avec toutes les mentions légales requises.

C- Un dossier administratif comprenant:

- a) Une présentation de la structure de production;
- b) Une copie de l'agrément de l'unité de fabrication délivré par les autorités compétentes du pays d'origine;
- c) Une copie de l'Autorisation de commercialisation ou certificat de libre vente dans le pays d'origine (cas de produits importés);
- d) La structure de prix telle que libellée:
 - Le prix départ usine ou le Prix Fournisseur Hors Taxe (PFHT) en francs CFA
 - Le prix Fournisseur Hors Taxe (PFHT) en Francs CFA proposé pour l'enregistrement;
 - Le prix de vente au public en francs CFA dans le pays d'origine et en Côte d'Ivoire;
- e) Un rapport d'évidence ethno-médical délivré par une autorité sanitaire et fait sur une période d'au moins quatre (4) mois (cas des médicaments de la catégorie 2);
- f) Une copie des protocoles d'accord, notamment une convention de partenariat entre le producteur et un institut de recherche selon les lignes directrices de l'OMS pour l'étude clinique des médicaments traditionnels (spécifiquement pour les médicaments de la catégorie 3).

D- Un dossier pharmaceutique donnant des renseignements sur:

- a) Matières premières:
 - Les monographies complètes des plantes utilisées;
 - La composition qualitative et quantitative des différents constituants du médicament sous forme de tableau;
 - Une brève description des substances actives;
 - Toutes documentations scientifiques sur la composition du produit autres que celles ci-dessus listées;
 - Les procédés d'obtention et de contrôle des matières premières;
 - Le certificat d'analyse de lot de chaque constituant;
- b) Les Procédés de fabrication
 - la formule y compris les excipients;
 - le mode et les étapes de fabrication;
 - les procédés de contrôle de conformité garantissant la qualité constante du produit aux différents stades de la fabrication;
 - un certificat de Bonne Pratique de Fabrication (BPF) délivré par les autorités compétentes du pays d'origine en date de validité ou un rapport d'expertise pour les nouvelles structures.
- c) Produit fini:
 - les résultats des essais de stabilité;
 - la durée de conservation;
 - Les précisions sur les attributs microbiologiques et organoleptiques;
 - Le certificat d'analyse de lot du produit soumis à l'enregistrement;

E- Un dossier toxico-clinique comprenant:

- Un rapport d'expertise attestant la longue expérience d'utilisation du médicament dans sa forme actuelle ou dans sa forme traditionnelle (au minimum 20 ans) ;
- Une bibliographie aussi exhaustive que possible (publications, thèses, mémoires, etc.) des essais de toxicité déjà réalisés sur les plantes utilisées ou sur les espèces voisines appartenant à la même famille.

NB :

- Cas des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des Phyto-médicaments de la catégorie 3:
 - Les données de pharmacodynamie;
 - Les résultats des essais de toxicité aiguë et subchronique;
 - Une autorisation des essais cliniques délivrée par un comité national d'éthique;
 - Protocole d'essai clinique suivant les méthodes standards (Phase I et II);
 - Les résultats;
 - Un rapport d'expertise sur les essais réalisés;
 - Une étude clinique;
 - Une revue de la littérature.
- Cas particulier des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des Phyto-médicaments importés: fournir en plus du certificat d'analyse de lot du pays d'origine, un bulletin d'analyse du lot soumis à enregistrement délivrée par le Laboratoire National de la Santé Publique (LNSP).

F- Quinze (15) exemplaires (par forme, par présentation, par formule et par dosage) du modèle destiné à la vente au public accompagné du projet de notice.

G- Redevance D'homologation

- **Cinquante mille (50000) FCFA** par produit, par formule, par dosage et par présentation pour l'enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des Phyto-médicaments fabriqués localement.
- **Cent (100000) FCFA** par produit, par formule, par dosage et par présentation pour l'enregistrement des médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle et des Phyto-médicaments importés ou reconditionnés.

NB: Tous les documents de cette demande doivent être en français et présentés dans un coffret ou dans un classeur portant mention de la dénomination du produit,

Néanmoins, les dossiers en anglais peuvent être acceptés à condition que le résumé des caractéristiques soit en français.

Fournis en deux (02) exemplaires ces documents dont une version papier et une version électronique (CD-ROM).

Page : 3/3

52, Bd de Marseille, BP V 5 ABIDJAN (COTE D'IVOIRE) Tél. : (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

Annexe 2 : Modalités de déclaration des unités artisanales de fabrication de produits de santé, Côte d'Ivoire (DPML, 2010)

MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DIRECTION DE LA PHARMACIE
ET DU MEDICAMENT

MODALITES DE DECLARATION DES UNITES ARTISANALES DE FABRICATION DE PRODUITS DE SANTE

A-PERSONNES AUTORISEES

Toute personne légalement autorisée à faire l'activité.

B- DOSSIERS ADMINISTRATIFS RELATIFS A L'UNITE

Une lettre de déclaration adressée au Ministre en charge de la Santé sous le couvert du Directeur de la Pharmacie et du Médicament. Cette lettre doit indiquer :

- a) La nature de la demande ou l'objet de l'activité (préciser):
 - la fabrication et la promotion des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle.
 - la fabrication, le reconditionnement et la promotion de Compléments nutritionnels, produits diététiques, produits de régime.
- b) La dénomination sociale de l'exploitant (statuts notifiés et/ou une copie du registre du commerce)
- c) Le plan détaillé des locaux précisant l'adresse géographique,
- d) Le nom, la fonction et la ou les qualifications professionnelle(s) de la ou des personne(s) physique(s) responsable(s) de la fabrication, du conditionnement, des contrôles de qualité des produits, de la détention et de la surveillance des stocks de matières et des produits finis.
- e) La liste des produits fabriqués, des équipements et une note explicative relative à leur utilisation;

Page : 1/2

52, Bd de Marseille, BP V 5 ABIDJAN |COTE D'IVOIRE| Tél. : (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

C- DOSSIERS RELATIFS DU RESPONSABLE DE L'UNITE

- 1- Une fiche d'état civil datée de moins de (1) an ;
- 2- Un extrait de casier judiciaire daté de moins de trois (3) mois ;
- 3- Un certificat de nationalité daté de moins de (1) an ;
- 4- Un curriculum vitae daté, signé conforme et sincère
- 5- Une copie certifiée conforme du ou des diplômes obtenus si possible.

D- DOSSIERS RELATIFS AU RESPONSABLE QUALITE : Pharmacien, médecin, Chimiste, biologiste, qualiticien (BTS chimie ou contrôle de qualité) ou toute autre personne qualifiée dans le domaine d'activité)

- 1- Une fiche d'état civil datée de moins de (1) an;
- 2- Un extrait de casier judiciaire daté de moins de trois (3) mois ;
- 3- Un certificat de nationalité daté de moins de un (1) an ;
- 4- Un curriculum vitae daté, signé conforme et sincère ;
- 5- Une copie certifiée conforme du ou des diplômes obtenus ;
- 6- Une copie du contrat de travail liant le responsable qualité des activités à l'unité;
- 7- Une inscription à l'Ordre National des corps pour les professionnels de la santé.

E- FRAIS DE DOSSIER

La déclaration est accompagnée d'un frais de dossier d'un montant de Cinquante mille (**50 000 FCFA**)

NB: Une visite de conformité des locaux sera organisée après réception complète du dossier.

Un fichier de suivi des échantillons sera tenu à jour et vérifiable à tout moment par les inspecteurs de la DPM.

Un contrôle inopiné de l'entreprise sera effectué par les inspecteurs de la DPM après obtention de la déclaration.



Page : 2/2

52, Bd de Marseille, BP V 5 ABIDJAN (COTE D'IVOIRE) Tél. : (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

Annexe 3 : Modalités d'enregistrement des produits de santé issus des unités artisanales de fabrication, Côte d'Ivoire (DPML, 2010)

MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DIRECTION DE LA PHARMACIE
ET DU MEDICAMENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL

MODALITES ENREGISTREMENT DES PRODUITS DE SANTE ISSUS DES UNITES ARTISANALES DE FABRICATION

A-PERSONNES AUTORISEES

Toute personne légalement autorisée à faire l'activité.

B-CONDITIONS D'ENREGISTREMENT

Le dossier complet de demande d'autorisation de commercialisation des produits de santé des unités artisanales de fabrication comprend:

1. **Une lettre de demande d'autorisation de commercialisation**, en trois (03) exemplaires adressée au Ministre en charge de la Santé, sous le couvert de la Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM). Cette lettre de demande, rédigée en français, est nécessaire pour chaque forme galénique, chaque formule et pour chaque dosage. Elle mentionne:
 - a. La nature de la demande (enregistrement ou renouvellement);
 - b. Le nom et l'adresse du titulaire de l'autorisation de commercialisation du demandeur;
 - c. Le nom commercial du produit, le dosage, la forme et la présentation;
 - d. Les indications principales;
 - e. Le prix grossiste hors taxe en francs CFA en Côte d'Ivoire;
2. **Un résumé des caractéristiques du produit fini** (RCP) ou fiche signalétique, rédigé en français avec toutes les mentions légales requises.
3. **Un dossier administratif** comprenant:
 - a) Une copie de la déclaration de l'unité de fabrication délivrée par la Direction de la Pharmacie et du Médicament;
 - d) La structure de prix telle que libellée:
 - Le prix Fournisseur Hors Taxe (PFHT) en Francs CFA proposé pour l'enregistrement;
 - Le prix de vente au public en francs CFA en Côte d'Ivoire.

Page : 1/2

52, Bd de Marseille, BP V.5 ABIDJAN (COTE D'IVOIRE) Tél. : (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

4. Le dossier pharmaceutique, chimique, biologique et toxicologique du produit

comportant:

- a) La composition qualitative et quantitative des constituants sous forme de tableau;
- b) L'origine des matières premières;
- c) Les procédés d'obtention et de contrôle des matières premières;
- d) La méthode de fabrication, conformément aux bonnes pratiques de fabrication;
- e) l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine du produit fini
- f) Le certificat d'analyse de lot de chaque constituant;
- g) Le certificat d'analyse de lot du produit délivré par le Laboratoire National de la Santé Publique (LNSP)
- h) les résultats des essais de stabilité et de toxicité;
- i) la durée de conservation;
- j) Toutes documentations scientifiques sur la composition et les propriétés du produit.

5. Dix (10) exemplaires (par forme, par présentation, par formule et par dosage) du modèle destiné à la vente au public accompagné du projet de notice.

C-REDEVANCE D'HOMOLGATION

Cinquante mille (50.000) FCFA par produit, par formule, par dosage et par présentation pour l'enregistrement des produits de santé issus des unités artisanales..

D-DISPOSITIONS PARTICULIERES

- 1 - Tous les documents de cette demande doivent être en français, reliés, paginés et présentés dans un coffret ou un classeur.
- 2- fournir en deux (02) exemplaires dont une version papier et une version électronique (CD-ROM).

NB : Ces modalités d'enregistrement ne concernent pas les médicaments sous toutes ses formes (Spécialités pharmaceutiques, Phytomédicaments, Médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle).



Page : 2/2

52, Bd de Marseille, BP V 5 ABIDJAN (COTE D'IVOIRE) Tél.: (225) 21 35 73/13-23 ; Fax : (225) 21 35 69 58

Annexe 4 : Formulaire de demande d'une autorisation de commercialisation (AC),
Côte d'Ivoire (DPML, 2010)



MINISTERE DE LA SANTE ET
DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA



REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union – Discipline – Travail

FORMULAIRE DE DEMANDE D'UNE AUTORISATION DE COMMERCIALISATION (AC)

*A joindre à toute soumission de dossier dans le cadre d'une demande d'autorisation de commercialisation
(Une fiche par catégorie, par dosage, forme et présentation)*

- Médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle,
- Phyto-médicaments,
- Compléments alimentaires ou nutritionnels
- Produits diététiques
- Produits de régime
- Lait et farines infantiles
- Produits cosmétiques
- Produits d'hygiène corporelle

I- IDENTIFICATION DU DEMANDEUR

1- LABORATOIRE TITULAIRE

Nom :

Adresse sociale complète :

Tél :

Fax :

E-mail :

Pays d'origine du Laboratoire :

2- SITE DE FABRICATION

Nom :

Adresse sociale complète :

3- AGENCE OU SOCIETE DE REPRESENTATION / MAISON DE LIAISON

Nom :

Adresse sociale complète :

Tel :

Nom du gérant :

Nom du responsable qualité :

N° de l'agrément d'exploitation : Validité :

II- IDENTIFICATION DU PRODUIT:

Nom du produit :

Page 1 sur 2

Forme pharmaceutique :
Dosage
Présentation/ Conditionnement :
Classe thérapeutique:
Prix de vente proposé à l'enregistrement :
Composition des substances actives : (*joindre un tableau en annexe*)

III- TYPE DE DEMANDE D'AUTORISATION DE COMMERCIALISATION

Cocher la case correspondante

- Nouvelle demande d'AC
 Renouvellement AC
 Variation:
Préciser

IV- CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS MEDICAUX FOURNIS

Nombre d'échantillons
Date de péremption.....
Numéro de lot.....
Numéro du certificat d'analyse de lot du produit dans le pays d'origine:
Numéro du certificat d'analyse de lot du produit délivré par le Laboratoire National de Santé Publique (LNSP):.....

V- PIECES REGLEMENTAIRES QUI ACCOMPAGNENT LE PRODUIT

- 1- Une lettre de demande sur papier en-tête (en trois exemplaires)
- 2- Dossier administratif
- 3- Dossier technique
- 4- Dossier d'expertise toxicologique et pharmacologique
- 5- Le résumé des caractéristiques du produit fini accompagné du projet définitif de conditionnement et de notice et/ou du prospectus

VI- COUT DU PRODUIT

Prix Grossiste Hors Taxe (PGHT) du produit :

VII- PAIEMENT DES REDEVANCES :

CHEQUE :
ESPECE :

Dossier soumis par :

Déposé auprès de: Date.....

Signature :

N° d'enregistrement DPM:

Page 2 sur 2

Annexe 5 : Recommandations de l'OMS sur les bonnes pratiques relatives aux plantes médicinales (OMS, 2002)

Bonnes pratiques	Recommandations de l'OMS
Récolte	<ul style="list-style-type: none"> • Faire la récolte pendant la saison ou la période appropriée de façon à assurer que les matières premières comme les produits finis seront de la meilleure qualité possible. • Les plantes médicinales ne doivent pas être récoltées dans des zones où des quantités importantes de pesticides sont utilisées, où des dépôts d'ordures et d'autres contaminants sont trouvés, ni le long des routes. • Les parties de la plante qui ne sont pas utiles et les impuretés doivent être enlevées. • Les matières végétales médicinales brutes récoltées ne doivent pas être posées directement sur le sol. • Les matières récoltées seront mises dans des paniers propres, des sacs en toile ou autres récipients bien aérés. • Les matières végétales médicinales brutes doivent être soumises à un prétraitemen approprié. • Les matières récoltées devront être protégées contre les insectes, rongeurs, oiseaux et autres êtres nuisibles et être hors de portée du bétail et des animaux domestiques. • Les différentes espèces ou parties de plantes devront être rassemblées séparément et transportées dans des récipients distincts. • La contamination croisée doit être évitée en tout temps.
Personnel	<ul style="list-style-type: none"> • Formation théorique et pratique officielle dans le domaine des plantes. • Les personnes présentant des plaies ouvertes, des inflammations cutanées ou des maladies de peau seront temporairement exclues du travail ou priées de porter un vêtement protecteur et des gants jusqu'à guérison complète. • Les personnes souffrant de maladies transmissibles par voie aérienne ou alimentaire, comme la dysenterie et la diarrhée, seront temporairement exclues du travail. • Les personnes manipulant les matières végétales médicinales devront observer un niveau élevé de propreté personnelle et si nécessaire porter un vêtement protecteur et des gants, une coiffe et des chaussures. • Les membres du personnel devront toujours se laver les mains au début des opérations de manipulation. • Une interdiction de fumer et de manger dans les zones de manipulation des plantes médicinales. • Les personnes manipulant les matières végétales médicinales devront éviter tout comportement qui pourrait entraîner une contamination, comme cracher, éternuer ou tousser au-dessus de matières non protégées. • Les effets personnels tels que bijoux, montres ou autres accessoires ne devront pas être portés dans les zones de manipulation des matières végétales médicinales s'ils présentent des risques pour l'innocuité ou la qualité des produits.
	<ul style="list-style-type: none"> • Les installations de vente devront de préférence être situées dans un endroit exempt d'odeurs désagréables, de fumées, de poussières ou

Installations	<p>d'autres contaminants, et se trouver en zone non inondable.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les bâtiments devront être de construction solide et bien entretenus. • Tous les matériaux de construction doivent être tels qu'ils ne puissent contaminer les matières végétales médicinales par des substances indésirables. • Toute l'installation devra disposer d'un éclairage suffisant, naturel ou artificiel. • Une ventilation adéquate doit être assurée pour éviter toute chaleur excessive, condensation de vapeur d'eau et poussière et pour évacuer l'air vicié. • Des installations doivent être prévues pour le stockage des déchets et des matières inutilisables avant leur évacuation.
Transport	<ul style="list-style-type: none"> • Les transports utilisés pour les matières végétales médicinales du site de production au site de stockage devront être nettoyés entre chaque chargement. • Les conteneurs utilisés pour le transport, doivent être propres et le cas échéant bien ventilés afin d'éliminer l'humidité et d'empêcher la condensation. • Les matières premières végétales doivent être transportées et stockées séparément ou d'une façon telle que leur intégrité soit préservée.
Conditionnement	<ul style="list-style-type: none"> • Les matières végétales médicinales devront être conditionnées dans des boîtes, sacs ou autres contenants propres et secs. • Les matériaux de conditionnement devront être non polluants, propres, secs et en bon état. • Les matières végétales médicinales fragiles devront être conditionnées dans des récipients rigides. • Les matériaux de conditionnement réutilisables tels que sacs de jute ou de toile devront être convenablement nettoyés (désinfectés) et séchés avant d'être réutilisés, de façon à éviter toute contamination par le contenu précédent. • Tous les matériaux de conditionnement devront être stockés dans un lieu propre et sec, à l'abri des ravageurs et hors de portée du bétail, des animaux domestiques et autres sources de contamination. • L'étiquette du conditionnement devra clairement indiquer le nom scientifique de la plante médicinale, la partie de la plante, le lieu d'origine de récolte, la date de récolte à l'état sauvage et le nom du récolteur, ainsi que des informations sur les quantités. • Les matières végétales médicinales fraîches devront être stockées à basse température, de préférence à 2-8 °C ; les produits congelés devront être stockés à une température inférieure à -20 °C. • Toutes les opérations de fumigation, les fumigants utilisés et les dates des traitements devront être documentés.
Documentation	<ul style="list-style-type: none"> • Tous les processus et modes opératoires intervenant dans la production des matières végétales médicinales, et leurs dates d'exécution, devront être documentés.

Annexe 6 : Activités antiplasmodiales *in vitro* rapportées pour les plantes relevées lors de l'enquête sur le marché d'Adjame

Tableau 37 : Activités antiplasmodiales décrites dans la littérature pour les espèces recensées

Famille	Espèce	Partie utilisée	Mode de préparation	$IC_{50}<5\mu\text{g/mL}$ * $IC_{50}<1\mu\text{g/mL}$ **	Solvant d'extraction; activité antiplasmodiale IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) et souche plasmodiale testée	Références
Apocynaceae	<i>Alstonia boonei</i> De Wild.	f, t, r	Décoction	>5	Pentane : 13 (FcM29) Ethanol : 27 (Nigerian CQ-S) Ethanol : > 50(K1) Ethanol : 12,3 (FcB1)	Menan <i>et al.</i> , 2006 Zirihi <i>et al.</i> , 2005 Zirihi <i>et al.</i> , 2010
	<i>Picralima nititda</i> (Stapf) T.Durand & H.Durand	f, ec, fr		**	Akuammicine (molécule isolée, active)	Kodjovi A., 2017
	<i>Periploca nigrescens</i> Afzel.			*		
Bixaceae	<i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.f. ex Planch.	f	Décoction	>5	Ethanol (K1)	K. Kamanzi A., 2003
Cannabaceae	<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	f	Décoction	>5	Hexane : 4,159(K1); 18,16 (NF54) Acétate d'éthyle : 1,99 (K1); 2,29 (NF54) Méthanol : 6,79(K1); 25,65(NF54)	Abiodun <i>et al.</i> , 2011
Combretaceae	<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel	t, f	Décoction, Infusion	**	Eau : 0,79 $\mu\text{g/mL}$ (FcB1)	Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1999
	<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	f	Décoction	*	Méthanol : 2,6 $\mu\text{g/mL}$ (FcB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004, Vonthon Senecheau <i>et al.</i> , 2003
	<i>Combretum molle</i> R.Br. ex G.Don			>5	Ethanol (K1)	K. Kamanzi A., 2003
Compositeae/		t, f	Décoction,	**	Eau : 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (FcB1)	Benoit-Vical <i>et al.</i> ,

Asteraceae	<i>Vernonia colorata</i> (Willd.) Drake		Pétrissage		Eau : 9,38 µg/mL (F32) Ethanol : 10 µg/mL (FcM29) CH ₂ Cl ₂ /Méthanol (1:1) : 1,1 µg/mL (D10)	1996 ; Addae Kyereme <i>et al.</i> , 2001 Menan <i>et al.</i> 2006 Cailean <i>et al.</i> , 2004
	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile	t, f	Décoction	>5	Dichlorométhane : 80 µg/mL (Dd2) Acétate d'éthyle : 10 µg/mL (Dd2) Ether de pétrole : 200 µg/mL (Dd2) Ethanol : 340 µg/mL (Dd2)	Madureira <i>et al.</i> , 2002
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	f	Décoction, Macération, Pétrissage	>5	Ethanol : 23 (Nigerian CQ-S), Ethanol: 16 (FcM29 CQ-R)	Menan <i>et al.</i> , 2006
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> L.			>5	Ethanol (K1)	K. Kamanzi A., 2003
Hypericaceae	<i>Vismia guineensis</i> (L.) Choisy			**	Extraits divers	Gallé J.B., 2015
Leguminosae	<i>Cassia sieberiana</i> DC.	f	Décoction	**	Cassiarine	Kodjovi A., 2017
Poaceae	<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad	f, t, r	Décoction	*	Ethanol 80 % : 4,7 (GHA: <i>P.falciparum</i> souche Ghanéenne)	Valdés <i>et al.</i> , 2010
Rubiaceae	<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) Kuntze	t, r	Décoction	*	Chloroforme : 4,3 µg/mL (W2) Chloroforme : 4,8 µg/mL (3D7)	Traore-Keita <i>et al.</i> , 2000
Rubiaceae	<i>Sarcocephalus latifolius</i> (Sm.) E.A.Bruce (anc. <i>Nauclea latifolia</i> Sm.)	f, ec, r	Décoction, Macération, Pétrissage, Infusion	**	Pentane : 80 µg/mL (Nigerian CQ-S) Pentane : 15 µg/mL (FcM29 CQ-R) Eau : 0,6 µg/mL (FcB1) Eau : 0,7 µg/mL (Nigerian) Ethanol : 7,3 µg/mL (FcB1)	Menan <i>et al.</i> , 2006 ; Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1998 Zirihi <i>et al.</i> , 2010;
Sapindaceae	<i>Paullinia pinnata</i> L.	f, t	Décoction	>5	Méthanol : >20 µg/mL (FCB1) Chlorure de méthylène: 18,5(FCB1) Alcaloides : 14,1 µg/mL (FCB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004

f: feuilles; t: tiges; r: racines ; ec : écorce ; fr : fruit ; CI₅₀ : concentration inhibitrice 50 %

Annexe 7 : Travaux personnels : planches d'herbier

Les plantes mises en herbiers au cours de ce travail (échantillons identifiés avec le centre de floristique d'Abidjan, espèces mentionnées lors des enquêtes ethnobotaniques) sont les suivantes :

- 1- *Adenia lobata* (Jacq.) Engl. (PASSIFLORACEAE)
- 2- *Aframomum cereum* (Hook.f.) K.Schum. (ZINGIBERACEAE) ; Synonyme : *Aframomum spectrum* (Oliv. & D.Hanb.) K.Schum.
- 3- *Alstonia boonei* De Wild. (APOCYNACEAE)
- 4- *Azadirachta indica* A.Juss. (MELIACEAE)
- 5- *Bambusa vulgaris* Schrad. (POACEAE)
- 6- *Boerhavia diffusa* L. (NYCTAGINACEAE)
- 7- *Senna alata* (L.) Roxb. (LEGUMINOSAE) ; Synonyme : *Cassia alata* L.
- 8- *Senna occidentalis* (L.) Link (LEGUMINOSAE) ; Synonyme : *Cassia occidentalis* L.
- 9- *Dialium dinklagei* Harms (LEGUMINOSAE)
- 10- *Ficus exasperata* Vahl (MORACEAE)
- 11- *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (HYPERICACEAE)
- 12- *Hoslundia opposita* Vahl (LAMIACEAE)
- 13- *Mangifera indica* L. (ANACARDIACEAE)
- 14- *Mikania cordata* (Burm.f.) B.L. Rob. (COMPOSITAE)
- 15- *Momordica charantia* L. (CUCURBITACEAE)
- 16- *Moringa oleifera* Lam. (MORINGACEAE)
- 17- *Newbouldia laevis* (P.Beauv.) Seem. (BIGONIACEAE)
- 18- *Parkia biglobosa* (Jacq.) G.Don (LEGUMINOSAE)
- 19- *Periploca nigrescens* Afzel. (APOCYNACEAE) ; Synonyme : *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock
- 20- *Passiflora foetida* L. (PASSIFLORACEAE)
- 21- *Paulinia pinnata* L. (SAPINDACEAE)
- 22- *Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H.Durand (APOCYNACEAE)
- 23- *Sarcocephallus esculentus* (Sm.) E.A.Bruce (RUBIACEAE)
- 24- *Sida acuta* Burm.f. (MALVACEAE)
- 25- *Tectonia grandis* L.f. (LAMIACEAE)
- 26- *Trema orientalis* (L.) Blume (CANNABACEAE) Synonyme : *Trema guineensis*
- 27- *Vernonia amygdalina* Delile (COMPOSITAE)
- 28- *Gymnanthemum coloratum* (Willd.) H.Rob. & B.Kahn (COMPOSITAE) ; Synonyme usuel : *Vernonia colorata* (Willd.) Drake

Annexe 8 : Chromatogrammes obtenus par UHPLC-UV-MS/MS pour les décoctés de pulpe, de péricarpes et de graines des différents lots de *P. nitida*

$\lambda = 254$ et 280 nm ; conditions chromatographiques : voir parties correspondantes (chapitre 3, partie 4 ; Matériel et méthodes – chapitre 3, partie 5).

Extraits étudiés : décoctés des 3 drogues végétales pour les lots suivants :

Fruits mûrs : L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9

Fruits de maturité moyenne : L1, L2, L3, L4, L5, L6

Fruits immatures L3, L4, L5

Les ions observés sont présentés dans les parties 4.2.5 et 4.2.6.

A. Pulpes

Les pics **9-1** et **9-2** ne sont pas alcaloïdiques (voir chapitre 3, partie 2).

Figure 63 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits mûrs (extraits LX-APC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9

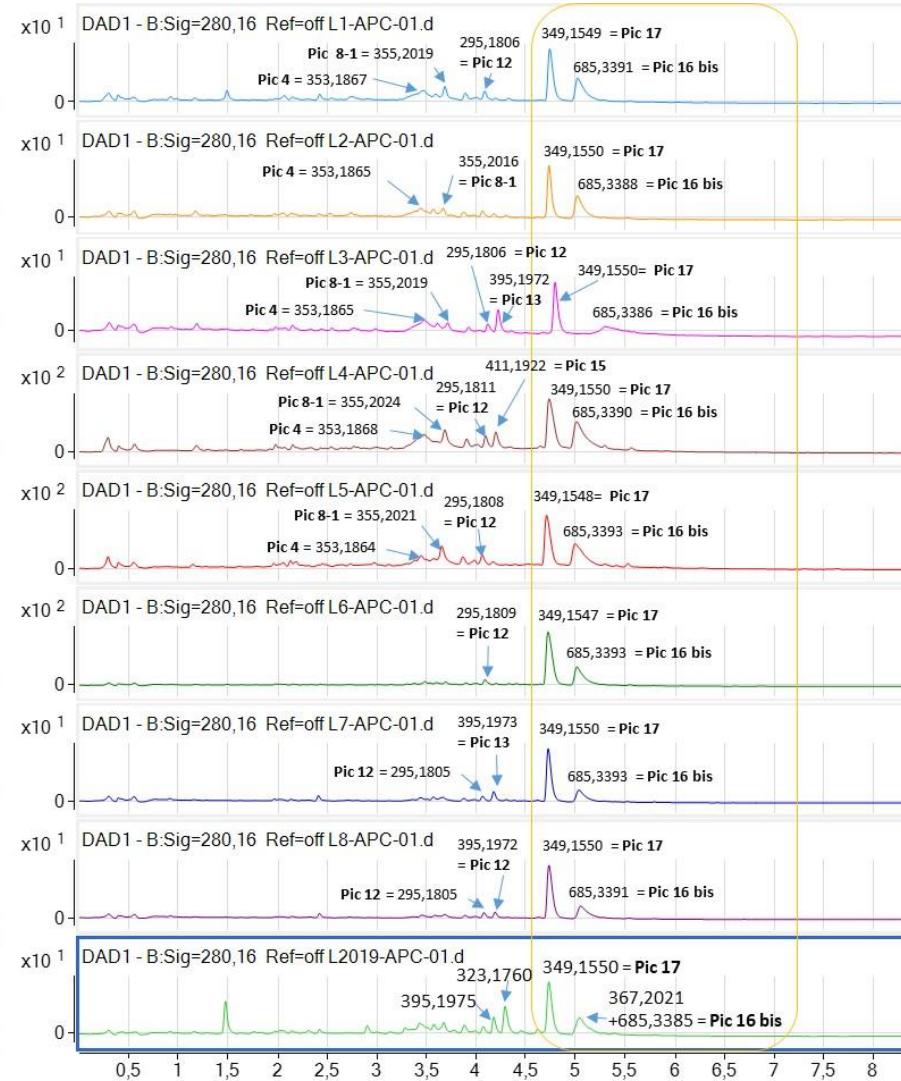
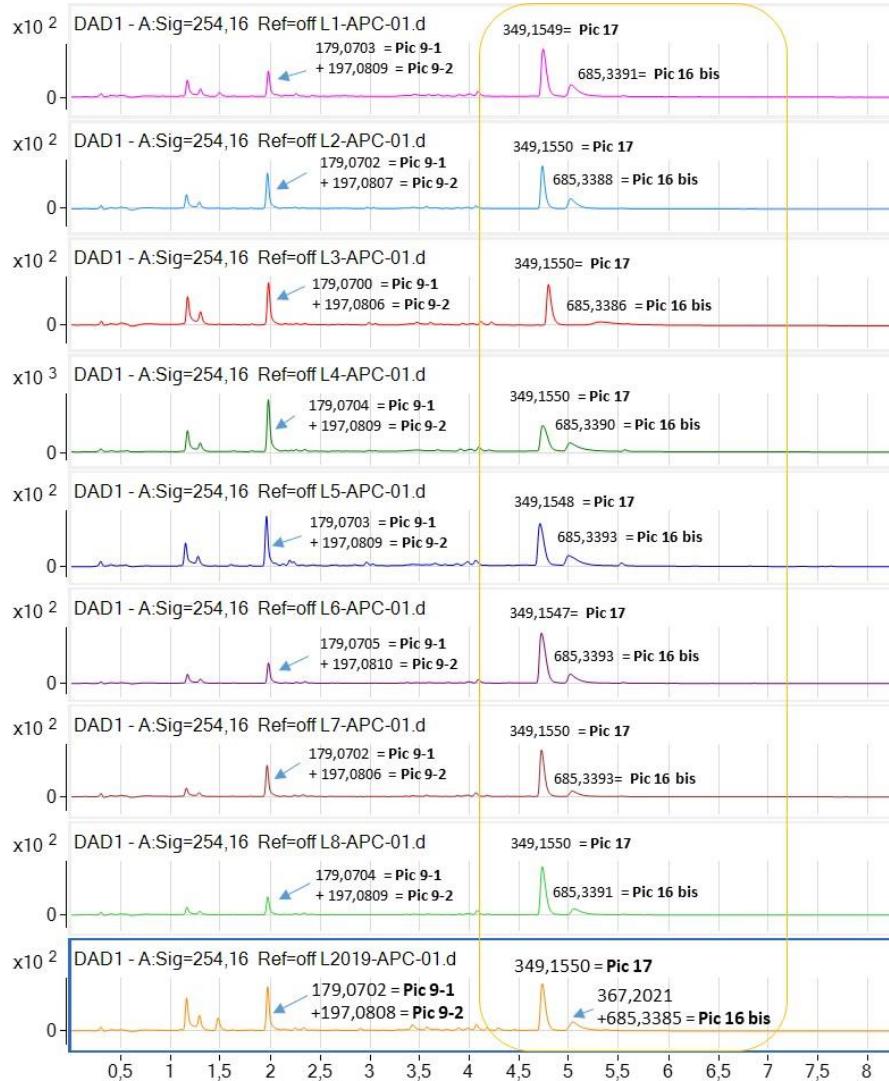


Figure 64 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits immatures (extraits LX-BPC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6

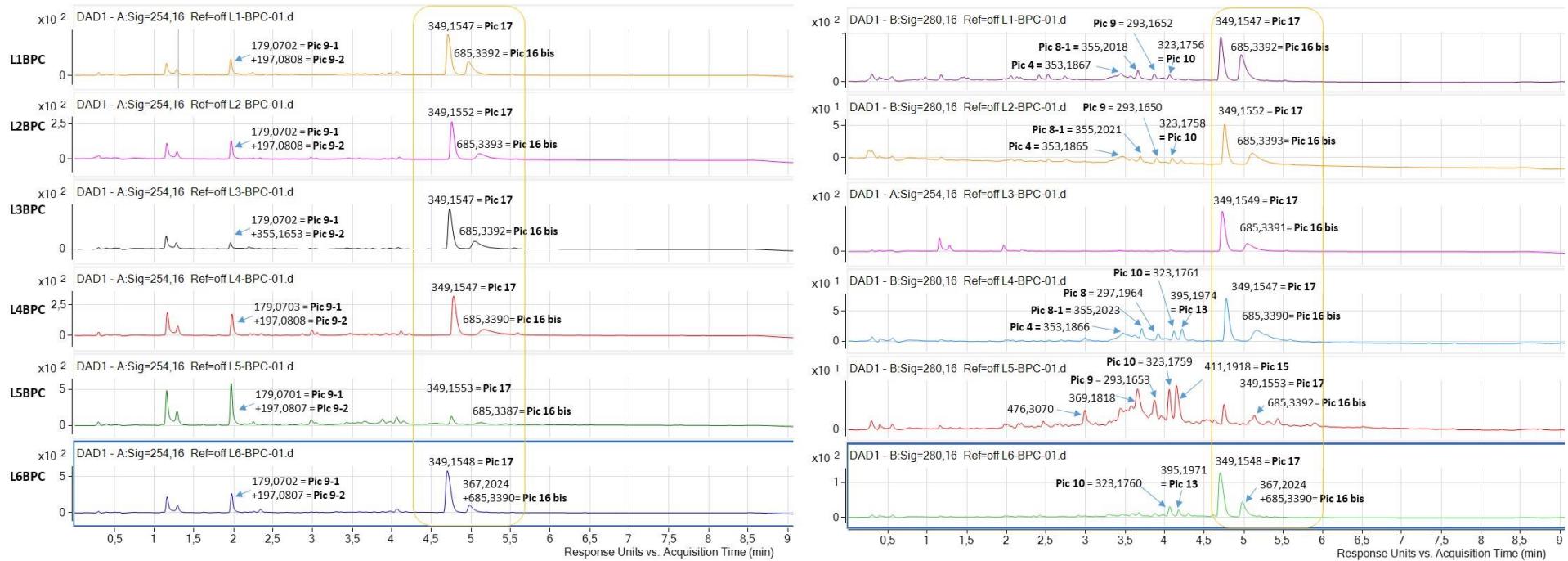
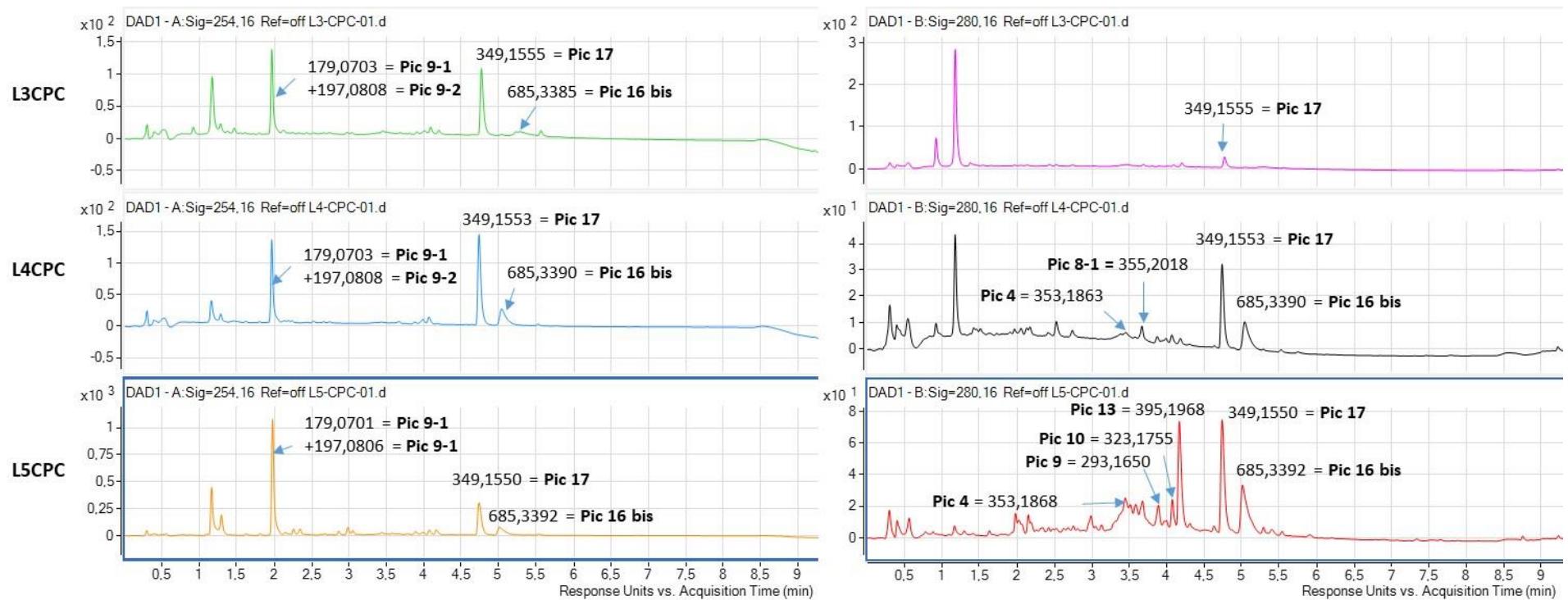


Figure 65 : Chromatogrammes UHPLC-UV : pulpe de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CPC)

Lots : L3, L4, L5



B. Péricarpes

Figure 66 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits mûrs (extraits LX-AEC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9

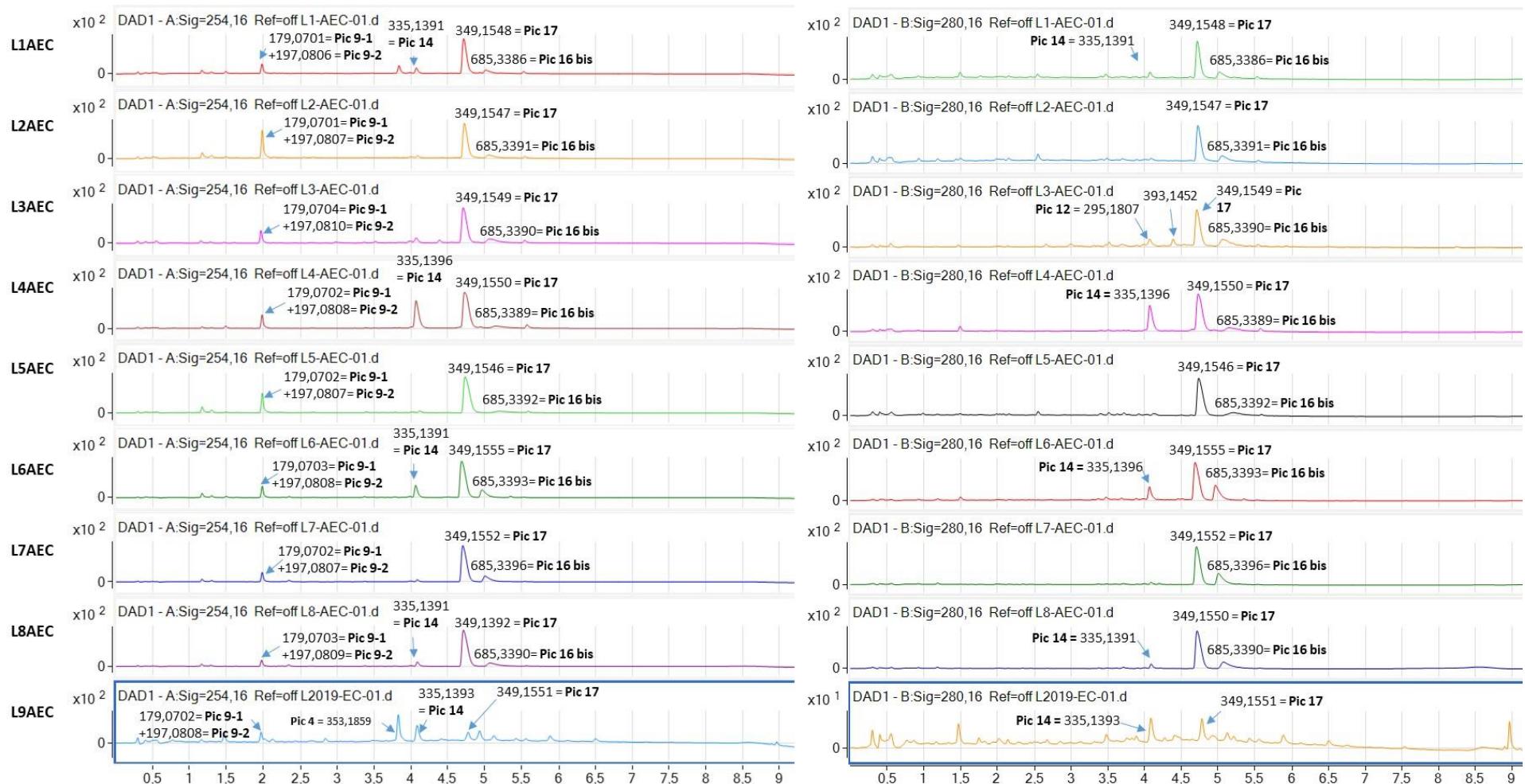


Figure 67 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits immatures (extraits LX-BEC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6

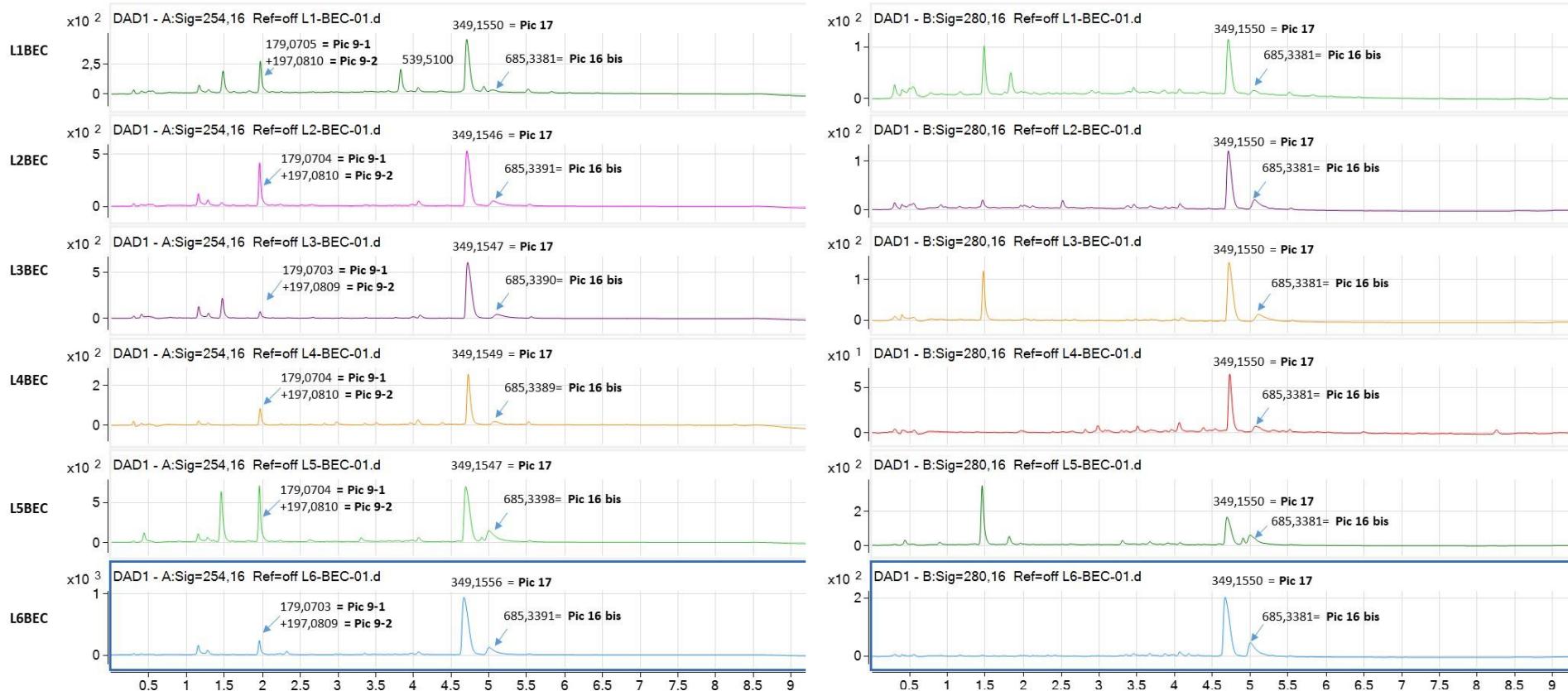
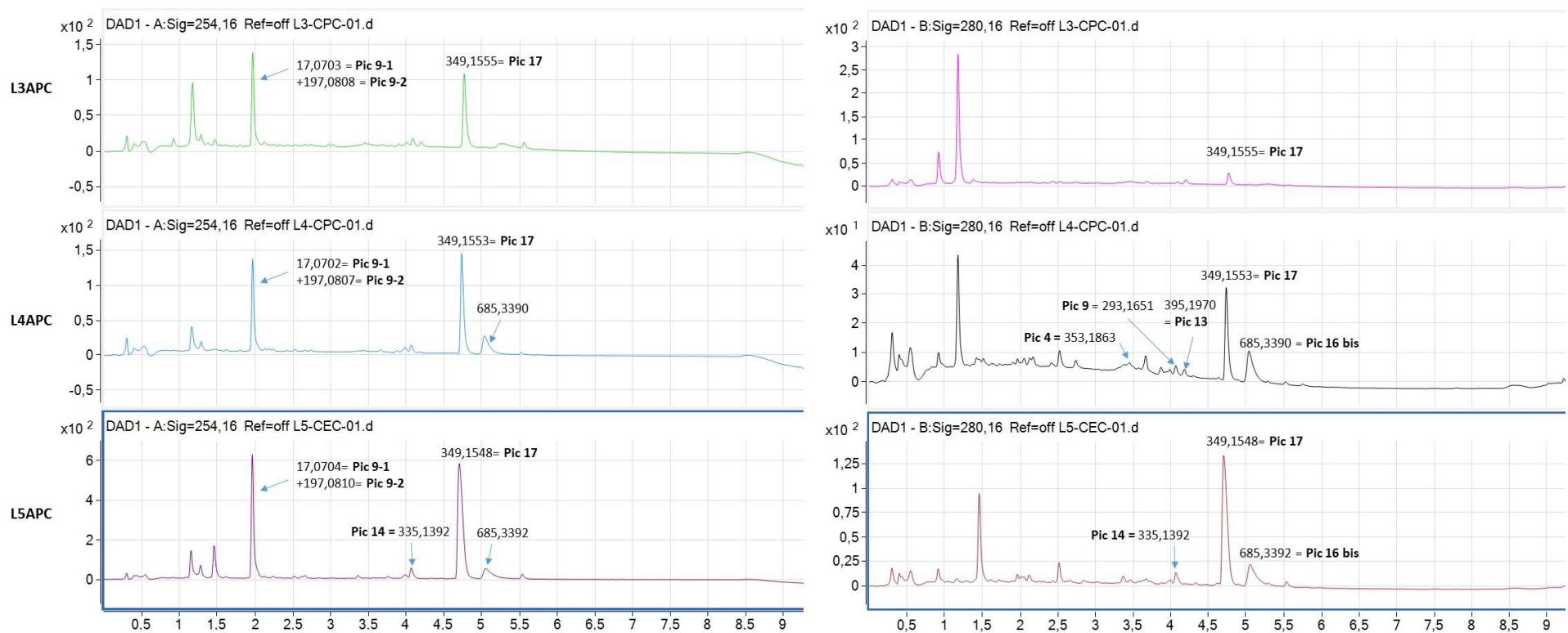


Figure 68 : Chromatogrammes UHPLC-UV : péricarpes de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CEC)

Lots : L3, L4, L5



C. Graines

Figure 69 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits mûrs (extraits LX-AGC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9

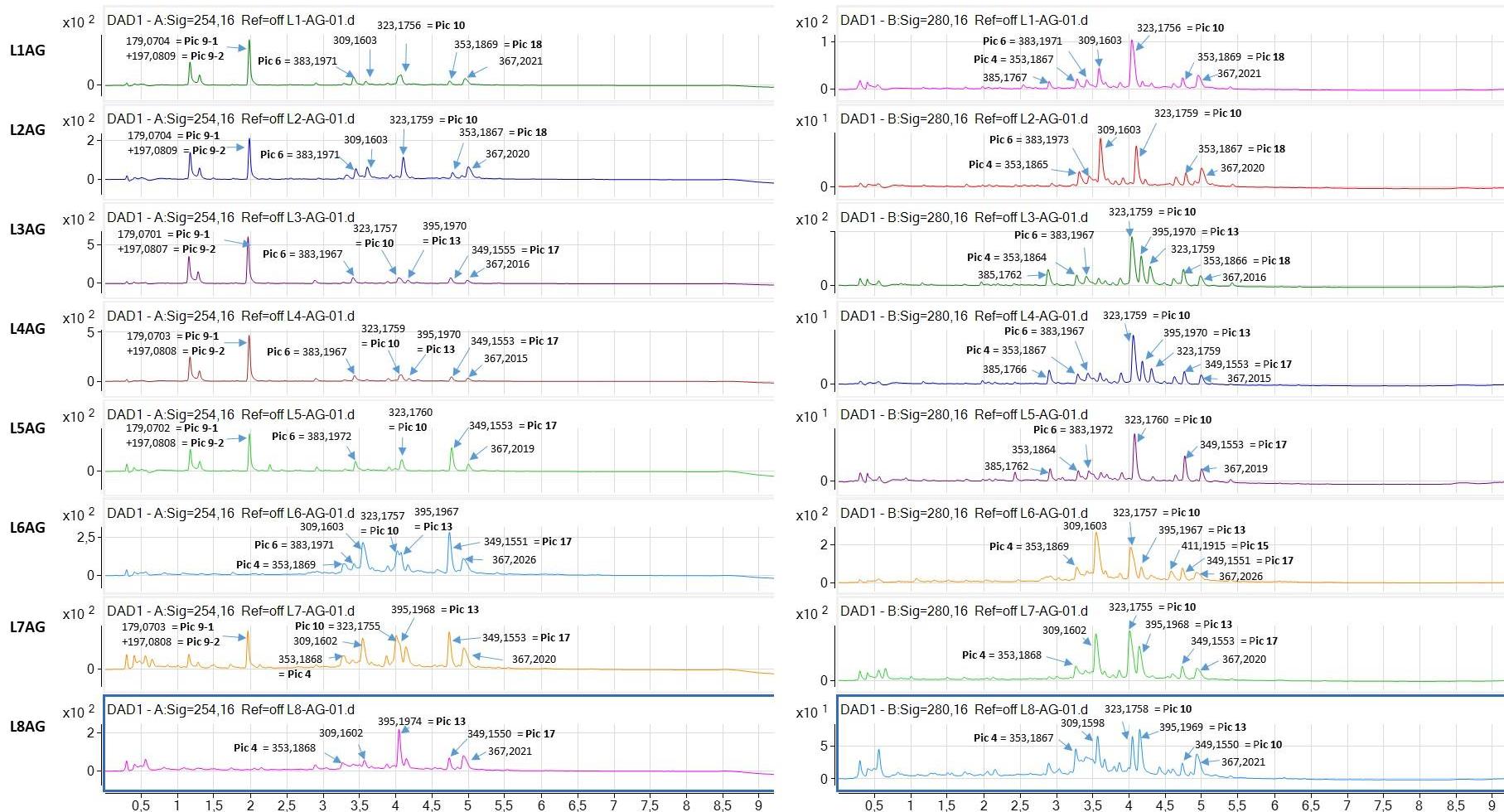


Figure 70 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits immatures (extraits LX-BGC)

Lots : L1, L2, L3, L4, L5, L6

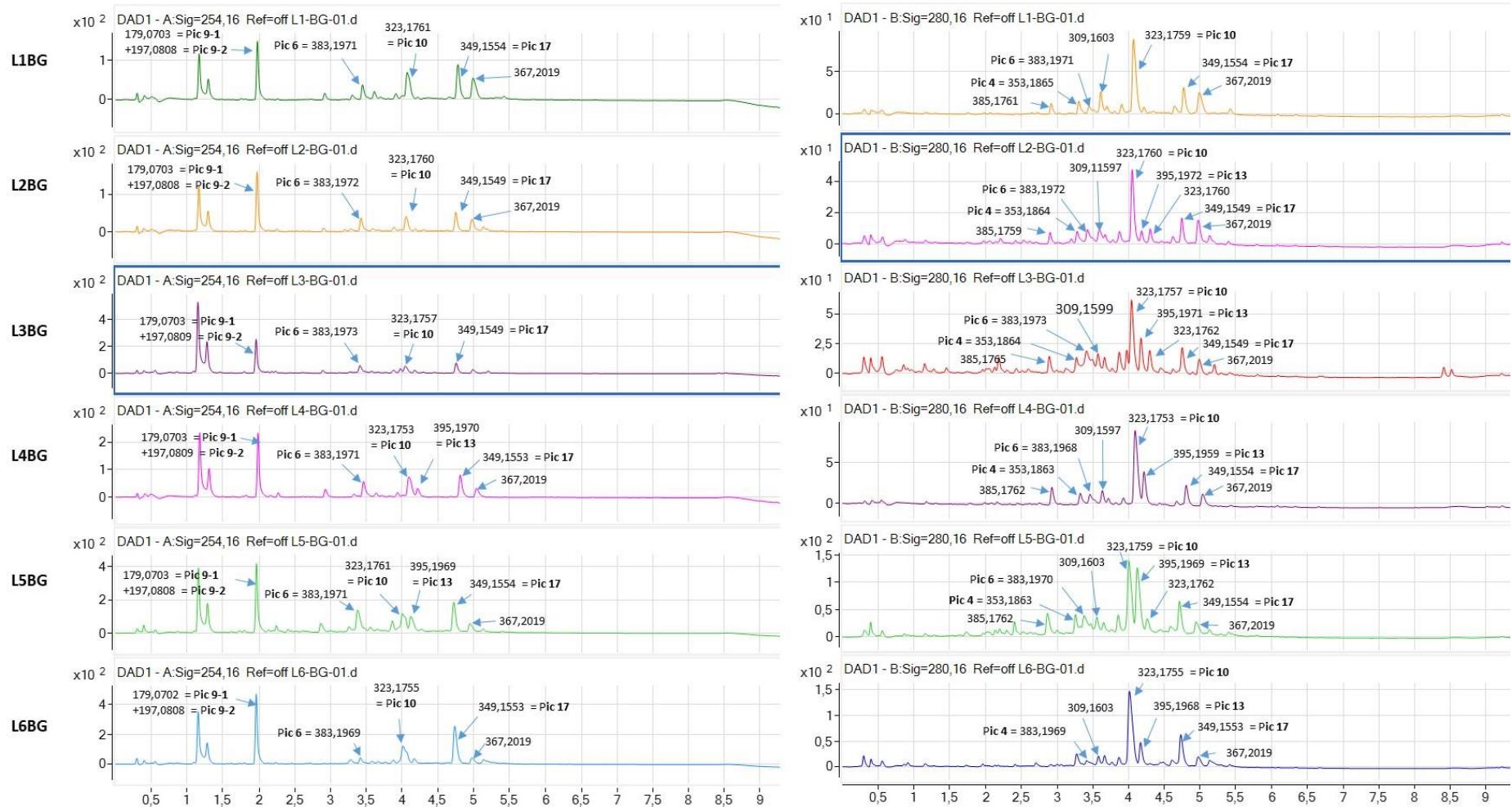
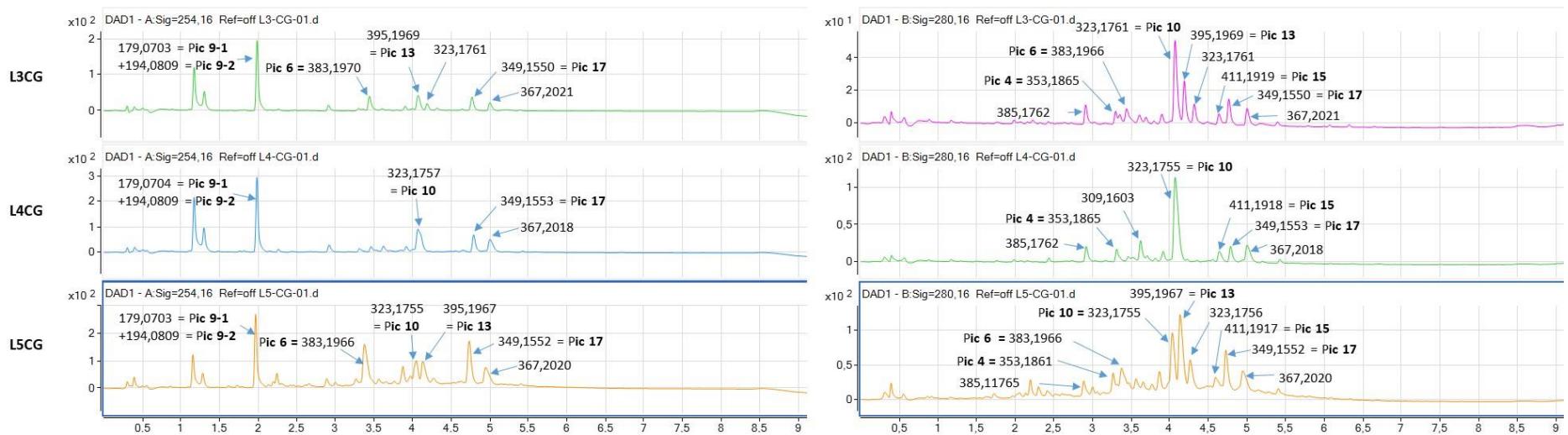


Figure 71 : Chromatogrammes UHPLC-UV : graines de fruits de maturité moyenne (extraits LX-CGC)

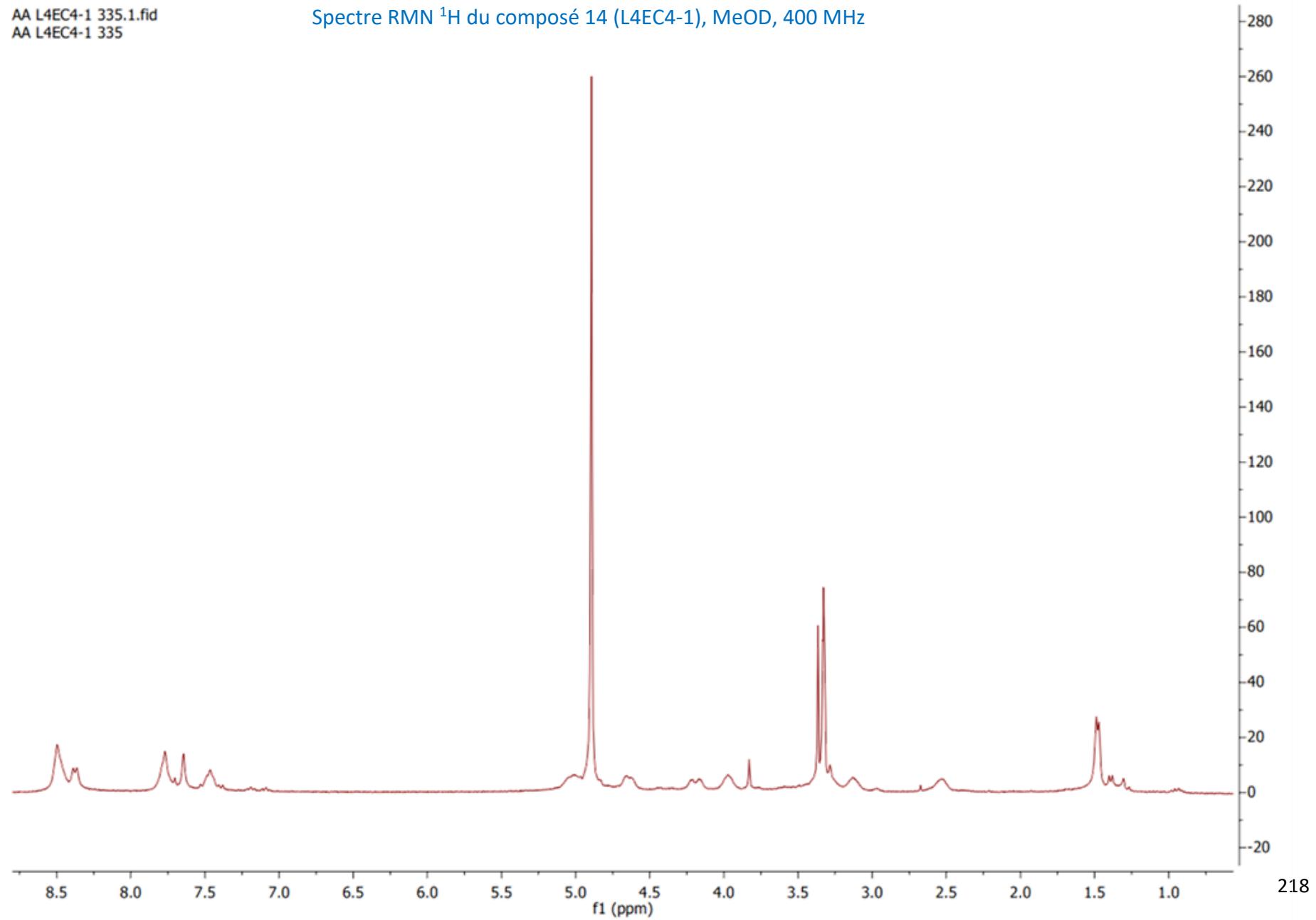
Lots : L3, L4, L5, L6



Annexe 9 : Spectres RMN des composés 14 et 17

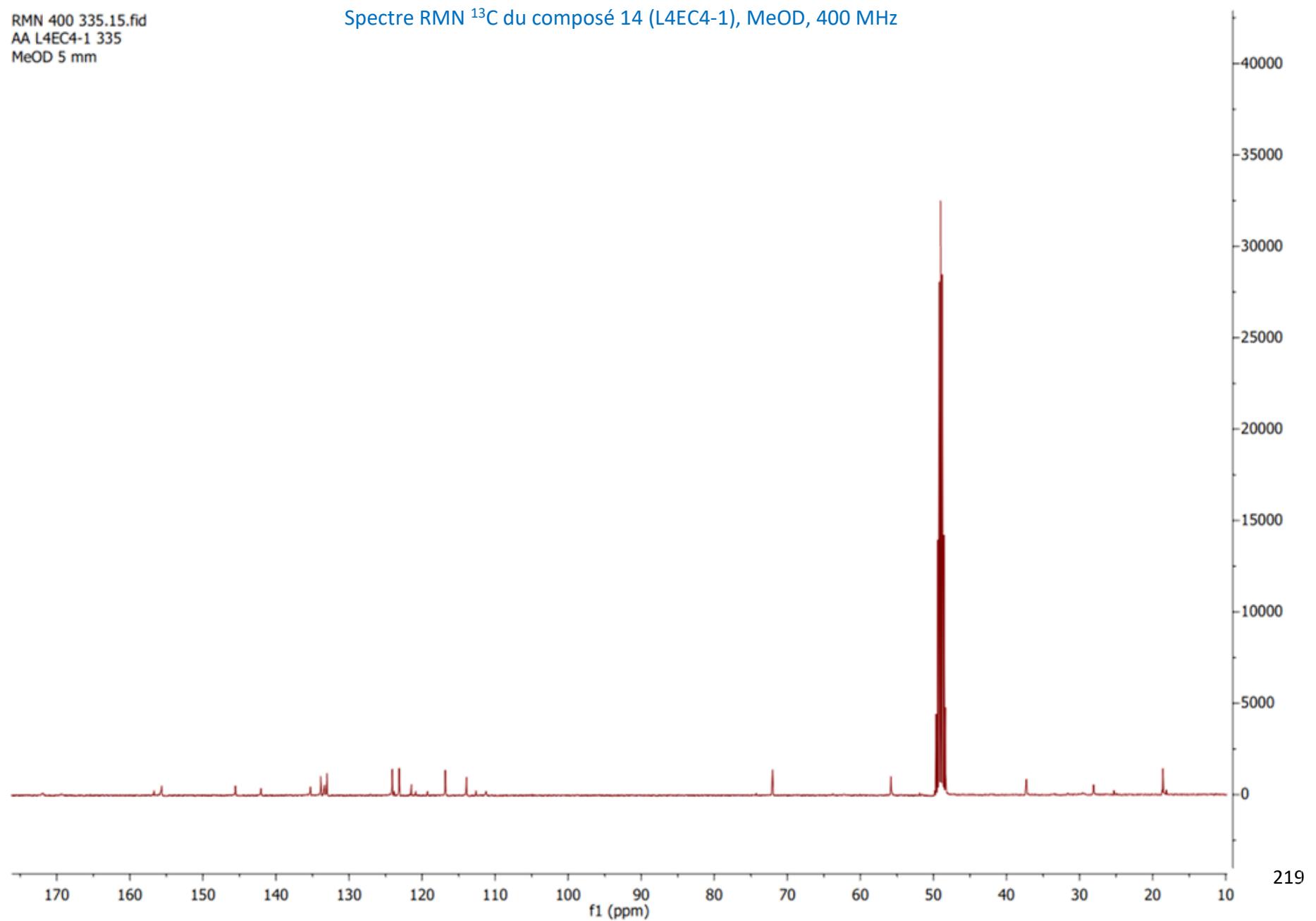
AA L4EC4-1 335.1.fid
AA L4EC4-1 335

Spectre RMN ^1H du composé 14 (L4EC4-1), MeOD, 400 MHz

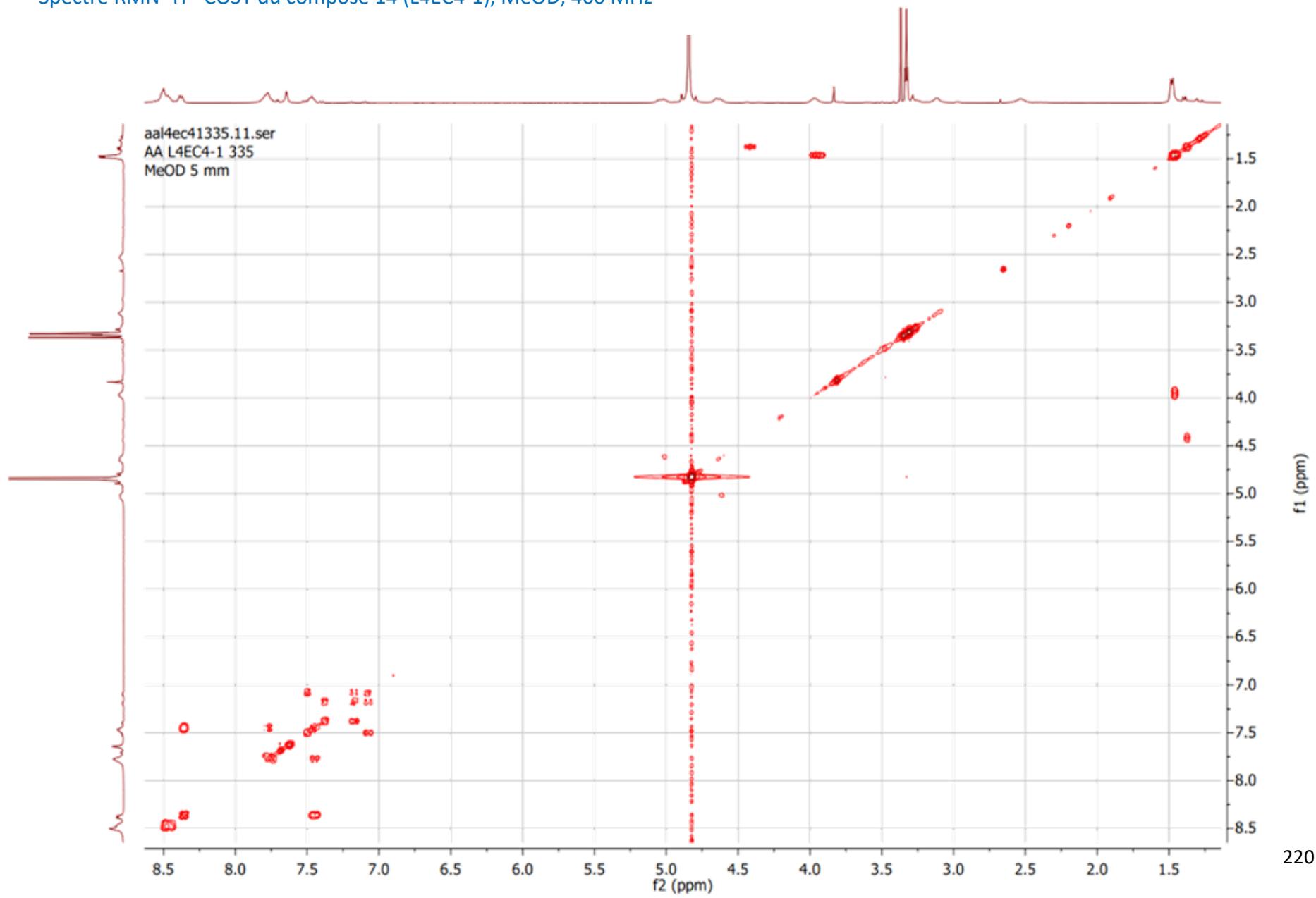


RMN 400 335.15.fid
AA L4EC4-1 335
MeOD 5 mm

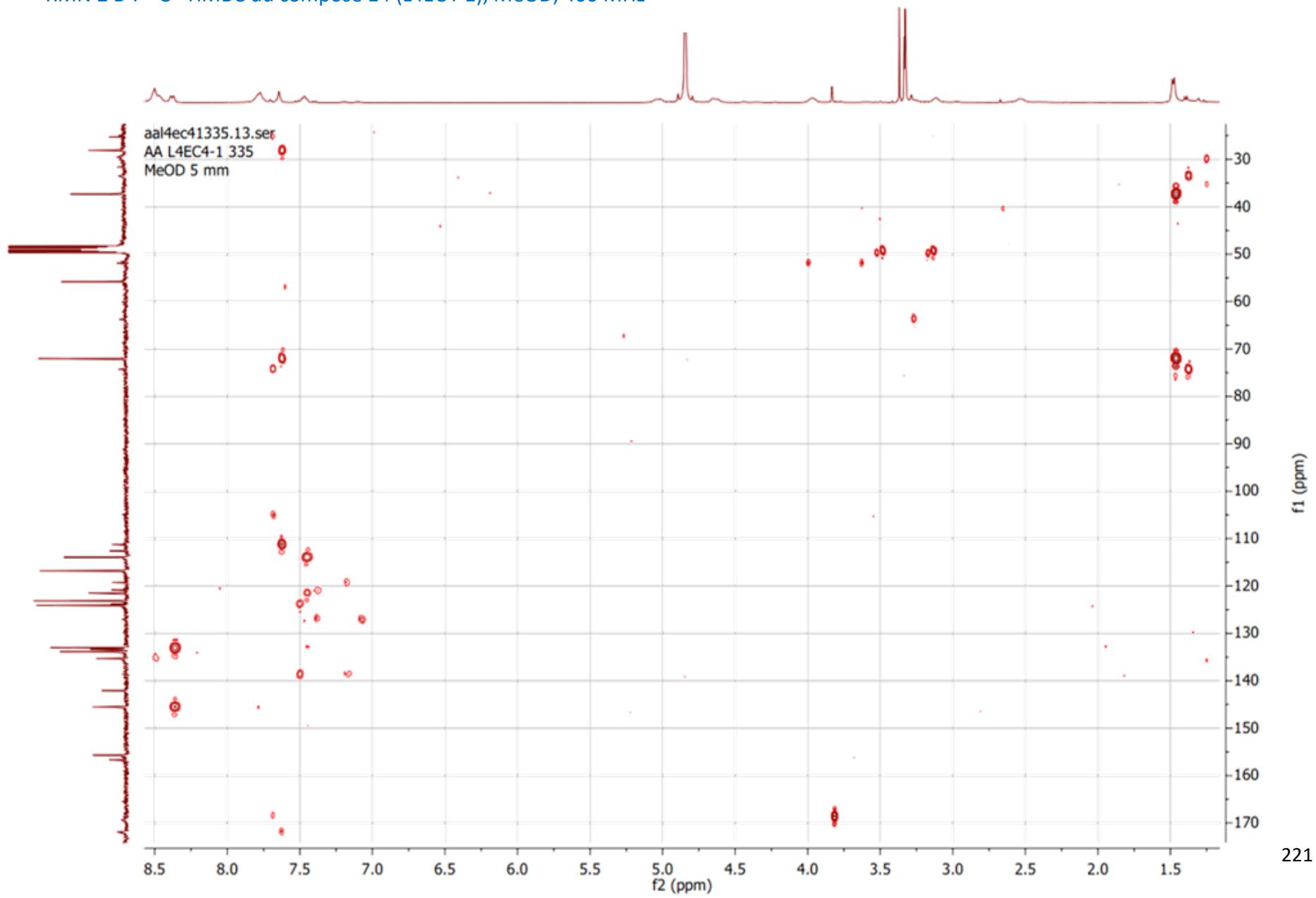
Spectre RMN ^{13}C du composé 14 (L4EC4-1), MeOD, 400 MHz



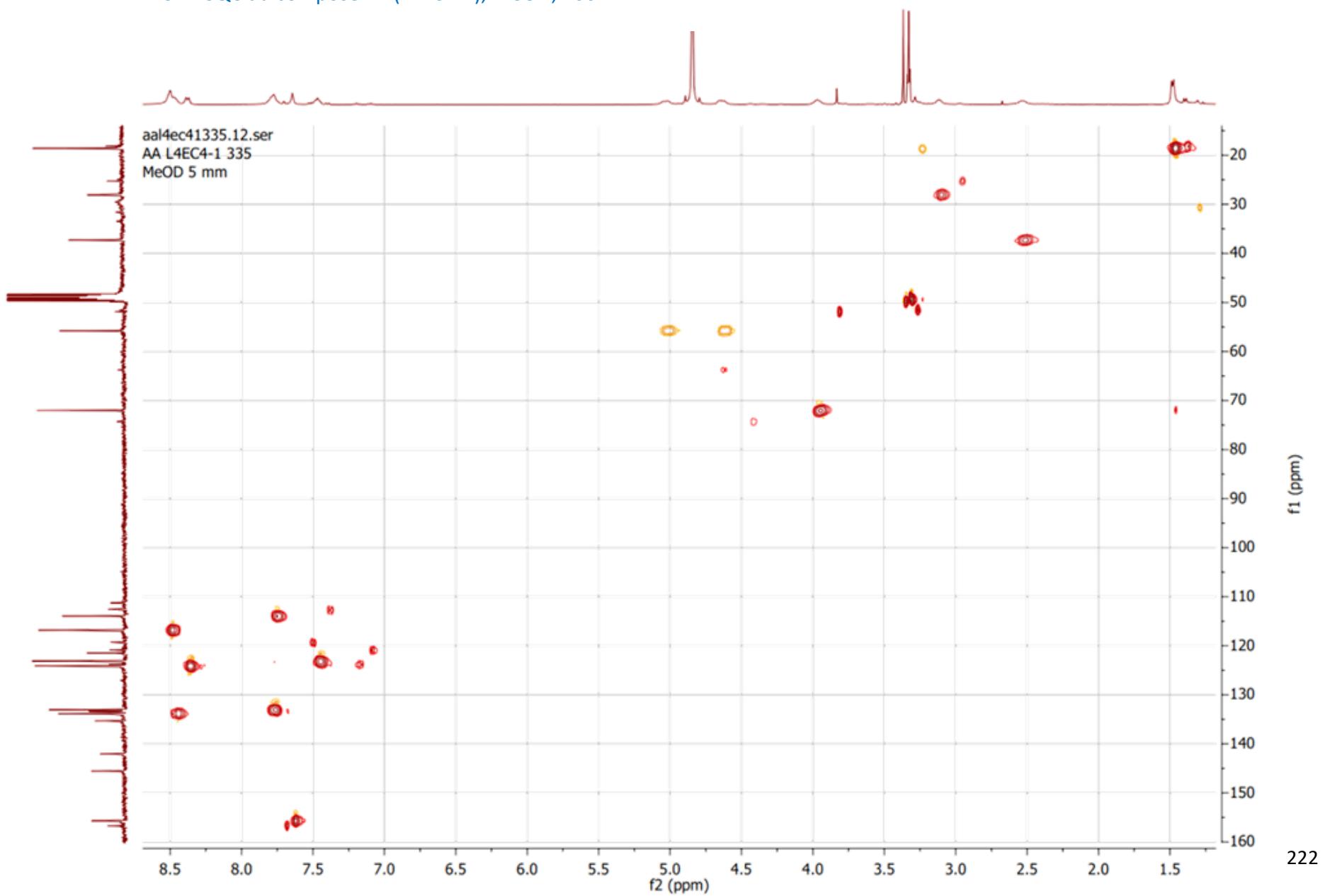
Spectre RMN ^1H - COSY du composé 14 (L4EC4-1), MeOD, 400 MHz



RMN 2 D : ^{13}C - HMBC du composé 14 (L4EC4-1), MeOD, 400 MHz

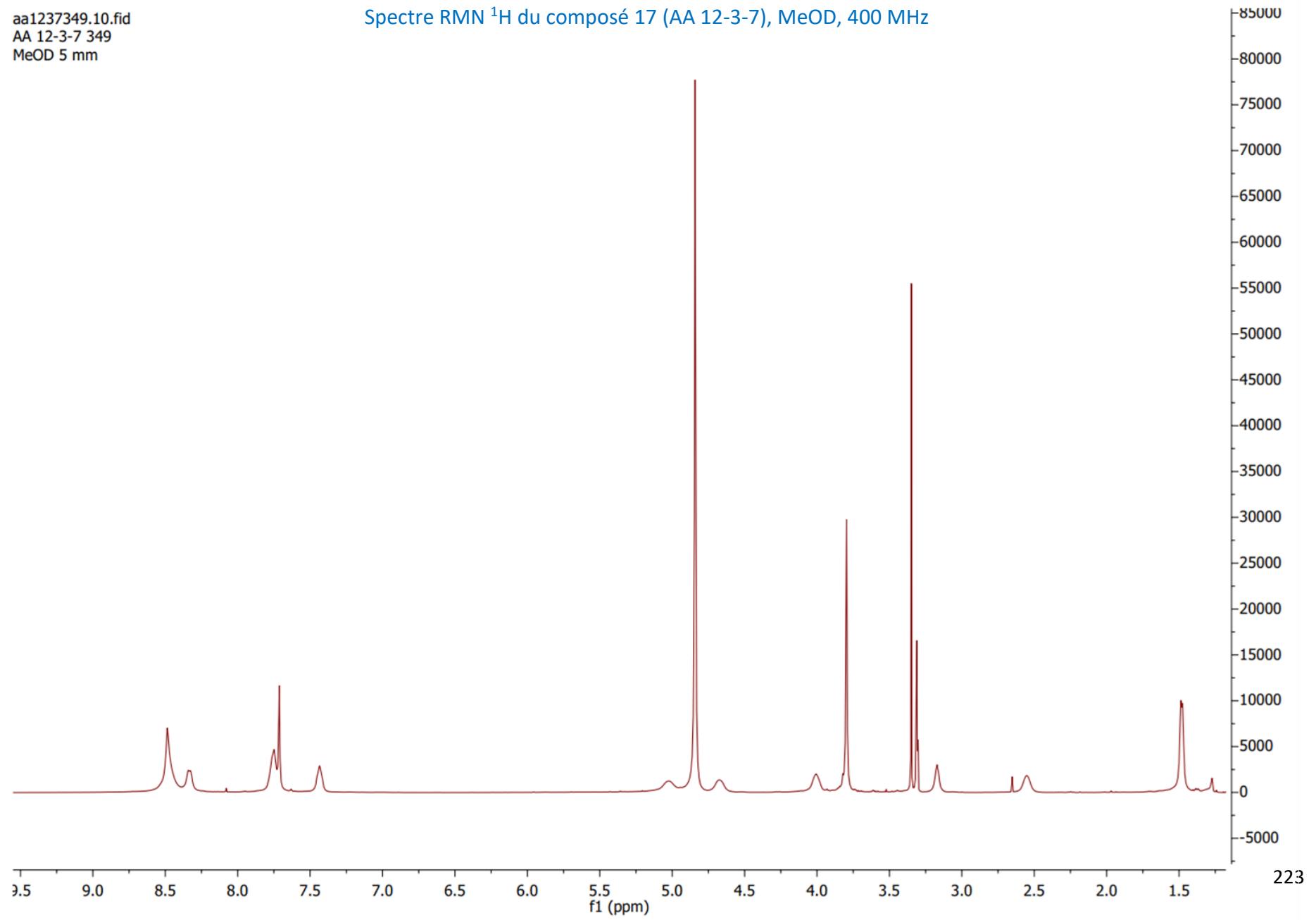


RMN 2 D : ^{13}C - HSQC du composé 14 (L4EC4-1), MeOD, 400 MHz



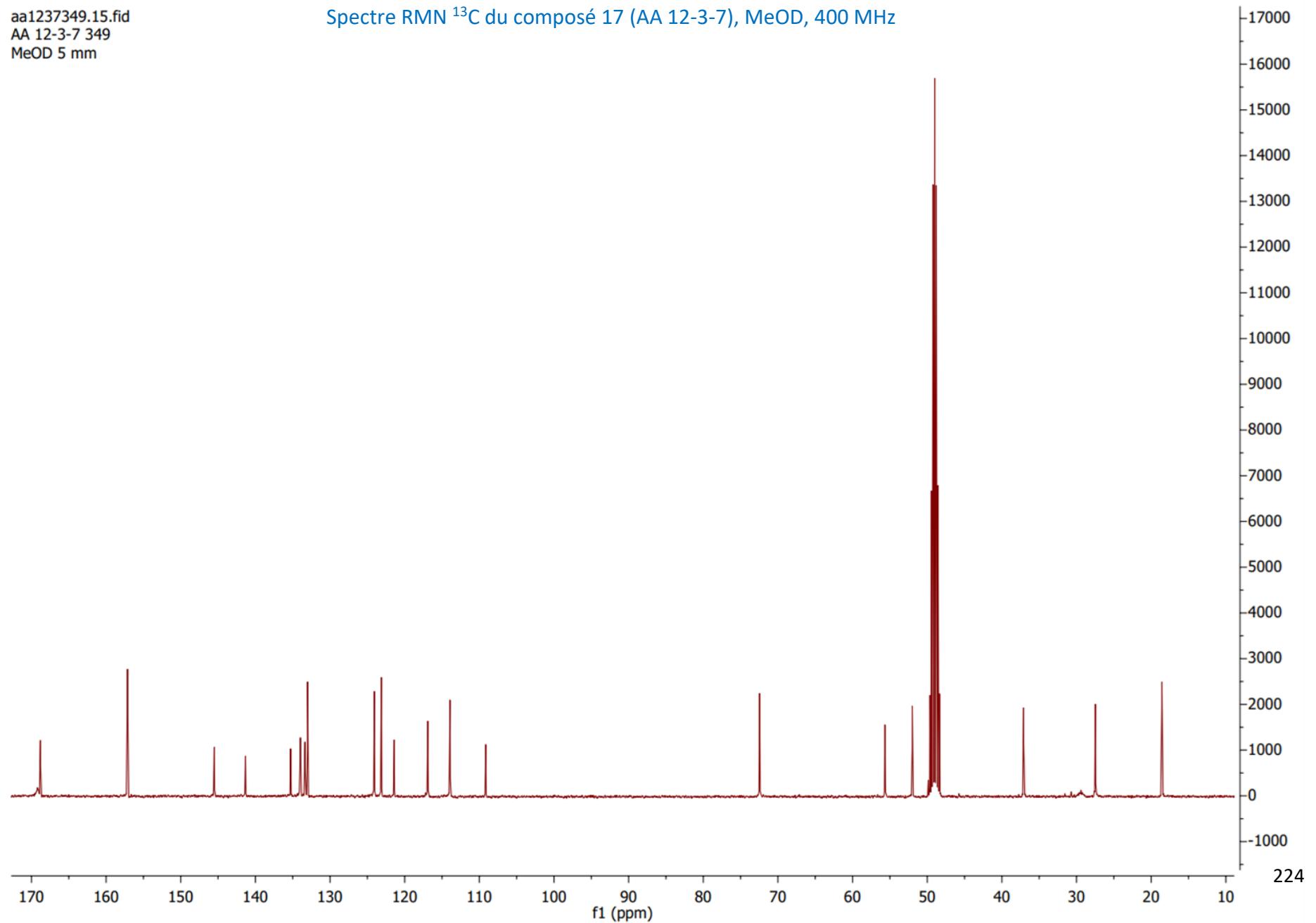
aa1237349.10.fid
AA 12-3-7 349
MeOD 5 mm

Spectre RMN ^1H du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz

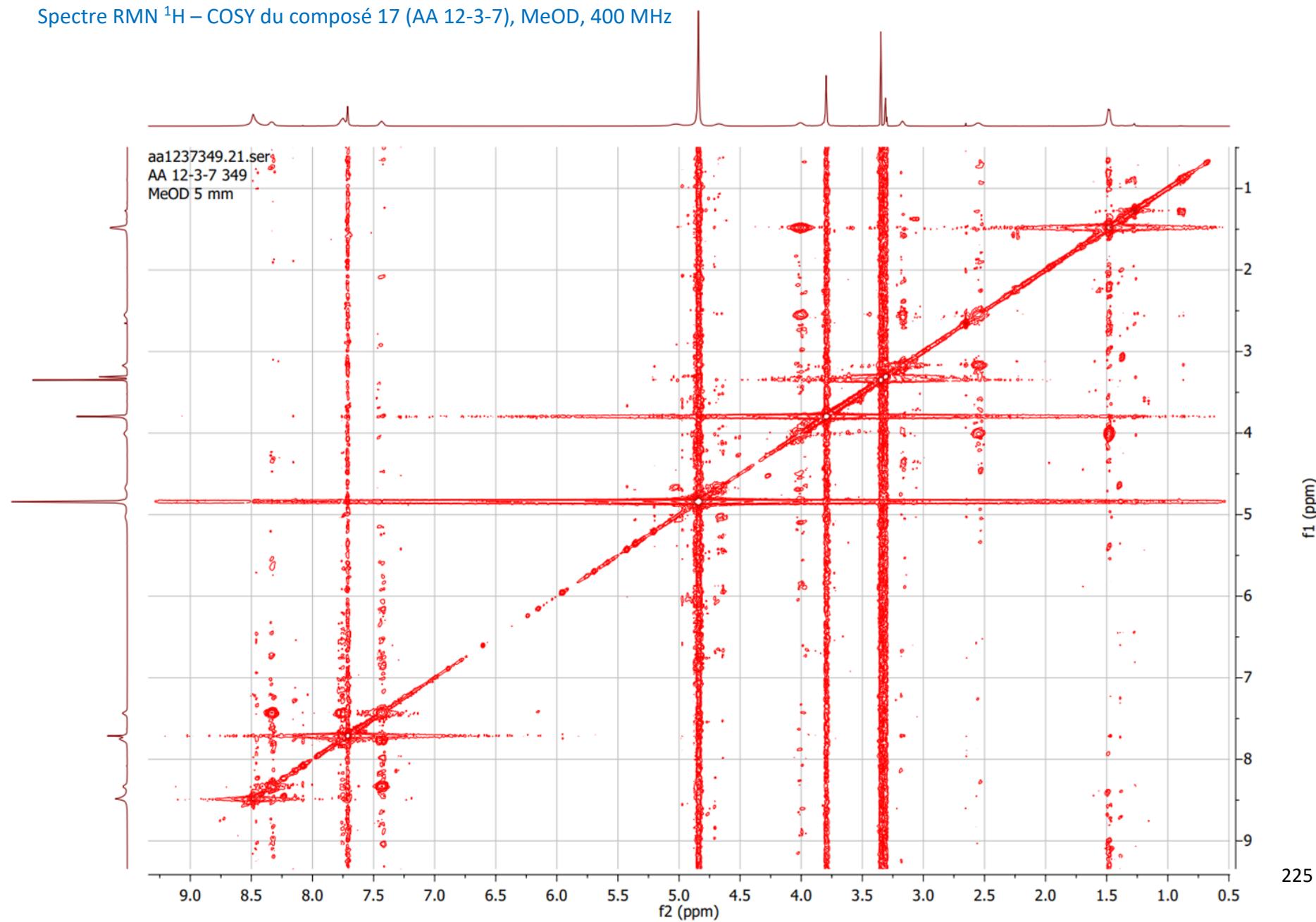


aa1237349.15.fid
AA 12-3-7 349
MeOD 5 mm

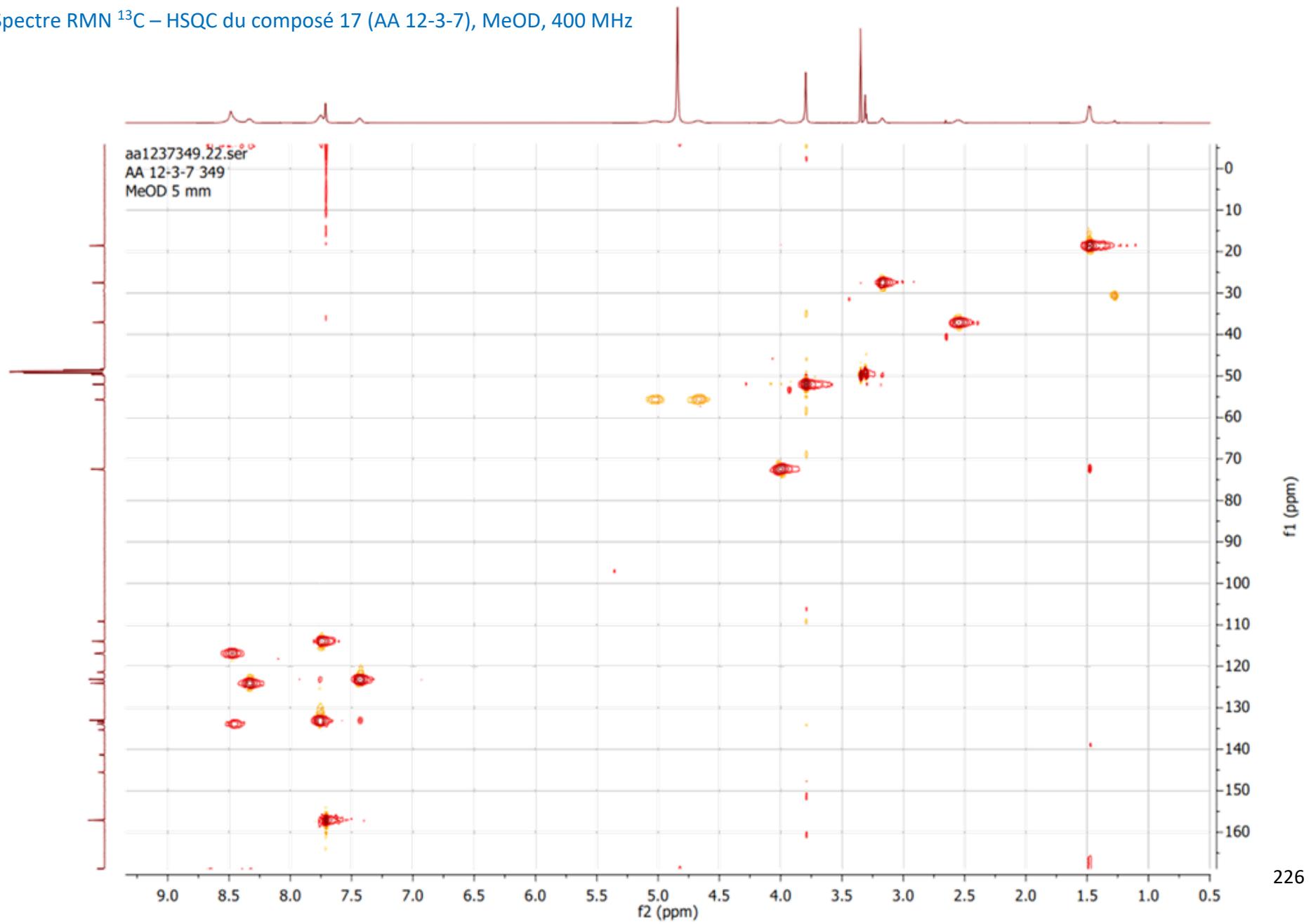
Spectre RMN ^{13}C du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz



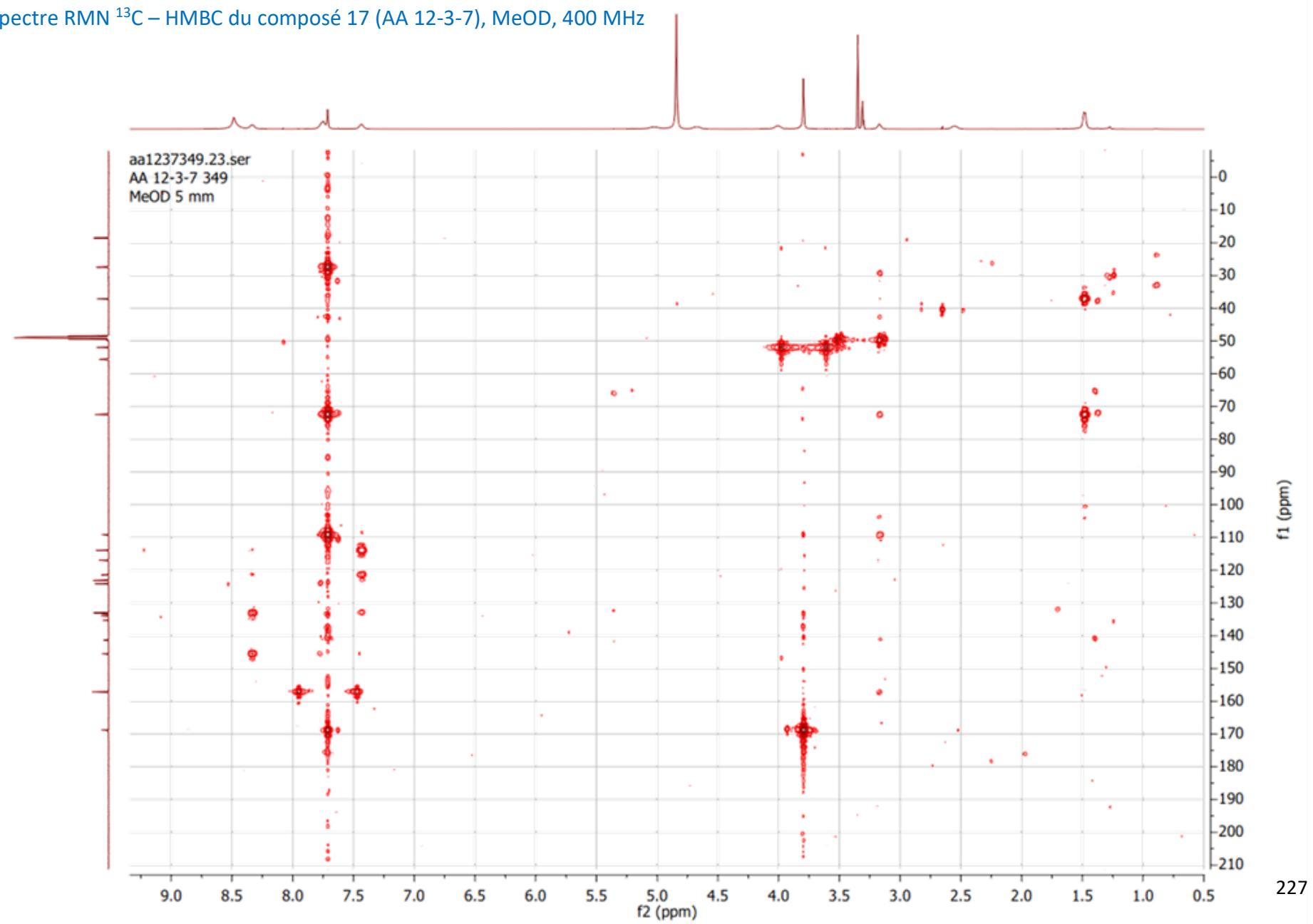
Spectre RMN ^1H – COSY du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz



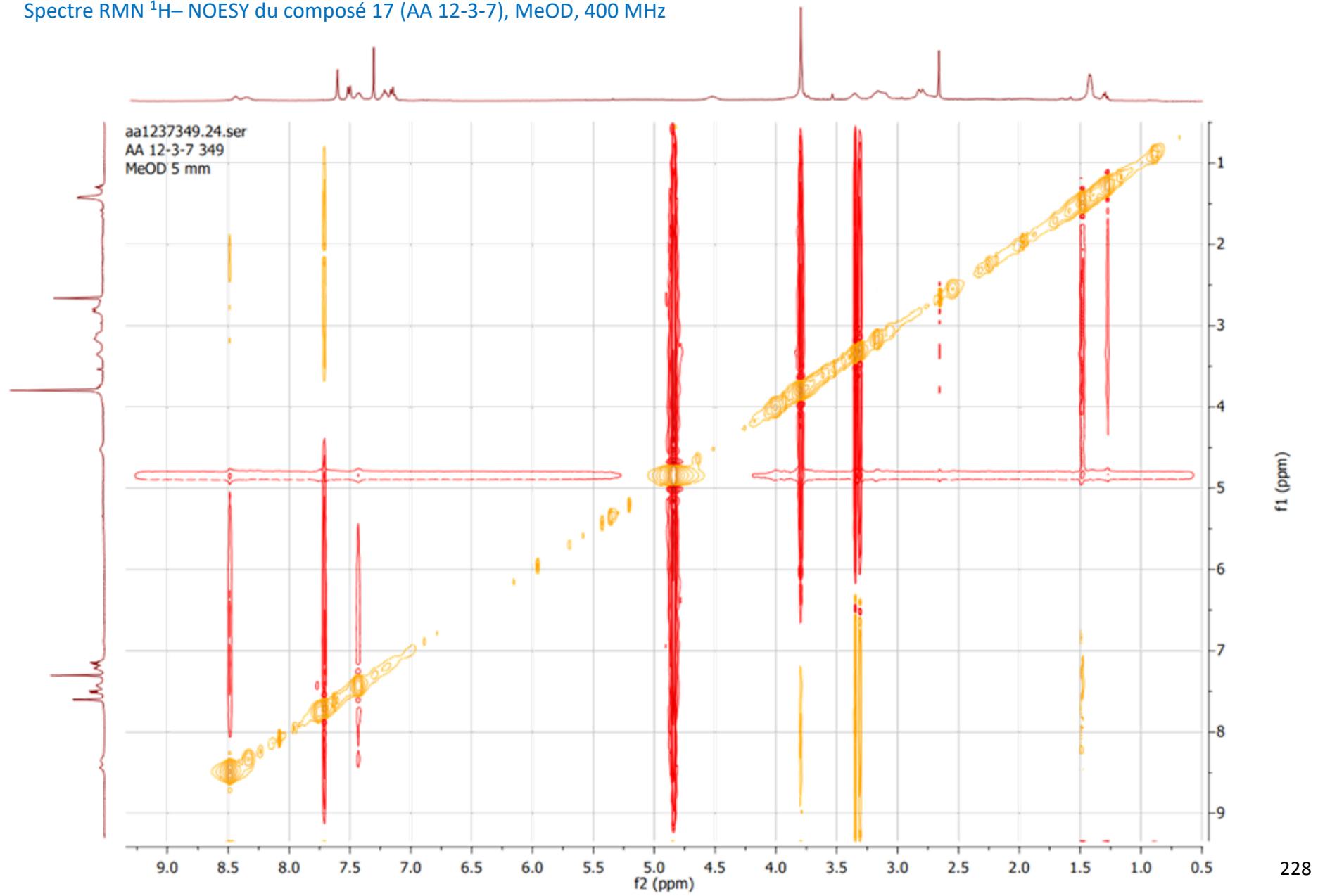
Spectre RMN ^{13}C – HSQC du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz



Spectre RMN ^{13}C – HMBC du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz



Spectre RMN ^1H –NOESY du composé 17 (AA 12-3-7), MeOD, 400 MHz



Communications réalisées au cours de la thèse

Article en préparation:

Ouayogode Akoubet A., Koné Bamba D., Champy P. Manufactured antimalarial herbal drugs from Ivory Coast: Regulatory compliance, composition and antiplasmodial activity. Pour soumission à *Journal of Herbal Medicine* (Elsevier ; facteur d'impact 2019 : 2,221)

Articles publiés :

Paule Mireille Alloukou-Boka, Aminata Akoubet-Ouayogode, Anne Cinthia Amonkou-N'guessan, Rosine Désirée Nkuitchou-Chougouo, Antoine Serge Amari, Jean-Yves Pabst. Etat des lieux de la réglementation des médicaments a base de plantes en Côte d'Ivoire. *Revue Bio-Africa - N° 22 - 2020*, pp. 22-30. © EDUCI 2020.

Aminata Akoubet Ouayogodé, Landry Kouakou, Landry Claude Kablan Ahmont, Marceline Adiko N'dri, Thierry Djadji Ayoman, Siransy-Gisèle Kouakou, Diéneba Koné-Bamba, Pierre Champy. Etude micrographique et évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vivo* du fruit de *Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H. Durand (Apocynaceae). *Revue RAMReS – Série Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 2021 ; 20(2) : 01-08. ISSN 2630-1296.

Communications par affiche

Ouayogode Akoubet A., Alcover C., Otogo E., Fox-Ramos A., Evanno L., Beniddir M., Kone-Bamba D., Champy P. Analyse d'un extrait aqueux de fruit de *Picralima nitida* : déréplication utilisant les réseaux moléculaires. 7^e journée de l'Ecole doctorale « Innovation thérapeutique, du fondamental à l'appliqué », Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 23 Juin **2017**, Paris. Poster primé (1^{er} prix, chimie).

Ouayogode Akoubet A., Alcover C., Otogo E., Fox-Ramos A., Evanno L., Beniddir M., Kone-Bamba D., Champy P. Dereplication of an aqueous extract from *Picralima nitida* fruit using molecular networking. 3rd International Conference on Natural Products Utilization : “From Plants to Pharmacy Shelf”, 18-21 Octobre **2017**, Bansko, Bulgarie.

Ouayogode Akoubet A., Beniddir M., Evanno L., Kone B.D., Champy P. *Picralima nitida* (Apocynaceae) : Variabilite chimique des préparations traditionnelles – approche metabolomique. **Poster**. Journée de la Recherche 2019, Université Paris Saclay, 23 janvier **2020**, Paris.

Résumé / Abstract

Résumé : Le paludisme est endémique en Côte d'Ivoire, où la majeure partie de la population a recours à des médications traditionnelles. L'objectif de notre travail était de contribuer au développement de l'enregistrement de médicaments traditionnels à base de plantes par les autorités sanitaires. Une enquête ethnobotanique a été réalisée en 3 volets : classiquement auprès de vendeuses de plantes à d'Abidjan en comparaison aux données bibliographiques ; de manière originale par un inventaire des produits antipaludiques à base de plantes reçus pour soumission à un enregistrement par le *Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle* et la *Direction des Activités Pharmaceutiques* ivoiriens ; par la collecte de produits manufacturés commercialisés. Une vérification d'activité antiplasmodiale *in vitro* et une contribution au

Contrôle botanique ont été réalisés. Une étude d'une préparation traditionnelle originale à base de pulpe de fruits de *Picralima nitida* (Stapf) TH. et H. Durand (Apocynaceae), étayée d'un point de vue micrographique utile au contrôle, a permis : une caractérisation par CLHP-MS/MS d'alcaloïdes indolomonoterpéniques ; une étude de variabilité chimique qualitative et quantitative par le biais du dosage des composés principaux après isolement et par une approche métabolomique ; une étude d'activité antiplasmodiale *in vitro* de plusieurs lots ; une vérification d'activité *in vivo* dans un modèle murin mettant en évidence l'intérêt de la préparation. Les autres parties du fruit ont également été étudiées d'un point de vue qualitatif en recourant aux mêmes outils analytiques.

Abstract : Malaria is an endemic disease in Ivory Coast, for the major part of the population uses traditional remedies. The objective of our work was to contribute to the implementation of the registration of Herbal Drugs, within the framework of sanitary authorities. An ethnobotanical survey was conducted, in 3 parts: A classical enquiry with medicinal plants sellers, in comparison with the literature; An original inventory of herbal products destined to registration by the *Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle* and by the *Pharmaceutical Activities Direction* of Ivory Coast; The collection of commercial and unregistered manufactured herbal drugs. An evaluation of their *in vitro* antiplasmodial activity and a contribution to botanical control were conducted.

The study of an original traditional preparation of the fruit pulp of *Picralima nitida* (Stapf) TH. and H. Durand (Apocynaceae), ascertained by micrographic examination, allowed: a HPLC-MS/MS based characterization of indolomonoterpene alkaloids; a study of its qualitative and quantitative chemical variability based on the determination of the major constituents after isolation and by a metabolomic approach; A study of *in vitro* antiplasmodial activity and a verification of *in vivo* activity in a murine model, evidencing the interest of this preparation. A qualitative characterization of other parts of the fruit was performed using the same analytical tools.

Titre : Etude ethnobotanique, chimique et activités pharmacologiques de plantes et recettes antimalariaires de Côte d'Ivoire

Mots clés : Ethnopharmacologie, Médicament traditionnel amélioré, Paludisme, *Picralima nitida*

Résumé : Le paludisme est endémique en Côte d'Ivoire, où la majeure partie de la population a recours à des médications traditionnelles. L'objectif de notre travail était de contribuer au développement de l'enregistrement de médicaments traditionnels à base de plantes par les autorités sanitaires. Une enquête ethnobotanique a été réalisée en 3 volets : classiquement auprès de vendeuses de plantes à d'Abidjan en comparaison aux données bibliographiques ; de manière originale par un inventaire des produits antipaludiques à base de plantes reçus pour soumission à un enregistrement par le *Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle* et la *Direction des Activités Pharmaceutiques* ivoiriens ; par la collecte de produits manufacturés commercialisés. Une vérification d'activité antiplasmodiale *in vitro* et une contribution au

contrôle botanique ont été réalisés. Une étude d'une préparation traditionnelle originale à base de pulpe de fruits de *Picralima nitida* (Stapf) TH. et H. Durand (Apocynaceae), étayée d'un point de vue micrographique utile au contrôle, a permis : une caractérisation par CLHP-MS/MS d'alcaloïdes indolomonoterpéniques ; une étude de variabilité chimique qualitative et quantitative par le biais du dosage des composés principaux après isolement et par une approche métabolomique ; une étude d'activité antiplasmodiale *in vitro* de plusieurs lots ; une vérification d'activité *in vivo* dans un modèle murin mettant en évidence l'intérêt de la préparation. Les autres parties du fruit ont également été étudiées d'un point de vue qualitatif en recourant aux mêmes outils analytiques.

Title : Ethnobotanical, chemical and pharmacological studies of antimarial plants and remedies from Ivory Coast

Keywords : Ethnopharmacology, Improved Traditional Herbal Drug, Malaria, *Picralima nitida*

Abstract : Malaria is an endemic disease in Ivory Coast, for the major part of the population uses traditional remedies. The objective of our work was to contribute to the implementation of the registration of Herbal Drugs, within the framework of sanitary authorities. An ethnobotanical survey was conducted, in 3 parts: A classical enquiry with medicinal plants sellers, in comparison with the literature; An original inventory of herbal products destined to registration by the *Programme National de Promotion de la Médecine Traditionnelle* and by the *Pharmaceutical Activities Direction* of Ivory Coast; The collection of commercial and unregistered manufactured herbal drugs. An evaluation of their *in vitro* antiplasmodial activity and a contribution to botanical control were

conducted. The study of an original traditional preparation of the fruit pulp of *Picralima nitida* (Stapf) TH. et H. Durand (Apocynaceae), ascertained by micrographic examination, allowed: a HPLC-MS/MS based characterization of indolomonoterpene alkaloids; a study of its qualitative and quantitative chemical variability based on the determination of the major constituents after isolation and by a metabolomic approach; A study of *in vitro* antiplasmodial activity and a verification of *in vivo* activity in a murine model, evidencing the interest of this preparation. A qualitative characterization of other parts of the fruit was performed using the same analytical tools.