

FORMULATION DE SIROPS ANTIPALUDIQUES A BASE

D'EXTRAITS DE *ARGEMONE MEXICANA*

^{1,2} Sanogo Rokia* ¹Traoré Fousseni, ^{1,3}Djimdé Abdoulaye, ¹Lassana Doumbia, ^{1,2}Maiga Ababacar, ^{1,2}Diallo Drissa et ^{1,3}Doumbo Ogobara.

¹Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, de l'Université de Bamako;

² Département Médecine Traditionnelle ; ³Malarial Research and Training Centre.

*Auteur pour toute correspondance: Prof Rokia Sanogo, DMT. B.P. 1746 Bamako, Mali;

Tél. (223) 66 74 65 34 ; Email : rosanogo@yahoo.fr

Résumé

Argemone mexicana L. (*Papaveraceae*) est utilisée sous forme de décocté dans la prise en charge du paludisme au Mali. Des études antérieures précliniques et cliniques ont permis de démontrer l'efficacité et l'innocuité du décocté de *A. mexicana* dans la prise en charge du paludisme simple. La présente étude a pour but de contrôler la qualité des feuilles de *A. mexicana*, de mettre au point un phytomédicament antipaludique à base des extraits de *A. mexicana*.

Le contrôle de qualité a été effectué par microscopie de la poudre des feuilles; les réactions colorées et la chromatographie sur couche mince ont permis de caractériser les constituants chimiques des extraits. Des sirops ont été préparés à partir du décocté et de l'extrait hydro éthanolique des feuilles de *A. mexicana*.

Les éléments microscopiques caractéristiques de la poudre des feuilles ont été des fibres avec des cristaux d'oxalate de calcium; des fragments de tissus vasculaires, d'épiderme avec stomates; de poils tecteurs, des vaisseaux spiralés et des cellules laticifères. Les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes et les tanins ont été caractérisés dans les extraits. Les sirops à

base de décocté (20%) et de l'extrait hydro éthanolique (10%) ont présenté une bonne stabilité au bout d'une année de conservation.

En conclusion, le sirop de *Argemone mexicana* pourra contribuer à la meilleure prise en charge du paludisme non compliqué chez les enfants. En perspective, la production de lots pilote de sirops qui est en cours et serviront à l'évaluation de l'efficacité chez les patients atteints de paludisme.

Mots clés : *Argemone mexicana* - Activité antipaludique - Phytomédicament Sirop.

Abstract:

Argemone mexicana L. (Papaveraceae) is used as a decoction in the treatment of malaria in Mali. Previous preclinical and clinical studies have demonstrated the efficacy and safety of the decoction of *A. mexicana* in the management of malaria. This study aims to monitor the quality of leaves of *A. mexicana* and to develop an antimalarial phytomedicine with extracts of *A. mexicana*. Quality control was performed by microscopy of the powder of the leaves the colour reactions and Thin Layer Chromatography (TLC) were used to characterize the chemical constituents of the extracts. Syrups were prepared from the decoction and the hydro-ethanolic extract of leaves of *A. mexicana*.

Items microscopic characteristics of the powder of the leaves were fibres with calcium oxalate crystals, fragments of vascular tissue, epidermis with stomata, trichomes, and spiral vessels and cells laticifers. Alkaloids, coumarins, flavonoids and tannins have been characterized in the extracts. Syrups based decoction (20%) and hydro-ethanolic extract (10%) showed good stability after one year of storage.

In conclusion, *Argemone mexicana* syrup may contribute to better management of uncomplicated malaria in children. In perspective, production of pilot batches of syrups is underway and which be used to evaluate the efficacy in malaria patients.

Keywords: *Argemone mexicana* – Antimalarial activity - phytomedicinal Syrup.

INTRODUCTION

Le paludisme reste encore une priorité de santé publique en Afrique. Face à l'apparition de nombreuses résistances des parasites aux antipaludiques de synthèse et à l'accessibilité limitée géographique et financière aux médicaments disponibles, la recherche d'un nouvel arsenal thérapeutique plus adapté aux populations vivant en zone d'endémie est nécessaire. Les premières molécules antipaludiques, telles que la quinine et ses dérivés, qui demeurent les antipaludiques majeurs de l'urgence et de la gravité, et plus récemment l'artémisinine et ses dérivés, utilisés avec succès dans les cas de multi résistance, sont d'origine naturelle.

Au Mali, des recherches sont actuellement en cours pour la mise au point d'un nouveau phytomédicament, plus efficace contre le paludisme. Dans un premier temps des résultats des enquêtes ethnobotaniques ont permis de sélectionner *Argemone mexicana* L. (*Papaveraceae*) comme une des plantes utilisée avec succès dans la prise en charge du paludisme (Diallo et al. 2007). Les études précliniques ont montré une efficacité de différents extraits de *A. mexicana* testés *in vitro* avec concentrations inhibitrices 50% (IC₅₀) comprises entre 1,00 et 6,22 µg/ml sur des souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine (Diallo et al. 2007). L'efficacité du décocté de *A. mexicana* sur le paludisme simple a été confirmée au cours d'une étude ethno médicale en milieu rural (Willcox et al. 2007). Par la suite, une étude clinique comparative entre les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et le décocté de *A. mexicana* a réaffirmé l'efficacité du décocté de la plante dans la prise en charge du paludisme simple au niveau des ménages (Graz et al. 2009). Les résultats de l'étude de la toxicité sub-chronique de *A. mexicana* sont également en faveur d'une sécurité d'emploi du décocté à la dose thérapeutique utilisée dans la prise en charge du paludisme simple (Sanogo et al. 2008).

Pour une meilleure utilisation des extraits de *A. mexicana*, la présente étude a pour but de contrôler la qualité des feuilles de *A. mexicana* et de formuler des sirops avec les extraits de la plante.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal.

Nous avons travaillé sur la partie aérienne dépourvue de graines de *Argemone mexicana* ; Le matériel végétal a été récolté en décembre 2007 dans le cercle de Kolokani. Un spécimen est déposé à l'Herbier du Département Médecine Traditionnelle (DMT), sous le N°873.

L'échantillon a été séché à l'ombre dans la salle de séchage du DMT. Le matériel végétal a été pulvérisé à l'aide d'un moulin afin d'obtenir une poudre grossière qui a servi pour les analyses suivantes.

Contrôle de qualité de la matière première:

- **Caractères organoleptique, microscopiques :**

Caractères organoleptiques : Nous avons procédé à la détermination de la couleur, de l'odeur et de la saveur de la poudre de plante.

Caractères microscopiques : Une petite quantité de poudre a été mélangée quelques gouttes du réactif de Gazet et Chatelier dans un verre à montre. Une goutte de la préparation a été déposée sur une lame et a été couverte par une lamelle.

L'observation a été effectuée au microscope optique avec l'objectif 40xn. Les éléments caractéristiques de la poudre de plante ont été notés et dessinés.

- **Détermination des teneurs**

Teneur en eau

La détermination de la teneur en eau a été effectuée par la méthode gravimétrique : 5 prises

d'essai de masse variant entre 1 et 2 g de poudre ont été introduites dans 5 creusets tarés. Les 5 échantillons sont séchés dans une étuve à la température de 105°C pendant 24 heures. Les creusets ont été refroidis dans un dessiccateur et pesés. Les masses obtenues ont permis de calculer la perte de masse et de calculer la teneur en eau de la poudre exprimée en pourcentage.

Teneurs en cendres

Cendres totales : Les poudres séchées au cours de la détermination de la teneur en eau ont été calcinées dans un four à 600°C pendant 6 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur, les cendres ont été pesées. Les masses obtenues ont permis de calculer les masses des cendres et de calculer la teneur en cendres totales, exprimée en pourcentage.

Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique à 10% : Les cendres totales obtenues ont été reprises avec 20 ml d'acide chlorhydrique à 10%. L'ensemble a été porté à l'ébullition au bain-marie pendant 15 mn. La solution obtenue a été filtrée. Le résidu a été recueilli sur un filtre sans cendre placé dans un creuset taré et calciné au four à 600°C pendant 6 heures. Le creuset a été refroidi dans un dessiccateur. La masse des cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique a été exprimée en pourcentage.

Cendres sulfuriques à 50% : Cinq prises d'essais de masse variant entre 1 et 2 g de poudre, ont été introduites dans des creusets tarés. Il a été ajouté au contenu de chaque creuset 5ml d' H_2SO_4 à 50%. L'ensemble a été placé dans le four à la température de 600°C pendant 6 heures. Après calcination et refroidissement dans un dessiccateur, les cendres ont été pesées et la masse des cendres sulfuriques a été exprimée en pourcentage.

Analyse chimique : Caractérisation des principaux constituants chimiques:

Pour la caractérisation des constituants chimiques, nous avons travaillé sur différents extraits : le décocté extemporané, le décocté lyophilisé, l'extrait hydro éthanolique et l'extrait alcaloïdique.

- **Extraction**

Décoction: vingt grammes de poudre de la plante ont été mis dans 100 ml d'eau distillée et l'ensemble a été porté à ébullition pendant 15 min ; après refroidissement, le décocté a été filtré et lyophilisé.

Extraction avec éthanol à 70%: Il a été obtenu par macération de 10 grammes de poudre dans 100 ml d'éthanol à 70%, pendant 24 h, après filtration, l'extrait a été évaporé à sec.

Extraction des alcaloïdes : Dix grammes de poudre ont été humectés avec une solution diluée de NH_4OH à 50% et les alcaloïdes ont été extraits par 50 ml de chloroforme. Le chloroforme a été évaporé et le résidu obtenu a été utilisé (Traoré, 2010).

- **Caractérisation des constituants chimiques**

Les constituants chimiques des extraits ont été caractérisés par des réactions colorées et par l'établissement de leurs profils chromatographiques par chromatographie sur couche mince (CCM).

Réactions de caractérisation

Les réactifs de caractérisation classiques ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les alcaloïdes (Réactif de Dragendorff et de Mayer), les composés réducteurs (Réactif de Fehling), les flavonoïdes (Réaction de la cyanidine), les saponosides (Indice de mousse), les tanins (Chlorure ferrique), les stérols et triterpènes (Réaction de Liebermann Buchard) (OUA 1988).

Chromatographie sur couche mince

La CCM a été effectuée selon les méthodes générales de la pharmacopée africaine (OUA, 1988 ; Wagner et Bladt, 1996).

Solutions d'essai : Dix milligrammes de chaque extraits aqueux ont été dissous dans 1 ml du mélange méthanol-eau (1:1) ; pour les extraits hydroéthanolique et alcaloïdiques l'éthanol à 70% a été utilisé.

Support : Plaque de silice 60GF₂₅₄, d'épaisseur 0,25 mm.

Dépôt : Sur les plaques préparées nous avons déposé 10 µl de chaque extrait à l'aide d'une micro pipette.

Solvants de migration : Le système de solvants de migration utilisé a été le : BAW
*n*Butanol : Acide acétique : Eau (60:15: 25).

Observation et révélation: Les plaques ont été séchées et observées à la lampe UV à 254 nm et à 366 nm. Nous avons utilisé pour la révélation les réactifs de Godin suivi de chauffage et de Dragendorff. Le facteur de rétention (Rf) de chaque tache a été calculé.

2.4. Préparation des extraits et des sirops

Pour la préparation des sirops, nous avons procédé dans un premier temps à la préparation des extraits (décocté et hydroéthanolique 70%) et à la détermination de leurs concentrations.

- **Préparation des extraits**

Décocté : La préparation a été faite selon la méthode du tradipraticien de santé de Missidougou : 30 g de poudre de *Argemone mexicana* ont été mises dans 500 ml d'eau distillée et l'ensemble a été porté à ébullition pendant 30 mn. Après refroidissement, le décocté a été filtré sur compresse, le volume du filtrat a été mesuré, l'extrait a été concentré au Rotavapor

puis lyophilisé. Le lyophilisat a été pesé et recueilli dans un flacon bien propre. L'opération a été répétée trois fois. Le rendement a été déterminé.

Pour la préparation du sirop, nous avons mis à bouillir pendant 30 minutes, 1 kg de poudre grossière de *A. mexicana* dans 16 litres d'eau distillée. Le décocté obtenu a été mesuré et concentré au Rotavapor jusqu'à 1/10 de son volume. Ce décocté concentré a été utilisé pour la préparation du premier lot de sirop.

Extrait hydro éthanolique : 20 g de poudre de poudre grossière de *A. mexicana* ont été mélangés à 200 ml d'éthanol à 70° et laissés en macération pendant 24 heures. Filtrer et évaporer l'éthanol au Rotavapor. Le volume de la phase aqueuse finale a été mesuré avant sa lyophilisation et le calcul du rendement a été effectué.

Pour la préparation du sirop, 1 kg de poudre de poudre grossière de *A. mexicana* a été macéré pendant 24 heures dans 10 litres d'éthanol à 70°. L'extrait hydroalcoolique a été concentré au Rotavapor, jusqu'à l'élimination totale de l'éthanol. La phase aqueuse obtenue a été mesurée et utilisée pour la préparation du deuxième lot de sirop.

- **Préparation des sirops :**

Les extraits obtenus ont servi pour la préparation des sirops selon les formules suivantes

Sirop du décocté à 20% :

Décocté concentré : 1000 ml

Saccharose : 1800 g

Parahydroxybenzoate de méthyle sodé 2%

A 1 litre du décocté concentré, légèrement chauffé, nous avons ajouté du sucre jusqu'à saturation et comme conservateur le parahydroxybenzoate de méthyle sodé.

Le sirop obtenu a été conditionné dans des flacons de 100 ml préalablement pesés. Le nombre de flacons obtenu a été noté.

Sirop hydroéthanolique à 10% :

Phase aqueuse Extrait Ethanol 70% : 600 ml

Saccharose : 820 g

Parahydroxybenzoate de méthyle sodé 2%

A 600 ml de la phase aqueuse de l'extrait hydroéthanolique, nous avons ajouté une quantité suffisante de sucre jusqu'à saturation. Le sirop obtenu a été conditionné dans des flacons préalablement pesés. Le nombre de flacons obtenu a été noté.

Contrôle de qualité des sirops :

Les sirops ont subi un contrôle hebdomadaire à partir des dates de préparations (03 Juillet 2009 pour le sirop du décocté et 01 Octobre 2009 pour le sirop de l'extrait éthanol 70%).

Pour les deux lots de sirops obtenus, nous avons déterminé les paramètres suivants : les caractères organoleptiques (couleur, odeur, la saveur), le pH, la densité et autres paramètres (limpidité, fermentation, la stabilité) au cours de la conservation.

Nous avons utilisé du papier pH pour contrôler le pH des sirops.

La densité d'un sirop se traduit par le rapport de sa masse et son volume. Chaque flacon de sirop rempli a été pesé et la moyenne de la masse a été calculée. Les différences entre ce poids et le poids vide du flacon ont permis de donner la masse moyenne de sirop par flacon. La masse du sirop a été rapportée au volume du sirop, ce qui a permis de calculer de la densité.

La limpidité est caractérisée par la capacité de transmission de la lumière par le sirop et l'absence de substance en suspension dans le sirop. La limpidité des sirops a été contrôlée par l'observation à l'œil nu contre la lumière du jour.

Le sirop fermenté se reconnaît par la formation et la prolifération de moisissures à la surface du sirop. L'observation a été faite à l'œil nu.

La stabilité d'un sirop se traduit par la constance dans le temps des différents paramètres de départ. La stabilité a été contrôlée par dégustation et observation à l'œil nu.

Le contrôle de qualité chimique des sirops a été effectué par chromatographie sur couche mince selon la même méthode pour la chimie de la matière première.

RESULTATS

Caractères organoleptiques.

La poudre grossière des feuilles de *Argemone mexicana* est de couleur verte moyen, sans saveur et d'une odeur semblable à celle des feuilles de tabac.

- **Caractères microscopiques.**

Les éléments suivants ont été observés dans la poudre de feuille de *A. mexicana* :

Des groupes de fibres avec des cristaux d'oxalate de calcium ; des fragments de tissus vasculaires, des fragments d'épiderme avec stomates, des poils tecteurs unicellulaires, des vaisseaux spiralés, des cellules laticifères, des vaisseaux de bois, un parenchyme à cellule polyédrique et des cristaux d'oxalate de calcium.

- **Teneurs**

La teneur en eau était en moyenne de 4,76%, les teneurs en cendres totales, sulfuriques et insolubles dans l'acide chlorhydrique à 10% étaient respectivement de 15,96% ; 23,33% et de 3,84%.

3.2. Principaux constituants chimiques

Les réactions colorées et de précipitation ont permis de caractériser dans les extraits de *A. mexicana* des tanins (catéchiques et galliques), des oses et holosides, des alcaloïdes, des

saponosides et des flavonoïdes. Les réactions des coumarines, d'anthocyanes et de leucoanthocyanes ont été négatives dans nos conditions expérimentales.

Les taches suivantes ont été révélées au niveau des chromatogrammes des extraits de *A. mexicana* dans le système de solvants *n*Butanol : Acide acétique : Eau (60:15: 25) : La tache de Rf 0,30 avec coloration jaune après la révélation au Godin a confirmé la présence de flavonoïdes. Les taches de Rf 0,53 de l'extrait éthanolique à EtOH (Ethanol ?) 70% et de l'extrait alcaloïdique qui ont donné une coloration rouge après la révélation au Dragendorff, confirmant la présence des alcaloïdes.

Extraits et sirops.

Les rendements des extractions ont été respectivement de 20% pour le décocté aqueux et de 10% pour l'extrait éthanolique à 70%.

- **Sirop du décocté aqueux à 20%.**

Avec mille millilitres (1000 ml) du décocté aqueux concentré, nous avons obtenu un lot de 18 flacons de sirop de 100ml (Lot N⁰ 01-09-a du 03/O7/2009) (**Figure 1**).

- **Sirop hydroalcoolique à 10%.**

Pour le sirop hydro alcoolique, 600 ml de la phase aqueuse nous ont permis d'obtenir un lot de 10 flacons de sirop de 100 ml (lot N⁰ 02-09-a du 01/10/2009) (**Figure 2**).

Caractéristiques et contrôle de qualité des sirops.

Les caractéristiques des sirops du décocté aqueux et de l'extrait hydroalcoolique ont été : un bon aspect sans dépôt, de goût miellé, légèrement caramélé avec un arrière goût amer ; une couleur de caramel (marron) et une odeur de sucre brûlé. La densité a été de 1,26 et le pH entre 5 et 6.

Au bout de huit mois, les sirops du décocté aqueux et de l'extrait éthanolique à 70% sont restés limpides et stables ; les paramètres organoleptiques n'ont pas changé ; il n'y a pas eu ni de formation de moisissures ni de suspension. La densité et le pH des sirops n'ont pas variés au cours de cette conservation. Les taches de Rf 0,06; 0,12, 0,47 0,53 et 0,96, ont été révélées au niveau des chromatogrammes des extraits et des sirops à base d'extraits de *A. mexicana* dans le système de solvants BAW.

DISCUSSION

Les éléments microscopiques retrouvés dans la poudre de feuille de *A. mexicana* seront utiles pour le contrôle de qualité et l'identification de la matière première. La teneur en eau, inférieure à 5%, est en faveur de la bonne conservation des poudres de feuilles de *A. mexicana* qui a servi à la préparation des extraits et des sirops. Les teneurs en cendres de notre échantillon sont semblables à celles retrouvées par Guirou (Guirou, 2008).

Les principaux constituants chimiques des extraits, comme les tanins, les oses et holosides des saponosides et des flavonoïdes sont en majorité solubles dans l'eau. Les alcaloïdes ont été caractérisés dans les échantillons aussi bien par les réactions de précipitation que par la chromatographie sur couche mince, avec le réactif de Dragendorff. Dans des travaux précédents, les réactions de caractérisation des alcaloïdes dans le décocté de *Argemone mexicana* ont été négatives (Guirou, 2008). Cette différence est certainement due aux types d'extraits qui ont servi à la caractérisation des alcaloïdes. Il en ressort que les alcaloïdes ne sont pas extraits ou sont faiblement extraits par l'eau. Ceci est très important dans la mesure où certains alcaloïdes de la plante sont reconnus pour leur forte toxicité.

Des résultats du contrôle de qualité chimique des extraits et des sirops, il ressort que les constituants chimiques des extraits se retrouvent dans les sirops. Les deux types de sirops à base des extraits de *A mexicana* sont restés stables pendant tout le temps d'observation. Nous

avons cependant constaté qu'il est plus facile de formuler le sirop avec l'extrait hydro éthanolique qu'avec le décocté aqueux pour différentes raisons : temps de concentration de l'extrait hydro-éthanolique et propriétés de conservation de l'éthanol.

CONCLUSION

les sirops de *Argemone mexicana* présentent un intérêt thérapeutique intéressant dans la prise en charge du paludisme non compliqué.

La production de lots pilote de sirops est en cours. Ces lots serviront à l'évaluation de la tolérabilité et de l'efficacité des sirops avant son utilisation à grande échelle dans la prise en charge du paludisme.

REMERCIEMENTS :

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un projet financé par le Rectorat de l'Université de Bamako.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Diallo, D. Diakité, C., Mounkoro,P.P., Sangaré,D., Graz, B., Falquet J. et Giani S. 2007. La prise en charge du paludisme par les thérapeutes traditionnels dans les aires de santé de Kendié (Bandiagara) et de Finkolo (Sikasso) au Mali, Mali Médical, 22 (4), pp. 1-8.

Graz B, Willcox ML, Diakite C, Falquet J, Dackuo F, Sidibe O, Giani S, Diallo D. 2009. *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications. Trans R Soc Trop Med Hyg. 104(1):33-41.

Guirou C. 2008. Etude de la toxicité sub - chronique de *Argemone mexicana* utilisée dans le traitement traditionnelle du paludisme. Thèse de Pharmacie, FMPOS, Université de Bamako, p82

OUA 1988. Pharmacopée africaine. Méthodes générales d'analyses, Lagos, Vol. 2. p264

Sanogo, R., Maiga, A, Djimé A, Doumbia L, Guirou, C, Diallo, D, et Doumbo, O. 2008. Etude de la toxicité sub-chronique du décocté de *Argemone mexicana* utilisé dans le traitement du paludisme. Pharmacopée et Médecine et Traditionnelles africaines 15, 26 – 31.

Traoré F. 2010. Formulation d'un sirop antipaludique à base de *Argemone mexicana L.* (*Papaveraceae*). Thèse de Pharmacie, FMPOS, Université de Bamako, p82 .

Wagner H., Bladt S. 1996. Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas, second edition, Springer, Berlin, p384.

Willcox ML, Graz B, Falquet J, Sidibé O, Forster M, Diallo D 2007. *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria, Trans R Soc Trop Med Hyg. 101(12):1190-1198.



Figure N°1 : Sirop du décocté aqueux à 20%

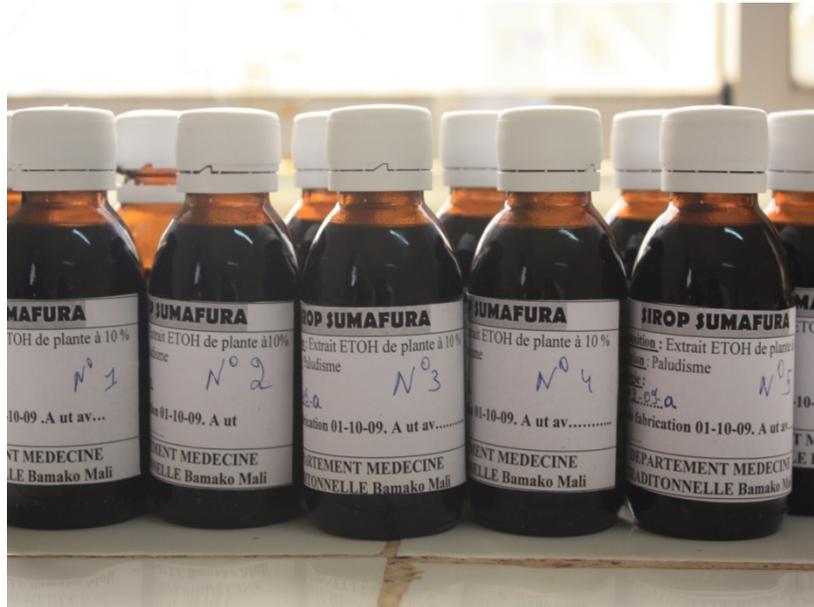


Figure N°2 : Sirop à base de l'extrait hydroéthanolique à 10%