



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Formulation d'un médicament traditionnel amélioré à visée anti-amibienne à base de *Euphorbia hirta* Linn

Ernest DJOKO^{1*}, Rosine Désiré CHOUGOUO¹, Tiffany Carmen NGONDJI² et Denis WOUESSIDJEWE³

¹ Université des Montagnes, Laboratoire de Galénique, Bp 208 Bangangté Cameroun.

² Université des Montagnes, Laboratoire de Pharmacognosie, Bp 208 Bangangté Cameroun.

³ Université Joseph Fourier de Grenoble – UFR de Pharmacie,

Département de Pharmacochimie Moléculaire – UMR 5063, France.

* Auteur correspondant, E-mail: edjoko@udm.aed-cm.org, Tel: +237 691 14 49 28

RESUME

L'arsenal thérapeutique conventionnel de l'amibiase comprend essentiellement des molécules imidazolées présentant beaucoup d'effets secondaires pourtant la médecine traditionnelle africaine dispose de nombreuses recettes efficaces dans la prise en charge de ce fléau. L'objectif de cette étude était de réaliser un médicament traditionnel amélioré à visée anti-amibienne à base de *Euphorbia hirta* Linn. La plante a été récoltée à Bangangté (Ouest-Cameroun) puis identifiée à l'Herbier National du Cameroun. Avant utilisation, elle a été nettoyée à l'eau potable, séchée à l'ombre pendant 3 jours, puis à l'étuve à 50 °C pendant 48 heures. Les différentes formes galéniques anti-amibiennes à base de *Euphorbia hirta* Linn ont été répertoriées, ce qui a mis en évidence l'intérêt d'une forme gélule. Le screening chimique de la plante a révélé la présence de flavonoïdes, de tannins, de stérols, de mucilages et l'absence de certains groupes tels que les alcaloïdes, les triterpènes, les anthocyanes et les leucoanthocyanes. Un dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé par spectrophotométrie à 420 nm en présence du trichlorure d'aluminium. La dose journalière a été exprimée en masse de flavonoïdes en équivalent quercétine. Des lots de gélules ont été réalisés d'après les bonnes pratiques de fabrication officinale. La dose journalière déterminée était de 1g de plante séchée et contenait 3,44 mg équivalents quercétine. Les gélules dosées à 0,86 mg de flavonoïdes totaux en équivalents quercétine ont été soumises aux contrôles pharmaco techniques réglementaires. Les gélules obtenues ayant passé favorablement les tests chimiques et pharmacotechniques étaient aptes à être soumises à des études approfondies en vue d'une AMM qui leur donnerait une position d'alternative aux imidazolés dans la prise en charge de l'amibiase intestinale.

© 2018 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clé: *Euphorbia hirta*, anti-amibien, médicament traditionnel amélioré.

Formulation of an *Euphorbia hirta* Linn improved traditional medicine to fight against amoebiasis

ABSTRACT

The conventional therapeutic arsenal for amoebiasis consists mainly in imidazole molecules with many side effects meanwhile some traditional African medicine recipes are effective for dealing with this scourge.

© 2018 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i2.4>

4014-IJBSCS

The aim of this study was to make an improved traditional medicine with anti-amoebic properties made from *Euphorbia hirta* Linn. The plant was harvested in Bangangté (West-Cameroon) and identified in the National Herbarium of Cameroon. Before use, it was cleaned with potable water, dried in the shade for 3 days and then in an oven at 50 °C for 48 hours. The different anti-amoebic galenic forms of *Euphorbia hirta* Linn were identified and listed so that the interest of the capsules was highlighted. The chemical screening of the plant revealed the presence of flavonoids, tannins, sterols, mucilage and the absence of some groups such as alkaloids, triterpenes, anthocyanins and leucoanthocyanins. A total flavonoid assay was performed spectrophotometrically at 420 nm with aluminum chloride. The determined daily dosage was 1 g of dried plant and contained 3.44 mg quercetin equivalents. Batches of capsules were made according to good manufacturing practice. The capsules containing 0.86 mg of total flavonoids in quercetin equivalents were submitted to regulatory pharmaco-technical controls. The capsules passed favorably the chemical and pharmacotechnical tests and were qualified to be subjected to other studies for the Marketing Authorisation that would give them an alternative position to imidazoles.

© 2018 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *Euphorbia hirta*, anti-amoebic, improved traditional medicine.

INTRODUCTION

L'amibiase est une maladie infectieuse due à un parasite microscopique, un protozoaire hématophage dénommé *Entamoeba histolytica*. Transmise par voie orale, elle entraîne une infection de type gastro-entérite. Elle peut aussi atteindre d'autres organes notamment le foie, les poumons, le cerveau, ce qui rend cette maladie dangereuse (Zougrana, 2009).

Au Cameroun comme dans beaucoup de pays tropicaux, l'amibiase est un vrai problème de santé publique. Dans ces pays, l'herbe *Euphorbia hirta* est connue et largement utilisée avec succès pour combattre l'amibiase. En dehors de son action antiamibienne, la plante possède de nombreuses autres propriétés qui ont été démontrées (Lanhers et al., 2005).

Les travaux de Lanhers et al. (2005) ont montré que cette plante est dénuée de toxicité. Cependant, Elodie Flahaut (2002) avait montré dans ses travaux que la teinture pourrait remplacer avantageusement le métronidazole dans le traitement de l'amibiase, permettant de contourner l'effet antabuse (Descroix et Forest, 2006) souvent observé en raison des boissons alcoolisées locales qui ont beaucoup de succès au sein

des populations, contourner les contre-indications relatives à l'allaitement et au premier trimestre de la grossesse, ainsi que les effets indésirables d'ordre digestif du genre nausées et vomissements (Sanofy, 2012). A ceci s'ajoute l'amélioration de l'observance du traitement par le raccourcissement de la durée du traitement.

Au vu de ces avantages, nous avons voulu, dans la présente étude, mettre au point un Médicament Traditionnel Amélioré à base de *Euphorbia hirta* pour élargir les possibilités de traitement et de lutte contre ce fléau.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel végétal utilisé était constitué des parties aériennes d'*Euphorbia hirta* récolté à Bangangté et identifié à l'herbier national du Cameroun, référencé sous le numero 27952/SRF (Figure 1).

Le matériel de laboratoire comprenait, entre autres : une étuve TAU Steril (TS) Automatic, une balance SCOUT PRO, un broyeur OPTIBLEND, une colonne de tamis, un spectrophotomètre SPECTRUMLAB 752S, un gélulier semi-automatique de 100.

Méthode

Analyse de la plante

Après identification à l'herbier national du Cameroun, les parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) d'*Euphorbia hirta*, récoltées à Bangangté, ont été nettoyées à l'eau potable et étalées pour séchage à l'ombre au laboratoire (à 25 °C) pendant 3 jours puis à l'étuve à 50 °C pendant 48 h. Sur un échantillon passé au mortier, nous avons réalisé le contrôle chimique : les réactions classiques de caractérisation des groupes phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence les groupes de substances présents dans la plante : réaction à la cyanidine pour les flavonoïdes, acide chlorhydrique et réactif de Stiasny pour les tanins, anhydride acétique et acide sulfurique pour les triterpènes et les stéroïdes, réactif de Meyer et réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes, alcool absolu pour les mucilages.

Au regard de la réputation qu'ont les flavonoïdes d'être actifs sur les bactéries et les protozoaires, nous avons choisi ce groupe chimique comme traceur pour l'analyse quantitative. Après l'extraction par l'éthanol 70% (Méthode de Bruneton 1999), nous avons procédé au dosage spectrophotométrique des flavonoïdes à 420 nm en présence du trichlorure d'aluminium en solution éthanolique à 2%. Une gamme d'étalonnage de la quercétine (1 à 25 µg/ ml) nous a permis d'exprimer le résultat en mg d'équivalent quercétine.

Choix de la forme galénique

Le répertoire des formes galéniques anti-amibiennes d'*Euphorbia hirta* existantes avec leurs inconvénients nous a orienté vers la mise au point des gélules. En effet :

- Pour le décocté décrit par Lanhers et al. (2005), il faut ajouter ½ cuillerée à café de poudre à 8 cuillerées de mélasse ;
- Le décocté de Elodie Flahaut (2002) est proposé pendant 3 jours consécutifs ;

- La spécialité DYSENTERAL* du Mali, citée par Bruneton (2006) est proposée en sachets unidoses de 10 g.
- Au Burkina-faso, la POUDRE E* citée Diallo et Falquet (2007) se prend à la dose de 1 cuillerée à café 3 fois par jour dans ½ verre d'eau ;
- Au Sénégal, la spécialité dénommée MBALTISANE* citée par Diallo et Falquet (2007) est également une tisane ;
- AMIBEX* proposé par un pharmacien Burkinabé et citée par Diallo et Falquet (2007) est également un soluté sucré ;
- La teinture proposée par Flahaut (2002) se prend à la dose d'une cuillerée à café 3 fois par jour pendant 3 jours.

Pour le malade, ces décoctés et la teinture présentent l'inconvénient d'une préparation laborieuse et d'une conservation difficile.

La poudre multi dose et les tisanes en sachets ne permettent pas de maîtriser la dose de principe actif prise par le malade en raison des difficultés de contrôle de la température de l'eau et du temps d'infusion. La solution aqueuse sucrée est de préparation laborieuse et de conservation délicate.

Une forme sèche type gélule serait de bonne conservation, de manipulation aisée et de fabrication facile et réalisable même en officine de pharmacie.

Détermination de la dose journalière

Les travaux de Ouedraogo (2002) et nos entretiens avec les tradipraticiens ont révélé qu'il faut 4 branches de plante entière fraîche par jour pendant 3 jours pour le traitement des amibes chez l'adulte, la dose enfant étant la moitié.

Sur cette base, nous avons récolté 10 lots de 4 branches fraîches correspondant ainsi à 10 doses journalières. Après avoir pesé les branches, nous les avons séchées à l'étuve à 50° C jusqu'à poids constant puis, nous avons considéré la masse moyenne des 10 doses comme dose journalière.

Fabrication des gélules

Après pulvérisation de la plante, nous avons procédé au calibrage de la poudre sur une colonne de Tamis d'Analyse Granulométrique de la pharmacopée puis avons choisi la fraction du tamis n°125 pour les gélules.

Sur un échantillon de la poudre, nous avons recherché la teneur en eau par la méthode gravimétrique, puis nous avons dosé les flavonoïdes totaux par spectrophotométrie à 420 nm dans l'alcool 70° en présence du trichlorure d'aluminium à 2% dans l'alcool 70°. Grâce à une gamme d'étalonnage de la quercétine (1 à 25 µg/ml), nous avons exprimé le résultat en équivalents quercétine. La dose journalière de poudre a ainsi été convertie en équivalent quercétine.

Prenant comme excipients l'amidon de blé et le stéarate de magnésium (diluant et lubrifiant), nous avons procédé au remplissage des gélules sur un gélulier semi-automatique de 100 en choisissant une taille qui permette de donner la dose quotidienne pédiatrique en 2 prises de 1 gélule, ce qui équivalait pour l'adulte à 2 prises de 2 gélules.

Les essais d'uniformité de masse, d'uniformité de teneur et de temps de désagrégation ont ensuite été menés conformément à la pharmacopée européenne, puis nous avons conditionné les gélules dans des piluliers en chlorure de polyvinyle à raison de 12 unités par boîte.

Ces gélules que nous avons choisies d'appeler AMIBIAL* ont été conservées en vue des études complémentaires.



Figure1 : *Euphorbia hirta* récolté à Bangangté.

RESULTATS

La plante récoltée à Bangangté a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun et référencée sous le N°27952/SRF.

Comme le montre le Tableau 1, les flavonoïdes, les tanins et les mucilages sont les composés majeurs tandis que les alcaloïdes, les terpènes et les anthocyanes sont absents.

La teneur moyenne en eau sur 4 échantillons s'élevait à 6,56% ± 0,08%, qualifiant la poudre pour une utilisation pharmaceutique.

Le Tableau 2 montre que la masse moyenne de 10 doses journalières adulte est de 1g de plante sèche. La dose journalière de plante pour un adulte correspond donc pour cette poudre à 1g de plante entière sèche.

La spectrophotométrie et la gamme d'étalonnage (Tableau 3) ont permis de tracer la droite d'étalonnage de la quercétine (Figure 2) en opérant à 420 nm en présence de trichlorure d'aluminium en solution à 2% dans l'éthanol 70%. La droite d'étalonnage a permis d'établir que 1g de poudre contient 3,44 mg de flavonoïdes en équivalent quercétine. Ainsi, la dose journalière de 1g de poudre équivaut à 3,44 mg de flavonoïdes en équivalent quercétine. Cette dose journalière adulte a été équitablement répartie dans 4 gélules de façon qu'un adulte la prenne en 2 prises de 2 gélules contenant chacune 0,86 mg de flavonoïdes totaux en équivalent quercétine, et un enfant 2 prises de 1 gélule.

La table de remplissage des gélules a indiqué que la quantité de poudre nécessaire

pour 0,86 mg équivalent quercétine (ici 250 mg de poudre de plante) est compatible avec les gélules n° 1 moyennant l'ajout de 0,75 ml de diluant (amidon).

Le remplissage a été réalisé par lots de 100 gélules sur un gélulier semi-automatique de 100.

Le contrôle organoleptique montre des gélules (Figure 3) de couleur bleu/blanc sans défauts physiques (non cabosées, non poudreuses).

Le Tableau 4 montre les masses individuelles des 20 gélules prélevées au hasard pour le contrôle de l'uniformité de masse. La moyenne des 20 masses est de 0,28 g conduisant à un écart limite acceptable de 10% (soit 0,028 g) et aux limites de 0,31 g et 0,25 g. Aucune gélule de l'échantillon prélevé n'a une masse qui sort des limites $m \pm e$ tolérables par la Pharmacopée Européenne (2016).

Le temps de désintégration de ces gélules était de 9 mn 53 s, ce qui est conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne (2016).

Les gélules ont été conditionnées par 12 dans des piluliers opaques blancs en chlorure de polyvinyle. Dans chaque pilulier a été insérée une pastille dessiccative servant de protection contre l'humidité.

Une étiquette portant le nom proposé (AMIBIAL*), l'indication et le mode d'emploi a été apposée sur chaque pilulier.

Tableau 1: Résultat du screening phytochimique de *Euphorbia hirta* de Bangangté.

Groupes chimiques	Résultats
Flavonoïdes	+++
Leucoantocyanes	-
Antocyanes	-
Tannins	++++
Tannins catéchiques	++++
Tannins galliques	++++
Terpènes	-
Stérols	++
Alcaloïdes	-
Mucilages	+++

Tableau 2: Masse des échantillons de dose journalière.

	Masse plante fraîche (g)	Masse après séchage (g)
E1	4,146	0,880
E2	4,821	0,971
E3	4,965	1,152
E4	4,309	1,042
E5	4,520	1,021
E6	4,490	0,940
E7	4,070	0,892
E8	4,800	1,110
E9	4,530	0,938
E10	4,760	1,121
Moyenne (g)	4,541 ±0,082	1,00 ±0,01

Tableau 3: Gamme d'étalonnage de la quercétine.

Solution de quercétine à 25 µg /ml (ml)	4	3	2	1	0,2
Ethanol 70 % (ml)	1	2	3	4	4,8
Volume final en ml	5	5	5	5	5
Concentration en µg /ml	20	15	10	5	1
D.O. étalon	0,498	0,369	0,272	0,135	0,036

Tableau 4: Test d'uniformité de masse : Masses des gélules.

N°	Masses (g)	N°	Masses (g)
1	0,29	11	0,30
2	0,27	12	0,28
3	0,28	13	0,30
4	0,27	14	0,26
5	0,29	15	0,29
6	0,28	16	0,30
7	0,28	17	0,26
8	0,29	18	0,30
9	0,29	19	0,26
10	0,26	20	0,29

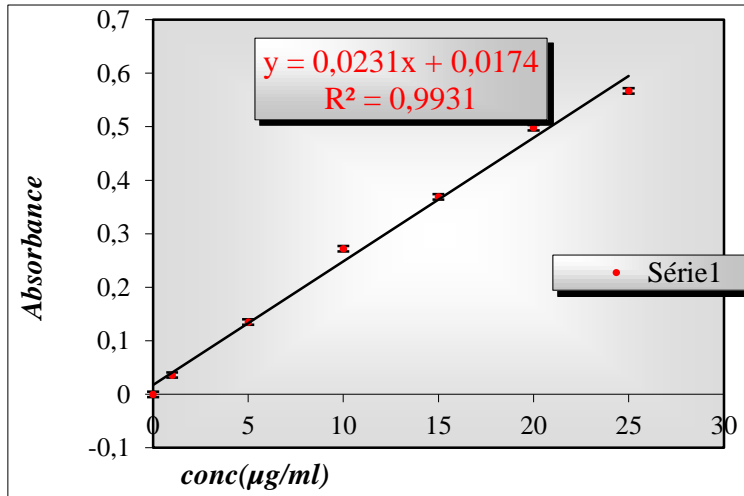


Figure 2: Courbe de la densité optique en fonction de la concentration en quercétine.



Figure 3: Gélules de Amibial* à 0,86 mg équivalent quercétine de Flavonoïdes totaux.



Figure 4: Présentation de Amibial* gélules.

DISCUSSION

Les formes galéniques courantes repertoriées étant surtout liquides et aqueuses laissaient prévoir une préparation laborieuse et d'une conservation difficile. La poudre multi-dose et les tisanes en sachets ne permettent pas de maîtriser la dose de principe actif consommée par le malade. La température de l'eau et le temps d'infusion ne peuvent pas permettre au malade de maîtriser la quantité de principe actif qu'il ingère. Il aurait été possible de faire un sirop avec du sorbitol 70% ou de la glycérine, mais l'action laxative de ces excipients serait mal venue pour la fabrication d'un médicament anti diarrhéique et anti-amibien. Il aurait aussi été possible de faire un sirop avec la carboxyméthylcellulose, mais celle-ci pose souvent des problèmes de conservation : développement de microbes et champignons (Le Hir 2001). Pour notre Médicament Traditionnel Amélioré, la forme gélule choisie permet de contourner toutes ces difficultés.

Les excipients utilisés pour la fabrication des gélules (amidon et stéarate de Mg) n'ont pas d'effet notoire signalé (Allo et al., 2005). La dose journalière déterminée de 1 g de plante séchée est équivalente à celle trouvée par Ouédraogo en 2002. Le contenu des gélules a été exprimé en masse de flavonoïdes totaux traduite en équivalent quercétine plutôt qu'en masse de poudre. Ainsi, lors des fabrications ultérieures, on dosera les flavonoïdes dans le lot de poudre à utiliser pour en déduire la quantité de poudre correspondant à 0,86 µg flavonoïdes à introduire dans chaque gélule ; ceci permet de gérer le problème de la variation de la concentration des gélules en flavonoïdes en fonction des saisons et des sites de collecte.

Les gélules sont conservées dans des flacons portant des étiquettes avec toutes les mentions indispensables pour l'utilisation du médicament. La capsule dessiccatrice permettra d'améliorer la conservation des

gélules. La courte durée de traitement (3 jours) est de nature à motiver le malade pour une bonne observance du traitement.

Les résultats obtenus pour le screening chimique montrent une présence abondante de flavonoïdes et de tannins (tannins galliques et catéchiques), une présence modérée de stérols, et une absence de triterpènes et alcaloïdes. Ces résultats confirment ceux déjà décrits en 2005 par Lanhers et al.

Euphorbia hirta de Bangangté ne contient ni anthocyanes, ni leuco anthocyanes, ni alcaloïdes. Cette différence peut être mise sur le compte de la variabilité en fonction des écosystèmes.

Conclusion

A l'issue de ce travail, nous affirmons qu'il est possible de mettre à la disposition de nos malades et des praticiens de la santé un nouveau médicament pour le traitement de l'amibiase : des gélules à base de *Euphorbia hirta*. Ces gélules dosées à 0,86 mg équivalent quercétine de flavonoïdes totaux devaient être efficaces pour l'adulte à la posologie de 2 gélules 2 fois par jour. Elles sont d'utilisation simple pour une durée de traitement facilement acceptable.

CONFLITS D'INTERETS

Aucun conflit d'intérêts n'existe par rapport à cet article

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

ED et TCN ont confectionné les gélules. RDC a procédé au dosage des flavonoïdes. DW était le superviseur des travaux.

REFERENCES

- Allo O, Blanc P. Dalmasso MA. 2005. *Pharmacie Galénique BP* (2^{ème} éd.). Groupe Liaisons Santé : Paris.

- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales* (3^{ème} éd). TEC et TOC : Paris ; 1120.
- Descroix V. Forest A. 2006. Revue odontostomatologique tome35, N°2 2006 P113-120.
- Diallo D, Falquet JJ. 2007. Le rôle des plantes dans la lutte contre les maladies tropicales : une perspective africaine.
- Flahaut E. Comment développer la production locale des médicaments traditionnels. Table ronde Remed-JPIP, 2002.
- Lanhers MC, Nicolas JP, Fleurentin J, Weniger B. 2005. *Euphorbia hirta* L.: Monographie de la plante. *Ethnopharmacologia*, **36**: 9-23.
- Le Hir A. 2001. *Pharmacie Galénique. Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments* (8^{ème} éd). Masson : Paris.
- Ouèdraogo P. 2002. Le meilleur remède contre la dysenterie amibienne : l'*Euphorbia hirta*.
- Pharmacopée Européenne. 2016. Essai pharmaco-techniques pour les formes orales, (9^{ème} éd, Tome 1). Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé.
- Pousset LD. 2006. Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Médecine Tropicale*, **66** : 606.
- Zoungrana EI. 2009. L'amibiase. Votre santé, Maladie tropicale.