



HAL
open science

**CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE, ACTIVITE
ANTIOXYDANTE ET ANTIPLASMODIALE IN
VITRO DE CINQ PLANTES UTILISEES
TRADITIONNELLEMENT EN CÔTE D'IVOIRE
CONTRE LE PALUDISME**

Karim Tuo

► **To cite this version:**

Karim Tuo. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE, ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIPLASMODIALE IN VITRO DE CINQ PLANTES UTILISEES TRADITIONNELLEMENT EN CÔTE D'IVOIRE CONTRE LE PALUDISME. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, Abidjan, 2015. Français. NNT : . tel-03069680

HAL Id: tel-03069680

<https://hal.science/tel-03069680>

Submitted on 15 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright



REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Laboratoire de
Pharmacodynamie-Biochimique

Année Universitaire
2014-2015

THESE

Présentée pour l'obtention du Titre de Docteur de
l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité: Pharmacologie des Substances Naturelles

Numéro d'ordre
943/2015

M. TUO KARIM

CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE, ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIPLASMODIALE *IN VITRO* DE CINQ PLANTES UTILISEES TRADITIONNELLEMENT EN CÔTE D'IVOIRE CONTRE LE PALUDISME

Soutenue publiquement
le, 13 / 06 / 2015

Commission du jury

M. AHONZO NIAMKE L.S.,	Professeur Titulaire	Université FHB	Président
M. COULIBALY ADAMA,	Professeur Titulaire	Université FHB	Directeur
M. ZIRIHI GUEDE NOEL,	Professeur Titulaire	Université FHB	Rapporteur
M. BEDI S. GUSTAVE,	Maitre de Conférences	Ecole Normale Sup.	Rapporteur
M. LOUKOU YAO G.,	Maitre de Conférences Agrégé	Université FHB	Examinateur
Mme KOUSSEMON MARINA,	Maitre de Conférences	Universté Nangui A	Examinateur

DEDICACE

À

mes défunts frères Issouf et Issa

à

tous ceux qui, trop tôt, ont été arrachés à l'affection des leurs

à

la science afin que cela ne se reproduise plus jamais

REMERCIEMENTS

Au terme de cette thèse, je me permets de prendre quelques temps de rétrospection pour exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont accompagné et soutenu pour mener à bien ce travail de recherche. En effet, ce travail n'aurait pu se réaliser correctement sans la présence de ces personnes qui m'ont entourées.

*Je profite de l'occasion, pour exprimer mon profond respect et mon immense gratitude au Professeur **DJAMAN Allico Joseph**, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant dans son Laboratoire. De ses écrits lus tant de fois, son nom aura guidé mon parcours. J'ai notamment pu apprécier ses riches connaissances dans de nombreux domaines, sa passion pour le Plasmodium et son esprit d'ouverture.*

*Je tiens à remercier le Professeur **DOSSO Mireille** et le Docteur **BASSIROU Banfoh**, Directeur de Recherches, respectivement Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Directeur du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, pour m'avoir accueilli au sein de leur institut de recherche de renommée internationale et m'avoir permis de faire mon travail de thèse.*

*Je remercie le Professeur **COULIBALY Adama**, mon Directeur de thèse, de m'avoir fait confiance dès le DEA puis en thèse en acceptant de diriger mes travaux de recherche et en me faisant bénéficier de son expérience, ses encouragements, ses soutiens administratifs et académiques.*

*Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur **AHONZO Niamké L.S.** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur **ZIRIHI Guédé Noel** en acceptant d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour l'ensemble de vos remarques et réflexions ainsi que pour votre disponibilité qui m'a permis de partager d'enrichissantes conversations. Je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude*

*J'adresse mes plus vifs remerciements au Docteur **BEDI Sahouo Gustave**, Maître de conférences, pour avoir accepté de juger ce travail. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant d'en être l'un des rapporteurs.*

*Je remercie le Docteur **LOUKOU Yao Guillaume**, Maître de conférences Agrégé, d'avoir bien voulu porter de l'intérêt à ce travail et d'accepter de juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.*

*Je remercie également le Docteur **KOUSSEMON Marina**, Maitre de conférences, d'avoir bien voulu porter de l'intérêt à ce travail et d'accepter de siéger dans mon jury. Soyez assurée de ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Toute ma gratitude et mes remerciements au Docteur **BIDIE Alain Dit Philippe**, Maitre de conférences. J'ai beaucoup appris auprès de vous en si peu de temps. Merci pour la célérité avec laquelle vous avez toujours répondu à mes sollicitations. Votre contribution aussi bien dans la forme que dans le fond m'a été très précieuse.*

*Je voudrais remercier le Docteur **Ronan JAMBOU**, Directeur de Recherches de l'Institut Pasteur de Paris pour ses suggestions et contributions qui m'ont permis d'améliorer notablement ce travail de recherche.*

*Je voudrais avoir l'honneur d'exprimer au Professeur **N'GUESSAN Jean David** ma profonde gratitude pour sa totale disponibilité. Ses relectures m'ont été fort bénéfiques. Je le remercie d'avoir toujours répondu à mes sollicitations.*

*Mes plus vifs remerciements vont à l'endroit du Docteur **BAHI Calixte**; vous n'avez pas été seulement un enseignant, mais aussi un père toujours attentif à nos préoccupations quotidiennes depuis le DEA puis la thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Docteur **OUATTARA Karamoko**. Sans vous un tel travail n'aurait pu être abattu. Votre efficacité et votre disponibilité forcent mon admiration. Votre assistance m'a été très précieuse. Merci beaucoup de votre investissement et de votre présence à mes côtés depuis le DEA puis la thèse. Recevez l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je suis profondément reconnaissant au Docteur **TOURE André Offianan**, Chef du Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Vous m'avez accueilli dans votre département, me permettant ainsi de poursuivre mes activités. Quel privilège d'avoir pu travailler à vos côtés et bénéficier de votre esprit d'analyse et votre bienveillance. Votre extrême gentillesse, votre disponibilité infaillible et toute l'aide et les conseils indispensables fondent mon admiration.*

*Je suis extrêmement reconnaissant au Docteur **Sylvain BEOUROU**. Vous m'avez fait l'insigne honneur d'encadrer ce travail passionnant et j'espère en retour être digne de la confiance que vous m'avez accordée. Je tiens à vous remercier pour le métier appris à vos côtés et les réflexes acquis. Votre engagement, votre aide et votre soutien quotidien durant toutes ces années ne m'ont jamais*

fait défaut. Votre intérêt et votre guidance m'ont été fort bénéfiques. Ce travail est le vôtre. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

*Merci au Docteur **SILUE Kigbafory** et au Docteur **Xavier DING** pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé dans votre Laboratoire au Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire. Merci de m'avoir appris les différentes techniques de culture et surtout les bonnes pratiques au laboratoire. Je souhaite que cette collaboration initiée se poursuive. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je n'oublierai jamais ce que le Docteur **MEITE Souleymane** a fait pour moi depuis mon inscription au DEA de Pharmacologie des Substances Naturelles puis tout au long de la réalisation de cette thèse. Ton aide technique a beaucoup contribué à la réalisation de ce travail. Trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Merci au Docteur **Jean Luc Aboya MOROH** et au Docteur **AKO AKO Aristide Beranger** dont les critiques constructives m'ont été d'un grand intérêt.*

*Je n'oublie pas le doctorant **TANO Konan Dominique**. Merci pour tes conseils avisés. Merci non seulement pour ton aide matériel mais aussi pour m'avoir initié aux techniques de culture in vitro de *Plasmodium falciparum*.*

*Je ne pourrai jamais remercier assez tous les **enseignants du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique** pour les efforts que vous déployez pour notre formation. Merci pour la formation que vous m'avez donné.*

*Merci à Feu Professeur **AKE-ASSI Laurent**, à monsieur **ASSI Jean** du Centre National Floristique de Côte d'Ivoire pour votre contribution à l'identification botanique des plantes et aux **tradipraticiens** pour leur franche collaboration.*

*Je n'oublie pas l'ensemble du personnel du Département de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et plus particulièrement le **Dr IRA Bonouman**, le **Dr Angora Etienne** et les ingénieurs des techniques sanitaires **Issiaka Bassinka**, **Soumahoro** et **Madame Sylla**.*

*Merci aux étudiants chercheurs: Dans le désordre: **Eric ADJI**, **YAO S. Stephane**, **KOFFI David**, **Baba COULIBALY**, **OUATTARA K. Jean**, **TOTY Abalé**, **Fernique KONAN**, **AYEBA Edwidge**, **BAHI Alexis**, **YORO Benoit**, **YEO Sounta**, **LEBRI Marius**, **KONE Monon**, **MARA Emmanuelle Sarah**, **Serge SAHI**, **GNONDJUI A. Albert...**: Autant de noms que de souvenirs riches et impérissables. Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous les chercheurs*

et apprentis-chercheurs croisés lors de mes passages dans les divers laboratoires pendant ces longues années d'études. Merci pour les bons moments passés ensemble. C'était beaucoup de bonheur et de joie quotidienne.

Merci à mes amis KAHOU Parfait, DOUE Obin, TAKY Anderson, KOUADIO Yao Faustin.
Beaucoup de doutes, d'hésitations et de passage à vide se sont souvent dissipés grâce à leur soutien. Soutiens infaillibles dans les bons comme dans les mauvais moments, qui me suivent de près ou de loin dans les différentes étapes de ma vie. Je vous adresse mes plus affectueuses pensées.

En dernier lieu, mais mon remerciement n'en est que plus fort à ma famille qui m'a soutenue:

Mon père

Je veux juste te dire merci. Merci de m'avoir laissé la liberté de faire mes choix et de m'avoir fait confiance toutes ces longues années d'études. Ce travail de thèse est l'expression de la confiance placée en moi. J'aimerais tellement la mériter.

Ma mère

Merci! Autant de merci que de larmes versées pour moi. Ta dignité n'a d'égale que tes souffrances et privations muettes endurées. Puisse Dieu, que tes sacrifices pour le bonheur de tes enfants soient pour nous source d'inspirations. Je n'ai rien fait d'extraordinaire, j'ai juste essayé de mériter tout ce que tu as subi à cause de moi.

Mes frères et sœurs: Adama, Chata, Djeneba, Fatim, Yacou, Mamadou, Awa, Seydou, merci
pour vos soutiens. Loin de mes yeux mais bien dans mon cœur.

A ma chérie Lydie

Celle qui me ressemble le plus. Merci pour ton soutien et ta compréhension.

Merci à tous ceux que je n'ai pas nommés mais qui contribuent à faire de ma vie ce qu'elle est...

Merci à tous pour tout ...

AVANT-PROPOS

Le paludisme ou malaria est une endémie parasitaire majeure qui sévit dans les régions tropicales et sub-tropicales de l'hémisphère sud. Plus de deux milliards de personnes sont susceptibles de contracter la maladie à travers le monde. Actuellement, malgré l'arsenal thérapeutique existant, peu de médicaments sont disponibles sur le marché et accessibles aux populations concernées. De plus, le développement de résistance du parasite aux traitements actuels renforce le besoin urgent de trouver de nouveaux antipaludiques.

C'est dans ce cadre que ce travail de thèse a été initié au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique et poursuivi conjointement à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et au Centre Suisse de Recherches Scientifiques de Janvier 2012 à Aout 2014. Il s'inscrit dans le programme de recherche du Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique dont l'objectif est de valoriser les plantes médicinales de notre pharmacopée et surtout de rechercher de nouvelles molécules à partir de plantes pouvant servir de nouvelles têtes de séries de médicaments.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I-ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I-1- Généralité sur le <i>Plasmodium falciparum</i>.....	5
I-1-1-Pathologie.....	5
I-1-1-1-Définition.....	5
I-1-1-2-Historique de la maladie.....	5
I-1-2-Parasite et le vecteur.....	8
I-1-2-1-Le parasite.....	8
I-1-2-2-Caractéristiques des espèces infectant l’homme.....	8
I-1-2-3-Cycle du parasite.....	9
I-1-2-4-Le vecteur: l’anophèle femelle.....	11
I-1-3-Symptomatologie.....	12
I-1-3-1-Accès de primo-invasion.....	12
I-1-3-2-Invasion.....	12
I-1-3-3-Complications du Paludisme.....	12
I-1-4-Traitement.....	13
I-2- Antipaludiques.....	14
I-2-1-Classification des antipaludiques.....	14
I-2-1-1-Les schizonticides.....	12
I-2-1-2-Les gamétocytocides.....	15
I-2-2- Chimiorésistance du <i>Plasmodium</i>	15
I-2-2-1-Définition.....	15
I-2-2-2-Mécanismes de résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques.....	15
I-2-3-Facteurs favorisant la résistance.....	18
I-2-3-1-Facteurs sociaux.....	18
I-2-3-2-Facteurs pharmacologiques.....	18
I-2-4-Etude de la résistance du <i>Plasmodium</i>	19
I-2-4-1-Les tests <i>in vivo</i>	19
I-2-4-2-Les tests <i>in vitro</i>	20
I-2-4-3-Les marqueurs génomiques de la résistance.....	20
I-3-De la plante aux médicaments.....	20
I-3-1-Ethnopharmacologie.....	20
I-3-2-Historique de la thérapeutique antipaludique.....	21

I-3-2-1-Avant la quinine.....	21
I-3-2-2-De la quinine à nos jours.....	22
I-4-Généralités sur les plantes étudiées.....	24
I-4-1- <i>Diospyros monbuttensis</i> Gürke (<i>Ebenaceae</i>)	24
I-4-1-1-Description.....	24
I-4-1-2-Localisation, utilisations et phytochimie.....	24
I-4-2- <i>Dialium dinklagei</i> (<i>Caesalpinaceae</i>).....	26
I-4-2-1- Description.....	26
I-4-2-2- Localisation, utilisations et phytochimie.....	26
I-4-3- <i>Newbouldia laevis</i> (P. Beauv.) Seemann ex-Bureau.....	28
I-4-3-1-Description.....	28
I-4-3-2- Localisation, utilisations et phytochimie.....	28
I-4-4- <i>Cnestis ferruginea</i> Vahl exDC	30
I-4-4-1-Description.....	30
I-4-4-2- Localisation, utilisations et phytochimie.....	30
I-4-5- <i>Trema orientalis</i> (L.) Blume (<i>Ulmaceae</i>)	32
I-4-5-1- Description.....	32
I-4-5-2- Localisation, utilisations et phytochimie.....	32
I-5-Stress oxydant.....	34
I-5-1-Définition.....	34
I-5-2- Radicaux libres.....	34
I-5-2-1- Principaux radicaux libres.....	34
I-5-2-2- Principales sources de production des radicaux libres	35
I-5-2-3-Dommages des ERO sur les biomolécules.....	36
I-5-3-Systèmes antioxydants.....	37
I-5-3-1-Systèmes enzymatiques.....	38
I-5-3-2-Systèmes non enzymatiques.....	38
I-5-4-Les pathologies liées au stress oxydant.....	40
I-5-5-Le stress oxydatif et paludisme.....	40
I-5-6-Rôle controversé des antioxydants dans l'action de l'artémisinine.....	41
II-MATERIEL ET METHODES.....	43
II-1-Matériel.....	44
II-1-1-Matériel végétal.....	44
II-1-2-Matériels et réactifs pour les tests phytochimiques et antioxydantes.....	44

II-1-3-Matériel, milieux de culture et réactifs pour les tests <i>in vitro</i>	44
II-1-4-Matériel biologique.....	45
II-2-Méthodes.....	45
II-2-1-Enquête ethnobotanique, recherches bibliographiques et sélection des plantes étudiées...	45
II-2-2-Méthode d'extraction.....	46
II-2-3-Etudes phytochimiques.....	52
II-2-3-1-Criblage phytochimique.....	52
II-2-3-2-Dosage des phénols, flavonoïdes et tannins.....	53
II-2-4-Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	55
II-2-4-1-Activité antiradicalaire: Test qualitatif du DPPH.....	55
II-2-4-2-Mesure du pouvoir anti-radicalaire.....	55
II-2-4-3-Mesure du pouvoir réducteur.....	56
II-2-4-4-Mesure du pouvoir chélateur.....	56
II-2-4-5-Analyse statistique.....	57
II-2-5-Tests biologiques.....	57
II-2-5-1-Tests réalisés sur <i>Plasmodium falciparum</i>	57
II-2-5-1-1-Culture continue.....	57
II-2-5-1-2-Culture <i>ex vivo</i>	62
II-2-5-2-Etude de la combinaison d'extraits antipaludiques.....	71
II-2-5-3-Tests d'hémolyse <i>in vitro</i>	74
III-RESULTATS.....	76
III-1-Enquête ethnobotanique, recherches bibliographiques et sélection des plantes étudiées...	77
III-2-Résultats des études phytochimiques et activité antioxydante.....	84
III-2-1-Rendements des extractions.....	84
III-2-2-Résultats des tests Tri-phytochimiques.....	87
III-2-3-Teneur en polyphénols des plantes testées.....	90
III-2-3-1-Teneurs en phénols totaux.....	90
III-2-3-2-Dosage des flavonoïdestotaux.....	90
III-2-3-3-Dosage des tannins.....	90
III-2-4-Activité antioxydante.....	94
III-2-4-1-Pouvoir chélateur.....	94
III-2-4-2-Pouvoir réducteur.....	97
III-2-4-3-Pouvoir inhibiteur du radical DPPH.....	100
III-2-5-Tests biologiques.....	106

III-2-5-1-Tests d'activité antipaludique	106
III-2-5-2-Tests de combinaison.....	109
III-2-5-3-Tests d'activité hémolytique <i>in vitro</i>	111
IV-DISCUSSION.....	114
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125

ABREVIATIONS

ACT: Associations Thérapeutiques à base d'Artemisinin

ATCC: American Type Culture Collection

CAT: Catalase

CCM : Chromatographie sur Couches Minces

CF : *Cnestis ferruginea*

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50 %

CNF:Centre National de Floristique

CQ : Chloroquine

DD : *Dialium dinklagei*

DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

DHFR : Dihydrofolate synthétase

DHPS : Dihydroptéroate synthétase

DM : *Diospyros monbuttensis*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO: Densité Optique

DPPH: 2,2'-Diphényl-1-picryl hydrazyl

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERO: Espèces Réactives Oxygénées

GPx : Glutathion Peroxydase

GRP : Globules Rouges Parasités O+

GRS : Globules Rouges Sains O+

GSH: Glutathion

LDH : Lactate Déshydrogénase

MTA : Médicaments Traditionnels Améliorés

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NL : *Newbouldia laevis*

NOS: Oxyde Nitrique Synthétase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymérase Chain Reaction

QBC : Quantitative Buffy Coat

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

SOD: Superoxyde Dismutase

TO : *Trema orientalis*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique des pays et territoires affectés par le paludisme	7
Figure 2: Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i>	10
Figure 3: Position des différentes mutations de PfCRT identifiées à ce jour	17
Figure 4: <i>Cinchona calisaya</i> Wedd.....	23
Figure 5: Feuille de <i>Diospyros monbuttensis</i>	25
Figure 6: Feuille de <i>Dialium dinklagei</i>	27
Figure 7: Feuilles et fleurs de <i>Newbouldia laevis</i>	29
Figure 8: Feuilles et fruits de <i>Cnestis ferruginea</i>	31
Figure 9: Feuille de <i>Trema orientalis</i>	33
Figure 10: Schéma d'obtention de l'extrait de décoction	47
Figure 11: Schéma d'obtention des extraits hexanique, méthanolique et aqueux.....	49
Figure 12: Partitions liquide-liquide avec le diethylether, le butanol, l'acétate d'éthyle et l'eau	51
Figure 13: Bouteilles d'azote liquide utilisées pour la conservation des souches plasmodiales.....	60
Figure 14 : Boîtes de culture de <i>Plasmodium falciparum</i>	61
Figure 15 : Plan de plaque pour des 20 extraits bruts et la chloroquine.....	67
Figure 16: Plan de plaque des extraits après partition liquide-liquide.....	68
Figure 17: Spectrofluorimètre (Spectra max GEMINI XPS) utilisé pour la mesure de l'activité antipaludique.....	69
Figure 18: Régression non-linéaire, avec 100% et 0%, correspondant respectivement à l'effet maximal (E_{C_0}) et effet minimal (E_{min}).....	70
Figure 19: Plan de plaque pur l'étude des combinaisons.....	72
Figure 20: Représentation graphique des isobogrammes: Les différents effets combinatoires pouvant être observés.....	73
Figure 21: Répartition des plantes utilisées contre le paludisme en Côte d'Ivoire en fonction de leur activité.....	82
Figure 22: Rendement des différents extraits bruts des plantes étudiées.....	85
Figure 23: Rendement des différents extraits après partition.....	86
Figure 24 : Teneurs en phénols des différents extraits des plantes étudiées	91
Figure 25 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de plantes étudiées	92
Figure 26 : Teneurs en tannins des différents extraits de plantes étudiées	93
Figure 27: Courbes d'évolution du pouvoir chélateur en fonction de la concentration	95

Figure 28 : Courbes d'évolution du pouvoir réducteur en fonction de la concentration.....	98
Figure 29 : Courbes d'évolution du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration....	101
Figure 30 : Tache jaune sur fond violet indiquant l'activité anti radicalaire des extraits bruts des plantes étudiées	104
Figure 31: Tache jaune sur fond violet indiquant l'activité anti radicalaire des partitions ayant de bonnes activités antiplasmodiales	105
Figure 32 : Isobogramme de la combinaison entre les extraits F ₃ de <i>Dialium dinklagei</i> et F ₂ de <i>Cnestis ferruginea</i>	110
Figure 33: Activité hémolytique des extraits versus le triton X-100.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Plantes utilisées en Côte d'Ivoire contre le paludisme.....	78
Tableau II : Plantes sélectionnées.....	82
Tableau III: Résultats des tests phytochimiques des extraits bruts des plantes étudiées	88
Tableau IV: Résultats des tests phytochimiques des partitions ayant montré de bonnes activités antipaludiques	89
Tableau V: Pouvoir chélateur (CI ₅₀) des extraits des plantes étudiées	96
Tableau VI : Pouvoir réducteur (EC _{0,5}) des extraits des plantes étudiées.....	99
Tableau VII: Pouvoir inhibiteur (CI ₅₀) des extraits des plantes étudiées	102
Tableau VIII: Résultats des tests antiplasmodiaux des extraits bruts des plantes étudiées....	107
Tableau IX: Résultats des tests antiplasmodiaux des partitions des plantes étudiées.....	108
Tableau X: Résultats des tests d'activités hémolytiques des plantes étudiées	113

ANNEXES

Annexe I : Fiche d'enquête

Annexe II: Autorisation du comité national d'éthique et de la recherche

Annexe III: Exemple de régression non-linéaire obtenue après analyse des données

PUBLICATIONS TIREES DE LA THESE

- **Tuo Karim**, Béourou Sylvain, Touré A.Offianan, Ouattara Karamoko, Silué Kigbafori D., Tano Konan D., Adagba Marius, Koffi David, Serge Yao S., Djaman A. Joseph., Coulibaly Adama, **2015**. Phytochemical screening and polyphenolic contents of *Dialium dinklagei* and *Diospyros monbuttensis*, two Ivorian medicinal plants used to treat malaria. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 2(4): 144-153
- **Tuo Karim**, Béourou Sylvain, Touré A Offianan, Ouattara Karamako, Meité Souleymane, Ako Ako Aristide B, Yao S Stephane, Koffi David, Coulibay Baba, Coulibaly Adama, Djaman A Joseph, **2015**. Antioxidant activities and estimation of the phenols and flavonoids content in the extracts of medicinal plants used to treat malaria in Ivory Coast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1): 862-874
- Béourou Sylvain, **Tuo Karim**, Ouattara Karamoko, Touré André O., Meité Souleymane, Ako Ako A.B., Tano Konan D., Gbessi A. E., Djaman Allico J., Coulibaly Adama, **2014**. Phytochemical screening of some medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire (West Africa). *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 2(6): 919-925

INTRODUCTION

On estime selon l'UNICEF (2007) à 3 milliards, c'est-à-dire près de la moitié de la population mondiale, le nombre de personnes qui vivent dans des régions affectées par le paludisme. En 2012, environ 207 millions de cas dont 627 000 décès imputables au paludisme ont été estimés (OMS, 2013). Plus de 80 % des personnes qui décèdent du paludisme sont des enfants d'Afrique de moins de cinq ans (le paludisme y tue un enfant toutes les 30 secondes) (OMS, 2005). Ces chiffres plus qu'alarmants font du paludisme la première endémie mondiale.

Le développement extrêmement rapide de la résistance aux antipaludiques comme la chloroquine, la méfloquine, la pyriméthamine, l'association proguanil-atovaquone, et même les dérivés de l'artémisinine les plus récents (Jambou *et al.*, 2005, Pradines *et al.*, 2010) nécessite d'identifier au plus tôt de nouvelles molécules.

La défense de l'hôte contre cette infection est contrôlée par un système immunitaire inné et adaptatif. Globalement, les réponses immunitaires visant à contrer les infections à *Plasmodium* consistent en la destruction des parasites, mais ces réponses sont aussi très souvent exacerbées ; ce qui conduit à des dommages chez l'hôte (Lamb *et al.*, 2006). Durant les infections à *Plasmodium* chez l'homme ainsi que chez des modèles expérimentaux (primates, souris), un fort stress oxydatif est généré, en partie dû au métabolisme des composants riches en fer (Schwarzer *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2009). Une des conséquences du paludisme consiste en une diminution des enzymes anti-oxydantes tels que la catalase, la GSH (Glutathion) peroxydase, les SOD (Superoxyde Dismutase), le GSH et bien d'autres (Mathews & Selvam, 1991; Delmas-Beauvieux *et al.*, 1995; Erel *et al.*, 1997; Luersen *et al.*, 2000) ainsi qu'en une augmentation de la production des ERO (Espèces Réactives Oxygénées). En effet, les faibles niveaux d'enzymes antioxydantes observés durant la phase aiguë du paludisme seraient attribués au fait qu'une activité enzymatique élevée est nécessaire afin de protéger et régénérer les érythrocytes durant l'hémolyse causée par une production excessive de radicaux superoxyde (Delmas-Beauvieux *et al.*, 1995, Pincemail *et al.*, 1999). La concentration sérique du malondialdéhyde, un des principaux marqueurs du stress oxydatif est plus élevée chez les sujets atteints du paludisme (Adil *et al.*, 2013). Ainsi, le stress oxydatif induit durant l'infection palustre semblerait résulter d'un déséquilibre entre cette diminution des enzymes anti-oxydantes et la production accrue d'ERO. Parallèlement, on note une décroissance significative des facteurs antioxydants tels que les vitamines A et E chez les patients atteints du paludisme (Djossou *et al.*, 1996). D'autre part, selon Hemmer *et al.*, 2005, le paludisme grave à *P. falciparum* est associé à une activation des neutrophiles et des monocytes, à une élévation du taux de cytokines et à des dommages au niveau des cellules endothéliales. Un traitement par des antioxydants viserait à renforcer les systèmes antioxydants déjà présents et protège l'hôte. En effet, il a été suggéré que l'administration de vitamine E ou de trolox protégerait partiellement contre le paludisme cérébral (Postma *et al.*, 1996; Hans *et al.*, 2009).

Le recours aux plantes médicinales constitue alors une alternative thérapeutique intéressante à explorer. En effet, parmi les antipaludiques les plus efficaces, l'artémisinine et la quinine sont des dérivés de plantes (*Atermisia annua L*, *Cinchona* spp. respectivement). Par exemple, une étude rétrospective des travaux scientifiques sur les plantes antipaludiques en Afrique de l'Ouest entre 1987 et 2007 a démontré que sur 610 plantes utilisées en Afrique, 94 soit (15 %) ont de bonnes activités antipaludiques, avec des concentrations inhibitrices (CI₅₀) en dessous de 5 µg/mL sur différentes souches de *Plasmodium* (Soh & Benoit-Vical, 2007).

L'objectif général de ce travail est de Rechercher de composés naturels à activité antipaludique et antioxydante présentant un fort potentiel de développement de nouveaux traitements contre le paludisme

Les objectifs spécifiques qui en découlent sont les suivants:

- ✓ répertorier et sélectionner à partir d'une enquête ethnobotanique suivie d'une revue littéraire les plantes utilisées en Côte d'Ivoire contre le paludisme;
- ✓ faire le criblage phytochimique et antioxydante des plantes sélectionnées;
- ✓ déterminer l'activité antiplasmodiale des plantes sélectionnées et évaluer l'activité hémolytique des extraits d'intérêt.

I-ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

I-1- Généralités sur le *Plasmodium falciparum*

I-1-1-Pathologie

I-1-1-1-Définition

Le paludisme est une infection parasitaire mortelle dans sa forme grave. Il est dû à un protozoaire endoparasite transmis par la piqûre d'un moustique vecteur, l'anophèle, dont seule la femelle transmet la maladie, provoquant des fièvres intermittentes. Malgré les efforts considérables consentis pour son éradication, le paludisme reste un problème de santé publique du fait de sa fréquence élevée, de sa gravité et des conséquences qu'elle engendre. Les estimations font état de 216 millions d'épisodes palustres en 2010, dont 81 % dans la région Afrique, soit 174 millions de cas (OMS, 2011). Le nombre des décès dus au paludisme est estimé à 655 000 pour l'année 2010 (OMS, 2011). En 2012, sur environ 207 millions de cas, 627 000 décès ont été recensés (OMS, 2013).

I-1-1-2-Historique de la maladie

-Historique

Le Dictionnaire de l'Académie Française par J. B. Coignard en 1694 mentionne «marais et marécage», mais il ne comprend ni «palus», ni «palud». Alors que le Dictionnaire de l'ancienne langue française par Godefroy (1888) fait dater «palustreuse» de 1485, «paludeux» de 1491, «palustre» de 1528 et «paludineux» de 1530. Le Dictionnaire étymologique de Dauzat (1958) indique l'année 1505 pour «palustre» (Debacker 2000). Ceci dénote de l'origine controversée du mot paludisme. En effet, l'histoire du paludisme se confond avec celle de l'humanité. Les premières descriptions du paludisme remontent à 2700 ans av. J.-C., en Chine. Les symptômes caractéristiques du paludisme sont décrits dans le Nei Ching, le canon de la médecine de l'empereur Huang Ti. Plusieurs siècles plus tard, au V^{ème} siècle av. J.-C. plus précisément, c'est au tour d'Hippocrate de décrire les fièvres rythmées. Enfin, un nombre d'écrits romains attribuent ces fièvres aux marécages (Nozais, 1988), ce qui explique que l'origine étymologique du mot paludisme vient du latin «*palus*» signifiant «marais», et le mot «malaria» est issu de l'italien: «mal'aria» désignant «le mauvais air». L'adoption d'«impaludisme» représenta un premier effort de simplification. Ce n'est réellement qu'après la découverte de l'agent pathogène par Laveran que s'imposera le raccourci «paludisme» désignant à la fois la maladie et sa cause, estimée exclusive à l'époque: le marais (Vaucel et Feron, 1968). Il faut ensuite attendre 1630, pour voir apparaître les premiers vrais traitements de la maladie avec la découverte des racines de quinquina, importées du Pérou en Europe. En 1820, Pelletier et Caventou, en France, découvrent dans les racines de quinquina, la quinine, l'élément actif de ce traitement: c'est le début de l'ère de la chimiothérapie antipalustre.

Le médecin français, Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), en 1880, découvre que le paludisme était dû à un parasite protozoaire, le *Plasmodium sp.* (Phylum des *Apicomplexa*), dont il décrit les principaux stades. Pour ses découvertes, Laveran se verra offrir le Prix Nobel en 1907. Les six espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme seront identifiées plus tard: *Plasmodium malariae* (Grassi et Feletti, 1889), *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welch, 1897), *P. ovale* (Stephens, 1922) (**Mendis et al., 2001**) et *P. knowlesi* (**Jongwutiwes et al., 2004; Singh et al., 2004 ; Galinski and Barnwell, 2009**), *P. cynomolgi* (**Ta et al., 2014**). Enfin, le cycle complet du paludisme sera décrit en 1948 par une équipe britannique (Shortt et Garnham), après avoir démontré l'existence d'un stade intra-hépatocytaire du parasite chez l'homme.

➤ Répartition géographique

Le paludisme est endémique dans près de 100 pays (Figure 1) dont la majorité se situe en Afrique sub-saharienne (**Garcia, 2010**). Selon les estimations, cette parasitose menaçait 3,3 milliards de personnes en 2010 dont 1,2 milliard de personnes exposées à un risque élevé d'infection vivaient pour la plupart dans les régions d'Afrique et d'Asie du Sud-Est (**OMS, 2011**). L'Afrique est le continent le plus touché par le paludisme. Le danger est quasi nul en Afrique du Nord, mais majeur en Afrique de l'Est, en Afrique subsaharienne et en Afrique équatoriale (**OMS, 2012**). En Asie, le paludisme est absent des grandes villes et plutôt rare dans les plaines côtières. Le danger est majeur dans les zones rurales du Cambodge, de l'Indonésie, du Laos, de la Malaisie, des Philippines, de la Thaïlande, du Vietnam et en Chine (**Portet, 2007**). Dans les Antilles, le paludisme sévit à Haïti et près de la frontière de la République Dominicaine. En Amérique centrale, il existe quelques micro-zones, mais le risque est relativement faible. En Amérique du Sud, le risque est faible dans les grandes villes, mais réel dans les zones rurales en Bolivie, en Colombie, en Équateur, au Pérou et au Venezuela, et majeur dans toute la zone amazonienne (**Portet, 2007**).

La Côte d'Ivoire du fait de sa situation intertropicale en Afrique subsaharienne et de son climat tropical humide, est un pays d'endémie palustre. Le paludisme constitue donc un problème majeur de santé publique et de développement, car il représente la première cause de morbidité, de mortalité et représente 40 à 60% de motifs de consultation et d'hospitalisation (**Diaby, 2011**).

Pays et territoires affectés par le paludisme en 2010

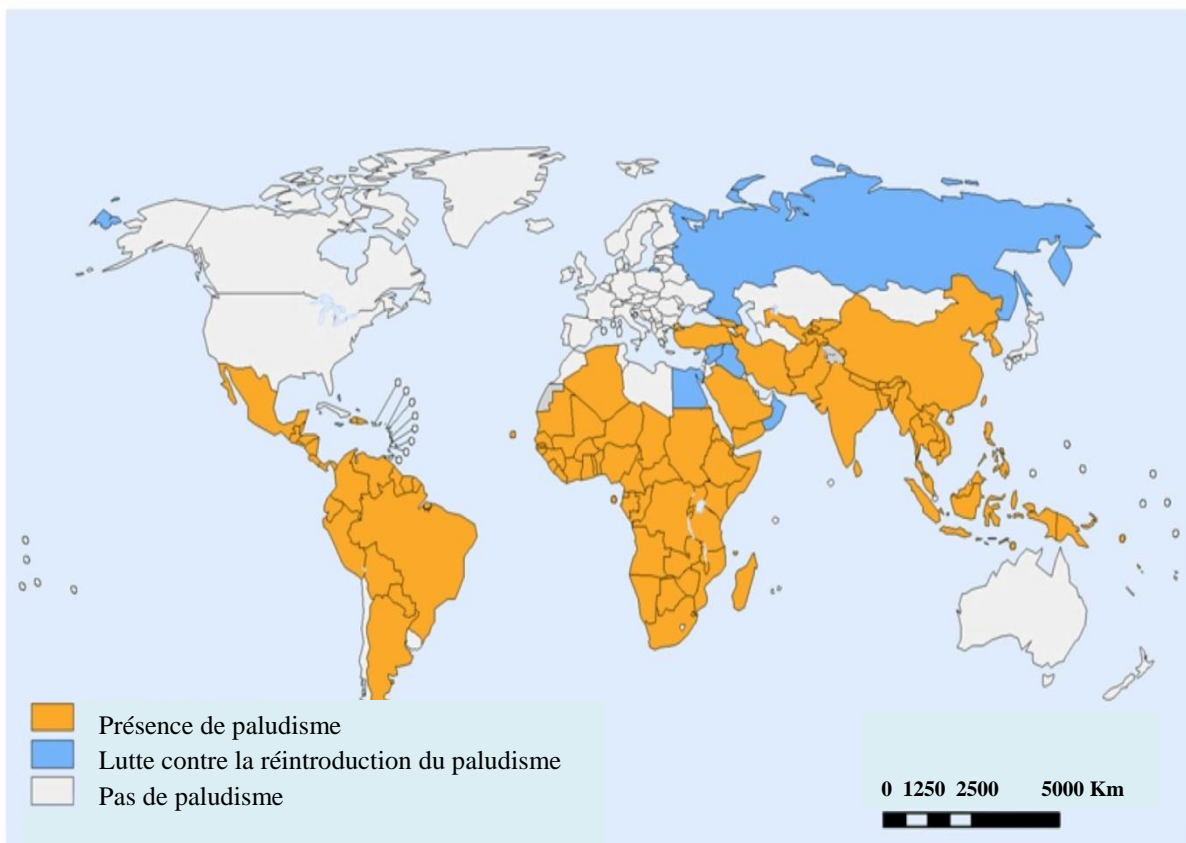


Figure 1: Répartition géographique des pays et territoires affectés par le paludisme (OMS, 2012)

I-1-2-Le parasite et le vecteur

I-1-2-1-Le parasite

Selon la dernière classification de **Levine (1988)** amendée par **Cox (1991)**, l'agent pathogène du paludisme est un eucaryote unicellulaire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* (Sporozoaires), à la classe des *Haemosporida*, à l'ordre des *Haemosporida*, à la famille des *Plasmodiidae* et au genre *Plasmodium*. Il a pour hôte intermédiaire l'homme et pour hôte définitif l'Anophèle femelle. La maladie affecte l'espèce humaine mais il existe de nombreuses autres espèces plasmodiales qui parasitent les oiseaux ou les mammifères. Chez l'homme, c'est *Plasmodium falciparum* qui est l'espèce la plus largement répandue et la plus dangereuse.

I-1-2-2-Caractéristiques des espèces infectant l'homme

➤ *Plasmodium falciparum*

Il est essentiellement retrouvé en Afrique tropicale, en Amérique centrale et du Sud, en Asie du Sud Est. Le *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus dangereuse puisque le paludisme qu'il occasionne est en général le seul qui puisse entraîner une mortalité importante (**Pradine et al., 2010**). De plus, il développe aujourd'hui une résistance contre la chloroquine dans de nombreux pays, posant ainsi le problème de la prévention médicamenteuse de la maladie. Il est important de noter que cette chimiorésistance ne cesse de s'étendre géographiquement d'année en année (**Pradine et al., 2010**). En effet *P. falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances, y compris contre les ACT (**Jambou, 2005; Noedl et al., 2008; Wongsrichanalai et al., 2008; Dondorp et al., 2009**).

➤ *Plasmodium vivax*

Ce parasite est à l'origine d'une forme récurrente de paludisme dont les manifestations cliniques peuvent être asymptomatiques ou sévères, pouvant même conduire à la mort (**Miyata et al., 2011**). Représentant 40% des cas de paludisme dans le monde (**Anon, 2008**), *P. vivax* constitue la deuxième espèce retrouvée en Afrique et surtout en Asie, en Amérique latine et à un moindre degré, en Afrique de l'Est. Environ 10 à 20% des cas d'infection par *Plasmodium vivax* dans monde se produisent en Afrique au sud du Sahara. En Afrique australe et orientale, *Plasmodium vivax* représente autour 10% de cas de malaria mais dans moins de 1% de cas en Afrique centrale et occidentale (**Mendis et al., 2001**).

➤ *Plasmodium malariae*

Présent dans les zones tempérées et sub-tropicales, *Plasmodium malariae* est responsable de la « fièvre quarte » survenant toutes les 72 heures, avec des rechutes possibles plus de vingt ans après

l'infection (**Mendis et al., 2001**). Il occupe la troisième position dans la prédominance, mais possède une distribution étendue. Les parasites, dans leur forme trophozoïte, se présentent sous un aspect compact prenant l'apparence d'une bande colorée ou la forme d'un panier.

➤ ***Plasmodium ovale***

Cette espèce est principalement rencontrée en Afrique tropicale et dans quelques îles du Pacifique Sud. Elle cause des accès de « fièvre tierce » (toutes les 48 heures), forme moins grave de l'infection, mais pouvant survenir sous forme de rechutes 4 à 5 ans après la primo-infection (**Garcia, 2010**). *Plasmodium ovale* infecte préférentiellement les globules rouges non matures ce qui limite la parasitémie. Les cellules infectées sont ovales et légèrement plus grandes que les cellules non infectées. Les trophozoïtes sont très souvent amiboïdes.

➤ ***Plasmodium knowlesi***

L'implication d'une cinquième espèce typiquement rencontrée dans la nature chez les macaques, *P. knowlesi*, dans des cas de la maladie chez l'homme, a été confirmée en 2004. Le cycle érythrocytaire de cette espèce ne dure que 24 heures, la fièvre est quotidienne. Il peut être fatal pour l'homme (**Galinski and Barnwell, 2009**). Le premier cas de paludisme chez l'homme dû à ce parasite, responsable de l'infection chez certaines espèces de macaques, avait été mis en évidence en 1965 (**Jongwutiwes et al., 2004; Singh et al., 2004**). *P. knowlesi* est identifié de manière incorrecte comme *P. malariae* à cause de la similitude morphologique entre ces deux espèces. Les méthodes moléculaires de diagnostic, associées à un recueil commémoratif strict, sont importantes pour le diagnostic de certitude de cette espèce (**Cox-Singh and Singh, 2008**).

➤ ***Plasmodium cynomolgi***

Le premier cas d'infection humaine de cette espèce anciennement identifiée chez les macaques a été décrit par **Ta et al. (2014)** grâce à des méthodes microscopiques associées à la biologie moléculaire. Cela a permis d'éviter la confusion faite habituellement avec *P. vivax*.

I-1-2-3-Cycle du parasite

Le développement du parasite fait intervenir un cycle sexué chez l'anophèle et un cycle asexué chez l'homme où deux étapes s'enchaînent; une asymptotique de multiplication des parasites dans les cellules hépatiques puis une étape de multiplication intra-érythrocytaire responsable de la symptomatologie (Figure 2).

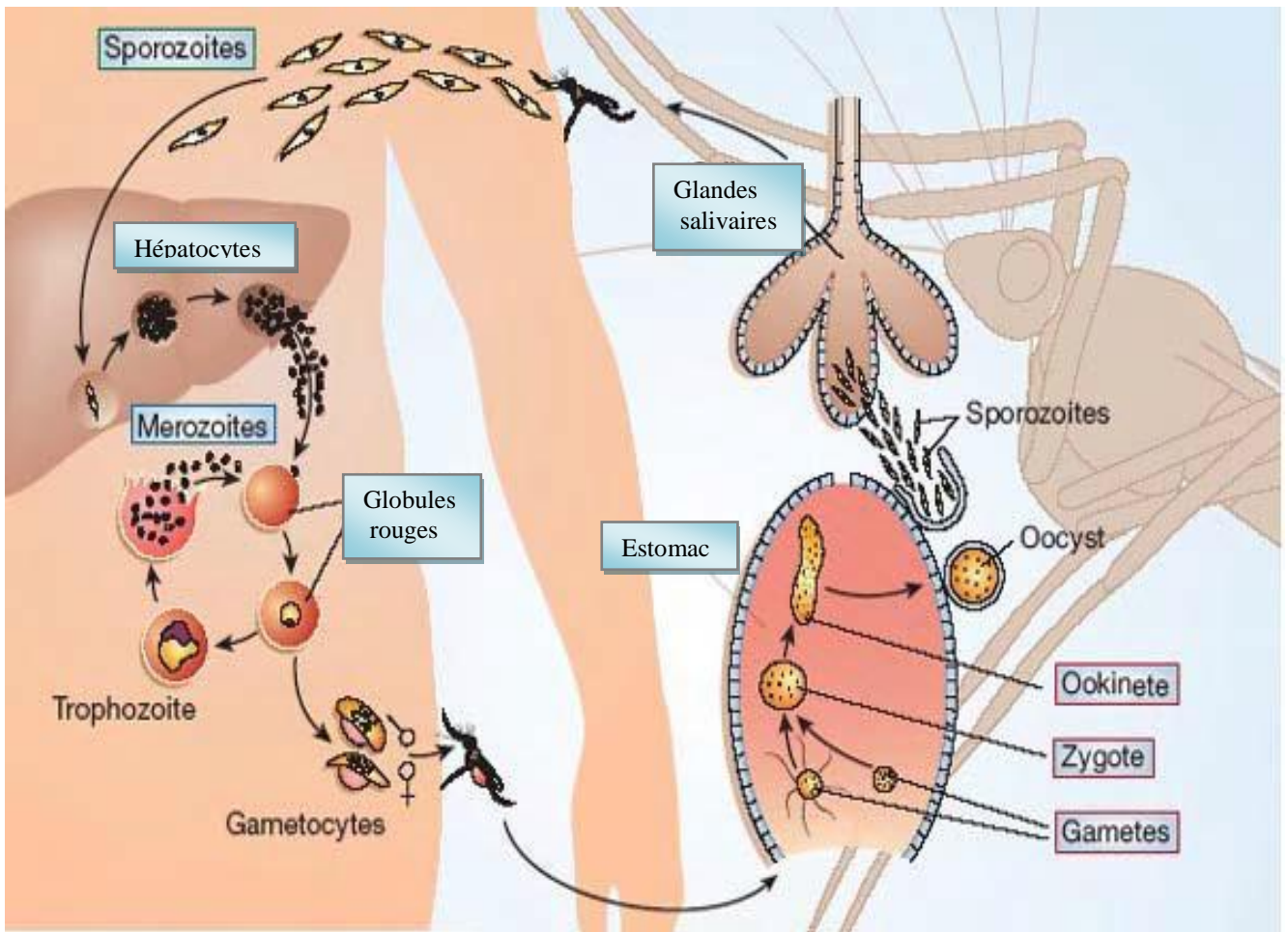


Figure 2: Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* (Menard, 2005)

➤ *Chez l'homme*

L'infection commence lorsque les sporozoïtes, forme infectante du parasite, sont injectés dans l'organisme humain pendant un repas sanguin de l'anophèle femelle infectée (Scott, 2007). Ils migrent alors rapidement vers le foie où ils colonisent les cellules hépatiques dans lesquelles se produit une phase de multiplication asexuée ou cycle schizogonique exo-érythrocytaire. La division des sporozoïtes donne rapidement naissance à des milliers de nouvelles formes parasitaires, les mérozoïtes. Ceux-ci sont libérés lors de l'éclatement des cellules hépatiques et gagnent la circulation sanguine. Le second cycle peut ainsi débiter. Un cycle parallèle (dormant) de schizogonie a également lieu dans le foie dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*. Les parasites à ce stade de développement sont appelés hypnozoïtes (Garcia, 2010). Les mérozoïtes libérés dans le flux sanguin vont ensuite pénétrer à l'intérieur des globules rouges et s'y multiplier jusqu'à occuper entièrement l'érythrocyte conduisant au stade schizonte, à partir duquel seront produits de nouveaux mérozoïtes. Libérés dans la circulation sanguine après éclatement des globules rouges, ces derniers infectent à leur tour de nouveaux globules rouges. C'est l'éclatement des érythrocytes qui est responsable de la plupart des symptômes caractéristiques de la maladie (Scott, 2007). Des gamétocytes se forment à partir de certains mérozoïtes à l'intérieur des globules rouges, et s'ils sont ingérés par le moustique, ils pourront perpétuer le cycle sexué. La durée totale du cycle endoérythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* provoquant des fièvres tierces ; ce cycle dure 72 heures pour *P. malariae* (fièvre quarte).

➤ *Chez l'anophèle*

Les gamétocytes sont ingérés par un anophèle à la faveur d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Seuls les gamétocytes poursuivent leur développement, les autres stades du parasite ingérés de la même façon sont digérés une fois dans le moustique. Les gamétocytes vont alors se transformer en gamètes dans l'estomac du moustique. Ces gamètes fusionnent et conduisent à la formation d'un ookinète qui pénètre dans la paroi du tube digestif pour former un oocyste. Celui-ci produit alors des sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires du moustique (Carter *et al.*, 2007). C'est cette forme qui sera inoculée à l'homme à la prochaine pique au cours du repas sanguin.

I-1-2-4-Le vecteur: l'anophèle femelle

Le cycle sexué, ou sporogonique de *Plasmodium* s'effectue seulement chez les femelles de certaines espèces de moustiques du genre *Anopheles*. Les mâles ne se nourrissent pas de sang. Le vecteur appartient à l'ordre des diptères et au genre *Anopheles*. Plus de 450 espèces d'*Anopheles* ont été recensées à ce jour dans le monde mais seule une vingtaine d'entre elles sont vecteurs du paludisme en conditions naturelles. Dans la zone où sévit *Plasmodium falciparum*, les conditions de

survie des moustiques nécessitent de l'humidité et une température ambiante supérieure à 16°C. C'est pourquoi on ne retrouve généralement pas de paludisme au-dessus de 1 500 m d'altitude en Afrique et 2 500 m en Asie ou en Amérique.

I-1-3-Symptomatologie

I-1-3-1-Accès de primo-invasion

Elle est constituée d'une phase d'incubation cliniquement muette correspondant à la schizogonie hépatique qui dure en moyenne quatorze jours pour *P. vivax* et *P. ovale*, douze jours pour *P. falciparum* et trente jours pour *P. malariae*. Ce stade apparaît souvent chez un sujet non immun.

I-1-3-2-Invasion

La fièvre sans périodicité régulière est continue et associée à un malaise général, des courbatures, des céphalées, des nausées ou des vomissements et parfois des diarrhées. A ce stade, le diagnostic sera apporté par le frottis sanguin et la goutte épaisse qui montre le *Plasmodium*. En l'absence de traitement, la fièvre persiste avec des rémissions et des recrudescences pendant 8 à 15 jours. La fièvre peut devenir intermittente, tous les deux ou trois jours accompagnée alors d'une splénomégalie. Le risque de passage à l'accès pernicieux est permanent s'il s'agit d'un *Plasmodium falciparum*.

I-1-3-3-Complications du paludisme

Les complications potentielles du paludisme sont liées dans la majorité des cas à une infestation par *Plasmodium falciparum*. Les autres espèces de paludisme provoquant des formes bénignes (même si elles peuvent persister plusieurs années) de la maladie.

➤ Accès pernicieux ou neuropaludisme

Chez les sujets non immunisés ou ne suivant pas de traitement, l'infection à *Plasmodium falciparum* présente un risque de développement d'une forme grave potentiellement mortelle: le neuropaludisme. Le début est brutal, foudroyant, le malade tombe dans le coma avec une insuffisance rénale aiguë, un oedème pulmonaire, une encéphalite et parfois une coagulation intravasculaire disséminée. Le neuropaludisme constitue une urgence médicale; un traitement adapté administré à temps permet généralement une guérison sans séquelle. Cependant, le taux de létalité reste élevé dans le cas d'un diagnostic tardif.

➤ ***Le paludisme viscéral évolutif***

Le paludisme viscéral est une complication assez rare qui peut survenir avec *Plasmodium falciparum* et, dans une moindre mesure, *Plasmodium vivax*. Il apparaît à la suite d'infestations successives et massives mal ou non traitées chez des sujets non immunisés, ou ayant perdu leur immunisation (chez les natifs de zones d'endémies quittant ces régions pendant de longues périodes et y retournant de façon ponctuelle). Le paludisme viscéral évolutif associe notamment pâleur, fatigue intense (asthénie), anémie, splénomégalie (augmentation du volume de la rate), fièvres irrégulières. En l'absence de traitement, il existe un risque permanent de neuropaludisme (en cas d'infestation par *Plasmodium falciparum*).

➤ ***La fièvre bilieuse hémoglobinurique***

Elle survient après un traitement par la quinine (Djibo *et al.*, 2000; Khandelwal *et al.*, 2001) ou suite à un brusque changement de température au cours d'une prophylaxie par la quinine. C'est une tubulo-néphrite aiguë fébrile (accident immuno-allergique à la quinine) qui se caractérise par de la fièvre (40°C), des lombalgies, de la pâleur, un ictère, des urines rouges ou brunes par hémoglobinurie; la mort survient en quelques jours dans 30 % des cas.

➤ ***Le paludisme chez la femme enceinte***

L'infection à *Plasmodium* chez la femme enceinte a des conséquences très sévères, en particulier si l'infection a lieu pendant le premier ou le troisième trimestre de la grossesse: elle peut se traduire par un avortement spontané ou la mort néonatale. Dans les cas moins sévères, elle s'accompagne de risques élevés de prématurité, ou de mise au monde d'un enfant de faible poids.

I-1-4-Traitement

Le traitement du paludisme dépend de plusieurs facteurs notamment de l'espèce du parasite en cause, de la gravité de l'infection, de l'âge de la personne atteinte et du profil de résistance aux médicaments antipaludéens dans la région du monde où la personne a contracté la maladie. Un traitement antipaludique doit, en premier lieu, reposer sur des molécules peu onéreuses car elles sont destinées au traitement de populations pauvres pour qui l'accès aux soins n'est pas évident. Ensuite, le choix du traitement dépend surtout de l'évaluation de la gravité clinique de la maladie, d'où la nécessité d'un diagnostic rapide et pertinent. Le traitement curatif de l'accès palustre doit tenir compte de plusieurs principes. Il doit être le plus précoce possible afin de prévenir une évolution vers un paludisme grave. Enfin, il ne faut ainsi traiter que les paludismes de façon rapide en utilisant des doses efficaces dans le but d'éviter l'émergence des résistances aux molécules existantes. L'OMS préconise actuellement l'utilisation de l'artémisinine et de ses dérivés. Ces

molécules doivent être utilisées dans les zones de chimio-résistance en association avec d'autres molécules.

Quant aux traitements préventifs, ils ont pour but d'empêcher le développement de la maladie en cas d'infection. Ils sont prescrits lors de voyages dans les régions où le paludisme est endémique.

I-2- Les antipaludiques

Les antipaludiques sont les médicaments utilisés dans le traitement curatif ou préventif du paludisme. Ils sont également appelés antimalariques ou antipaludéens.

I-2-1-Classification des antipaludiques

I-2-1-1-Les schizonticides

Ce groupe comprend les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine.

Les dérivés quinoléiques comprennent les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine) et les amino-alcools (méfloquine, halofantrine, luméfántrine). Ces molécules interfèrent avec la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne.

Les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther, etc..), une nouvelle classe d'antipaludiques de type peroxyde interfère aussi dans la digestion de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite. Ils ont une action gamétocytocide, qui réduirait la transmission et limiterait le risque de voir émerger des résistances.

➤ Les lysosomotropes

Les lysosomotropes regroupent des molécules qui agissent au niveau de la vacuole digestive du parasite, qui correspond à un compartiment acide de type lysosomal. Lorsqu'il est à l'intérieur du globule rouge, le trophozoïte ingère l'hémoglobine du cytoplasme de l'hématie par endocytose. L'hémoglobine est alors hydrolysée dans la vacuole digestive: la globine est dégradée par des protéases parasitaires en acides aminés qui sont utilisés par le parasite, alors que la molécule d'hème (ferriprotoporphyrine), toxique pour le parasite, est détoxifiée par polymérisation en un cristal inerte, l'hémozoïne ou pigment malarique. En fait, la plupart des schizonticides lysosomotropes agissent en inhibant la polymérisation de l'hème dans la vacuole digestive. Les principaux lysosomotropes sont: les amino-4-quinoléines (chloroquine amodiaquine); les amino-alcools (quinine méfloquine halofantrine luméfántrine); les sesquiterpènes (l'artémisinine et ses dérivés hémisynthétiques (dihydroartémisinine, artéméther, artésunate principalement).

➤ Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques

Ils bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphthoquinones et les antibiotiques.

➤ *Les associations*

Les nouveaux antipaludiques qui ont fait l'objet de développements récents sont tous associés, au moins en bithérapie, et se démarquent de la plus ancienne des associations, la sulfadoxine-pyriméthamine capable de sélectionner rapidement des mutants résistants.

Certaines associations sont fixes : l'atovaquone-proguanil, l'artéméther-luméfantrine et la chlorproguanil-dapsone. D'autres associations sont libres, associant toujours un dérivé de l'artémisinine vu la rapidité d'action, l'impact sur la transmission et l'absence de chimiorésistance de *P. falciparum*: artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine, artéméther-proguanil et artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine.

I-2-1-2-Les gamétocytocides

Les gamétocytocides actuellement connus sont les amino-8-quinoléines, toutes toxiques donc peu employées. Néanmoins, elles sont les seules à avoir réellement un effet sur les gamétocytes de *Plasmodium falciparum* (**Debacker 2000**). Il s'agit de la pamaquine (première 8-aminoquinoléine synthétisée en Allemagne dans les années 1920), la primaquine, la rhodaquine, la quinocide. Seule la primaquine reste encore disponible. Les dérivés de l'artémisinine (Artesunate, Artéméther) ont une action gamétocytocide qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.

I-2-2- Chimiorésistance du *Plasmodium*

I-2-2-1-Définition

C'est la capacité d'une souche de parasite à se multiplier ou survivre en présence d'une dose de médicament qui détruit normalement les parasites de la même espèce. La survie de ces parasites ou leur aptitude à se reproduire malgré l'administration et l'absorption du médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet a été définie en 1973 par l'OMS comme étant la chimio-résistance (**OMS, 1973; Djaman, 2003**). Des résistances ont été relevées à la plus part des antipaludiques et même aux derniers commercialisés comme les associations à base d'artémisinine (**Jambou et al., 2005; Pradine et al., 2010**).

I-2-2-2-Mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

Deux grands types de mécanismes de résistance ont été identifiés: Une perte du mécanisme d'accumulation dans la vacuole digestive pour les lysosomotropes et une modification de la cible par acquisition de mutations ponctuelles pour les antimétabolites.

➤ **La résistance aux lysosomotropes: cas de la chloroquine**

L'essentiel des études réalisées porte sur la chloroquine. Ces études ont montré que la résistance était réversible sous l'action de composés comme le vérapamil, la prométhazine et la chlorpromazine (**Pradines et Parzy, 2002**) et qu'elle était liée à un défaut d'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive (**Fidock et al., 2008**). Ce constat a permis d'émettre l'hypothèse de l'implication d'un transporteur spécifique de la chloroquine (Figure 3) dans la vacuole qui serait à l'origine d'efflux de médicaments (**Bray, 2005; Bray et al., 1998**). Les études ont prouvé que l'efflux de médicament serait dû à des mutations ponctuelles au niveau du gène *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) situé sur le chromosome 7 dont le produit d'expression est une protéine transmembranaire localisée dans la membrane digestive de la vacuole du parasite (**Mayor et al., 2001; Wellemes et Plowe, 2001**). Bien avant la découverte de *pfcr1*, les études réalisées pour élucider la base moléculaire de la résistance à la CQ avaient conduit à identifier le gène *pfmdr1*. Cinq points de mutation ont été décrits au niveau des codons suivants : N86Y, Y184F, S1034C, N1042D et D1246Y (**Foote et al., 1990**). Le mécanisme de résistance aux lysosomotropes est donc complexe et fait intervenir de nombreuses mutations. Cette complexité explique la sélection lente de la résistance à la chloroquine malgré son utilisation massive depuis une cinquantaine d'années.

➤ **La résistance aux antimétabolites**

La résistance aux antimétabolites s'explique par la présence de mutations ponctuelles au niveau des gènes codant les protéines cibles. En effet, ces mutations diminuent les interactions enzyme/ligand, généralement des inhibiteurs compétitifs, en modifiant la conformation des protéines enzymatiques (**Triglia et al., 1997**).

La résistance aux antifoliques et aux antifoliniques est déterminée par des mutations de gènes impliqués dans la synthèse des folates du parasite. Les mutations ponctuelles au niveau du gène codant la dihydroptéroate synthétase (*pf dhps* 437G, K540E et A581G) sont responsables de la résistance à la sulfadoxine et aux sulfones (**Triglia, 1998**). Les mutations du gène codant la dihydrofolate réductase (*pf dhfr-ts*) sont responsables de la résistance à la pyriméthamine et au proguanil (**Reynolds et Roos, 1998; Le Bras, 1999**). Plus le nombre de mutations est élevé, plus le niveau de résistance des parasites est important (**Nzila-Mounda et al., 1998**).

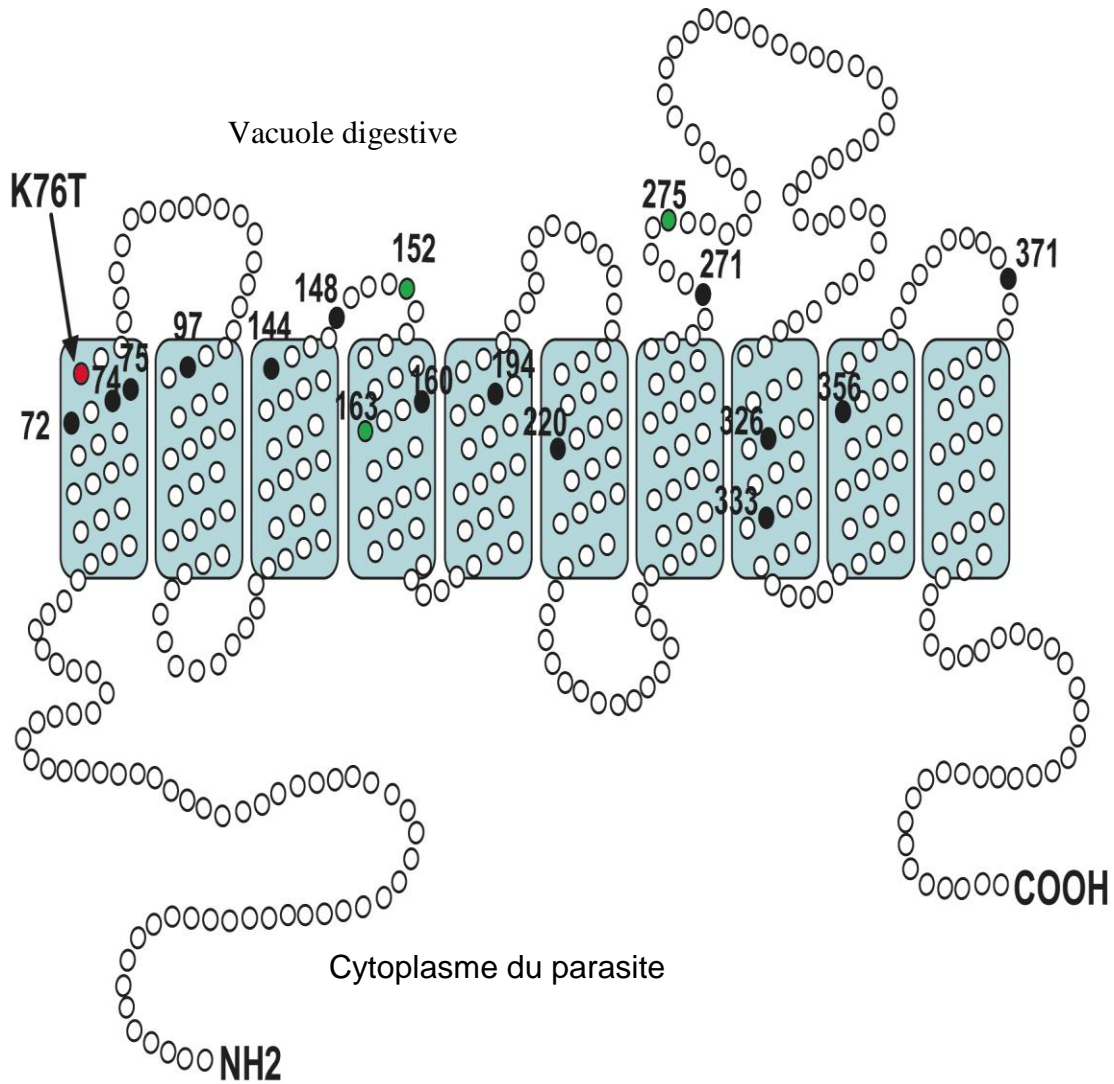


Figure 3: Position des différentes mutations de PfCRT identifiées à ce jour (**Johnson, 2004;**
Bray, 2005)

- Position 76, clé de la résistance à la chloroquine;
- Mutations associées;
- Mutations liées à la résistance à l'halofantrine et l'amantadine.

I-2-3-Facteurs favorisant la résistance

I-2-3-1-Facteurs sociaux

Des études menées dans plusieurs pays d'Afrique ont montré que 53 % des enfants présentant un syndrome fébrile dans des zones impaludées recevaient un traitement et que la chloroquine constituait le recours médicamenteux dans 84 % des cas, même en présence d'une chloroquinorésistance notoire (**Breman, 2004**). La prise de ces médicaments s'accompagne souvent d'effets indésirables. Ces effets indésirables sont des facteurs de mauvaise observance, sources d'échecs thérapeutiques et un sous dosage favoriserait la sélection de souches résistantes par le maintien d'une charge parasitaire résiduelle (**D'Alessandro, 2000**). L'OMS a analysé en 2003 des échantillons de chloroquine et de sulfadoxine-pyriméthamine prélevés dans le secteur public, privé et sur les marchés illicites de huit pays africains et a mis en évidence un soudosage de la substance active allant respectivement de 20 à 67 % et de 5 à 38 %, des défauts de dissolution des comprimés de 5 à 29 % pour la chloroquine et de 75 à 100 % pour la sulfadoxine-pyriméthamine (**OMS, 2003**). Ces déficiences sont en partie attribuées au non-respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) des industriels et aux problèmes de transport des médicaments. Le personnel de santé mal formé ou une mauvaise observance des patients conduisent de même à des niveaux insuffisants en substance active. Une étude conduite en Ouganda en 2002 relève que seul un tiers des professionnels de santé prescrit la posologie adéquate d'antipaludique (**Nshaiura, 2002**) et en Gambie 84 % des mères en charge du traitement de leurs enfants âgés de moins de cinq ans ne connaissent pas la bonne dose de chloroquine à administrer, parfois donnée en une prise unique ou quotidiennement sur plusieurs semaines (**Clarke, 2003**). Tout diagnostic erroné fondé sur la simple présence d'une fièvre et conduisant à l'administration d'antipaludique non justifiée est de nature à favoriser l'adaptation des parasites. De plus les patients percevant la maladie en terme de symptômes, et non de cause, c'est-à-dire de paludisme, ont souvent interrompu le traitement par antipaludéens dès la chute de la température et maintenant de ce fait une charge parasitaire dans l'organisme. L'automédication aura les mêmes conséquences. Enfin, le coût élevé d'un traitement qui représente parfois près de la moitié du revenu mensuel moyen en Afrique s'avère un frein majeur dans l'observance thérapeutique.

I-2-3-2-Facteurs pharmacologiques

Ce sont les facteurs qui décrivent les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la drogue utilisée. Une substance avec une longue demi-vie et une faible capacité à réduire la charge parasitaire sera ainsi particulièrement vulnérable aux résistances. L'artémisinine et ses dérivés ont une demi-vie courte, ce qui les rend particulièrement intéressants dans ce contexte. De plus les drogues pour lesquelles le phénomène de résistance implique un seul

point de mutation sur la molécule cible comme les antifolates et l'atovaquone auront un risque autant plus accru. Les résistances à la chloroquine et à la quinine sont par contre multigéniques (**Rosenthal, 2001**). A noter que la propagation de souches de plasmodies résistantes est accélérée par une production rapide et/ou importante de gamétocytes lors des traitements par la sulfadoxine-pyriméthamine. Les dérivés de l'artémisinine à activité gamétocytocide agissent eux dans le sens d'une réduction de la transmission.

I-2-4-Etude de la résistance du *Plasmodium*

Le contrôle de l'endémie palustre par les antipaludiques nécessite une évaluation permanente de leurs niveaux d'efficacité pour prévenir les résistances du parasite. Le suivi de l'efficacité des antipaludiques se fait par des méthodes standardisées et coordonnées par l'OMS qui recommande régulièrement des protocoles.

I-2-4-1-Les tests *in vivo*

Les tests *in vivo* normalisés décrits par l'OMS (1973) supposaient une surveillance quotidienne de patients symptomatiques ou de porteurs asymptomatiques pendant une durée de 7 jours (test court) ou de 28 jours (test prolongé) dans un environnement exempt de paludisme. Le test de l'efficacité thérapeutique actuellement utilisé, est celui de l'OMS (1994) modifié en 1996 (OMS, 1996) et en 2001 (OMS, 2002). C'est un test simplifié et raccourci (**Bloland, 2004**):

-Le recrutement de patients symptomatiques d'une infection à *Plasmodium falciparum* confirmée à la goutte épaisse et non compliquée cliniquement, le seuil de densité parasitaire minimal pour l'inclusion dans l'étude étant habituellement de 2000 parasites/ μ L.

-Une durée minimale de suivi de 14 jours à adapter cependant au niveau de transmission du pays d'étude et au médicament dont on souhaite évaluer l'efficacité, classiquement 14 jours pour les zones à transmission intense et 28 jours pour les zones de transmission faible à modérée.

-Un suivi ambulatoire avec des examens cliniques aux jours 0, 1, 2, 3 et 7 (le jour 0 étant le premier jour de traitement) puis une fois par semaine pour le reste de la période de suivi, c'est-à-dire au jour 14 pour une période de 14 jours et aux jours 14, 21 et 28 pour une période de 28 jours.

-Des étalements de sang pour numération des plasmodies (parasitémies) aux jours 0, 2, 3, 7 et 14, s'il y a lieu aux jours 21 et 28 avec l'efficacité du médicament exprimée en termes de sensible (S) ou résistant (réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA), en échec thérapeutique précoce (ETP) et en échec thérapeutique tardif (ETT).

I-2-4-2-Les tests *in vitro*

Les tests *in vitro* reposent sur la culture d'isolats de *Plasmodium falciparum* en présence d'une série de concentrations de l'antipaludique étudié pendant la durée d'un cycle évolutif ou une partie de ce cycle. Ils évaluent la réponse parasitaire au traitement *in vitro* par contact direct parasite-principe actif. La concentration d'antipaludique inhibant de 50 % (CI₅₀) la croissance parasitaire est déterminée. Plusieurs méthodes sont utilisées:

-La méthode de référence est le test isotopique qui utilise l'hypoxanthine radiomarquée au tritium (**Desjardins, 1979**). L'intensité de la radioactivité émise par l'échantillon en fin de test sera proportionnelle à la croissance parasitaire ayant eu lieu en présence de principe actif. En général le comptage s'effectue après 42 heures de culture.

-Le test de l'OMS III utilise le comptage microscopique des formes ayant atteint le stade schizonte après 24 heures de culture mais cette technique est très dépendante de l'opérateur.

-Les tests colorimétriques dosent par une technique immuno-enzymatique ELISA différents marqueurs de la croissance parasitaire comme la lactate déshydrogénase (LDH) ou la protéine riche en histidine 2 (HRP2) (**Makler et al., 1993**);

-Le test fluorimétrique : méthode du sybr green

Cette méthode basée sur la fluorescence de l'ADN (**Smilkstein et al., 2004**) est utile pour le screening des drogues et est intéressante à cause de l'absence d'acides nucléiques dans les hématies. Le SYBR Green I est largement utilisé dans les études *in vitro* (**Izumiyama et al., 2009**) et *in vivo* (**Somsak et al., 2012**) et moins cher que toute autre test fluorimétrique et même colorimétrique.

I-2-4-3-Les marqueurs génomiques de la résistance

Le développement des techniques de biologie moléculaire ces dernières années ont permis d'élucider les mécanismes de résistance aux antipaludiques et les déterminants moléculaires associés. Les génotypes de résistance étant déterminés après amplification de l'ADN par PCR. Ces méthodes sont très sensibles et nécessitent du matériel de pointe, de l'expertise et beaucoup de précautions afin d'éviter les contaminations.

I-3-De la plante aux médicaments

I-3-1-Ethnopharmacologie

D'après **Dos Santos et Fleurentin (1990)**, l'ethnopharmacologie peut se définir comme étant « l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques». Plus simplement, l'ethnopharmacologie est une discipline qui

s'intéresse aux médecines traditionnelles et aux remèdes constituant les pharmacopées traditionnelles (**Fleurentin, 2012**). Etymologiquement, les termes (ethno)pharmacognosie ou ethnopharmacologie viennent de « pharmakon » en grec qui veut dire remède, « ethnos » qui veut dire peuple, « gnôsis » connaissance et « logos » signifie science. Ainsi le travail de l'ethnopharmacologue consiste à déterminer les ingrédients constituant tel remède ou tel poison vernaculaire, à comprendre les modes de préparation; à analyser, pour chaque ingrédient, sa composition chimique; enfin à tenter de repérer, dans chaque cas, la "substance" ou le "principe actif" qui pourrait être responsable de l'activité constatée et en décrire les mécanismes (**Nguyen-Pouplin, 2007**). Comme on peut le percevoir, l'ethnopharmacologie regroupe plusieurs sciences intimement liées dont des sciences de l'homme (anthropologues, historiens, linguistes, juristes) et des sciences de la nature (botanistes, pharmacologues, toxicologues, chimistes, cliniciens et agronomes).

Les objectifs peuvent se décliner en plusieurs étapes:

-Recenser et surtout comprendre partout dans le monde les savoirs traditionnels, notamment là où la tradition est orale, car la transmission de la connaissance est entravée à la fois par la perte d'intérêt du métier de guérisseur et par la non reconnaissance du métier.

-Puis, à partir de l'inventaire des plantes médicinales et des produits d'origine naturelle, de définir une pharmacopée traditionnelle.

-Ensuite il faut évaluer *in vitro* et *in vivo* les médicaments traditionnels, et classer les extraits en fonction de leur effet pharmacologique. L'étude de ces extraits peut alors conduire à la découverte de nouvelles molécules.

-Enfin, il faut absolument que les informations scientifiques retournent auprès des informateurs afin que le travail de l'ethnopharmacologue permette d'intégrer la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé où elle est inexistante.

I-3-2-Historique de la thérapeutique antipaludique

I-3-2-1-Avant la quinine

Le paludisme affecte les êtres humains depuis plus de 50000 ans (**Joy et al., 2003**). Ainsi, la thérapeutique du paludisme est aussi vieille que le monde et se perd dans les méandres de l'histoire. Les premiers témoignages de l'utilisation de *Artemisia annua* L. remontent à plus de 2000 ans. C'est en 1663, grâce aux observations du père Pedro de Calancha que la poudre de quinquina acquit la réputation d'un médicament efficace contre le paludisme. Des missionnaires jésuites installés en Equateur avaient remarqué que les indigènes mâchaient l'écorce d'un arbre particulier lorsqu'ils éprouvaient des frissons. Plus tard, Linné donnera à cet arbre le nom de *Cinchona* (Figure 4).

I-3-2-2-De la quinine à nos jours

La quinine est le principal principe actif du Quinquina (Figure 4), elle a été découverte en 1820, par deux pharmaciens parisiens Pelletier et Caventou qui extraient et identifient la Quinine. Il est extrait directement de l'écorce, où elle est présente à raison de 2 à 15 %.

La structure définitive de ce composé ne sera établie qu'en 1908 et sa synthèse chimique sera réalisée pour la première fois en 1944 par Woodward et Doering. A partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, les avancées de la chimie de synthèse permettent la fabrication d'autres principes actifs anti-paludiques, tels que la pamaquine, la quimacrine, la chloroquine, l'amodiaquine, la primaquine, la pyriméthamine, qui sont pour beaucoup d'entre eux encore utilisés de nos jours. L'inconvénient commun de ces produits est l'apparition rapide de souches résistantes. L'usage de la quinine déclinera ensuite jusque dans les années 1970. C'est à cette époque qu'apparaissent des souches de *Plasmodium* résistant aux antipaludéens de synthèse suite à leur utilisation excessive mais encore sensibles à la quinine. Cette émergence de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine (NIVAQUINE) a stimulé la recherche de nouvelles molécules actives telles que la méfloquine, l'halofantrine. C'est dans ce cadre que l'artémisinine a été isolé en 1972 à Shangāi de *Artemisia annua* L.. Suite à la valorisation de ce principe actif, des dérivés de l'artémisinine ont été synthétisés afin d'améliorer l'activité de ce principe actif. Nonobstant, les résistances notées contre cette molécule ces dernières années (**Jambou et al., 2005; Pradine et al., 2010**), elle reste la plus efficace de nos jours. Aujourd'hui l'OMS recommande l'utilisation des combinaisons à base d'artémisinine afin de limiter le développement de nouvelles résistances (**Jambou et al., 2005; Pradine et al., 2010**).



QUINQUINA. *Cinchona Calisaya*.

Figure 4: *Cinchona calisaya* Wedd. (Dujardin-Beaumetz, 1889)

I-4-Généralités sur les plantes étudiées

I-4-1-Diospyros monbuttensis Gürke (Ebenaceae)

I-4-1-1-Description

D. monbuttensis (Figure 5) est une plante de la famille des Ebenaceae. Les plantes de cette famille sont des arbres ou arbustes dioïques, fournissent le bois d'ébène. Les écorces sont noirâtres, les fleurs rarement hermaphrodites et le plus souvent dioïques unisexuées. Ces fleurs sont groupées en inflorescences courtes, voire réduites à une seule fleur et une préfloraison tordue. Chez les fleurs femelles, on note autant de carpelles que de pétales et de sépales. L'ovaire a des loges secondairement subdivisées par des cloisons supplémentaires (**Dalziel, 1973; White, 1957**). Le fruit est une baie à péricarpe fibreux ou pulpeux.

I-4-1-2-Localisation, utilisations et phytochimie

Très abondantes dans toute la zone forestière, plus rares en savane, les Ebenaceae sont assez couramment utilisées par les guérisseurs. *D. monbuttensis* Gürke est une espèce végétale que l'on retrouve dans la région de M'bahiakro (ville du centre de la Côte d'Ivoire). Les Baoulés (un peuple du centre de la Côte d'Ivoire) l'appellent Niamiébaka qui signifie «bois de Dieu» (**Bouquet et Debray, 1974**). Elle est considérée par les Baoulés et les Agni comme un bon remède des courbatures fébriles, des maux de ventre, des oedèmes et de la lèpre (**Kerharo et Bouquet, 1950; Bouquet et Debray, 1974**). Les feuilles sont utilisées par les Akye pour traiter la varicelle (**Adjanooun et Aké Assi, 1972**). Des études scientifiques ont montré que l'extrait méthanolique de cette espèce possède une activité antipaludique (**Olasehinde, 2012**). **Bouquet et Debray (1974)** ont montré la présence, dans les feuilles, de quinones, de tannins, de stérols et de saponosides.



Figure 5: Feuilles de *Diospyros monbuttensis* (Photographie TUO, 2012)

I-4-2- *Dialium dinklagei* Harms (Fabaceae)

I-4-2-1- Description

Dialium dinklagei (Figure 6) appartient à la famille des *Fabaceae*. Ce sont des arbres, dont les feuilles sont alternes ou sub-opposées, les folioles terminales étant plus grandes que les inférieures. Le rachis est long de 7-15 cm, pubescent roussâtre. Les folioles sont oblongues, obtuses ou aiguës au sommet, arrondies à la base, sauf la foliole terminale qui est aiguë à chaque extrémité. Le limbe un peu pubescent roussâtre, parfois criblé de points translucides avec une dizaine de nervures latérales arquées. Les pétioles sont pubescents, roussâtres, longs de 2 mm. Les fruits sont globuleux, ovoïdes, de 1 à 1,5 cm de long (Steyaert, 1952; Senesse, 1995; Tucker, 1998; Beaune *et al.*, 2013).

I-4-2-2- Localisation, utilisations et phytochimie

Dialium dinklagei est une plante qu'on retrouve dans les zones forestière allant de la Guinée au Congo. Elle est utilisée en Côte d'Ivoire pour traiter le paludisme. Très peu de travaux ont été réalisés sur cette plante, mais nous notons que **Bouquet et Debray (1974)** ont décrit la présence de tannins dans les feuilles de cette plante.



Figure 6: Feuilles de *Dialium dinklagei* (Photographie TUO, 2012)

I-4-3-*Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann ex-Bureau (Bignoniaceae)

I-4-3-1-Description

Newbouldia laevis (Figure 7) est une angiosperme de taille moyenne qui appartient à la famille Bignoniaceae. Il peut croître à une hauteur d'environ 7 à 8 mètres, le plus souvent c'est un arbuste de 2-3 mètres, constitué de beaucoup de tiges formant des amas de branches (Arbonnier, 2004).

I-4-3-2- Localisation, utilisations et phytochimie

Newbouldia laevis est originaire de l'Afrique tropicale et se développe sur les sols humides et bien drainés. On la retrouve dans les forêts secondaires s'étendant du Sénégal au Cameroun, le Gabon, la République Démocratique du Congo, l'Angola (Arbonnier, 2004). Au Nigeria, l'écorce est mâchée et avalée pour les douleurs d'estomac, la diarrhée et les maux de dents (Lewis et Manony, 1977). La plante est réputée pour être efficace dans le traitement de l'éléphantiasis, la dysenterie, les enflures rhumatismales, la syphilis, la constipation et comme vermifuge. Elle est également utilisée pour les maux d'oreilles, les pieds endoloris, les douleurs thoraciques, l'épilepsie et la convulsion des enfants (Akunyili, 2000). La feuille, la tige et les fruits sont utilisés comme fébrifuge et pour soigner plaies et maux d'estomac (Iwu, 2000). Bouquet et Debray (1974) ont noté la présence de stérols et de saponosides dans les feuilles. Quant à Yemoa *et al.*, (2008), ils ont relevé l'absence d'alcaloïdes, de terpènes, de stéroïdes, de saponosides et la présence de flavonoïdes dans ces mêmes feuilles. Selon Usman *et al.*, 2007, les extraits ont révélé la présence de flavonoïdes, tannins, terpènes, stéroïdes et glycosides cardiotoniques. Les racines de *Newbouldia laevis* (trituration de racine) sont utilisées au Bénin dans le traitement de l'ulcère de Buruli (Yemoa *et al.*, 2008). Cette plante est également utilisée en cas de constipation, de douleurs gastrointestinales et bronchopneumonie. Par voie externe, elle sert à traiter les douleurs intercostales, rhumatismales, les névralgies et les maux de dents; l'on l'utilise aussi pour soigner les maladies vénériennes (Bouquet et Debray, 1974; Tra-Bi., 1997; Soro *et al.*, 2010); elle est également réputée pour faciliter l'accouchement (Bouquet et Debray, 1974; Enitome *et al.*, 2010). Plusieurs travaux ont confirmé l'activité antimicrobienne de cette plante (Kueté *et al.*, 2007; Usman *et al.*, 2007).



Figure 7: Feuilles et fleurs de *Newbouldia laevis* (Photographie TUO, 2012)

I-4-4-*Cnestis ferruginea* Vahl exDC (Connaraceae)

I-4-4-1-Description

Cnestis ferruginea Vahl ex DC (Figure 8) est un arbuste ou un arbre vivace. La plante a une coloration allant de brune à rouille et des branches pubescentes. Les feuilles sont plus ou moins alternes ou parfois opposées, ovales à oblongues et de fruits rouge à orange. Les follicules ovoïdes ont 1 à 5 fruits, souvent unis à la base et contenant chacun une graine (**Garon, 2007**). *C. ferruginea* se développe généralement dans les buissons des savanes, souvent dans des repousses secondaires sur les terres agricoles, dans les clôtures, les lagunes et près de la plage (**Jongkind et Lemmens, 1989**).

I-4-4-2-Localisation, utilisations et phytochimie

Cnestis ferruginea a une large répartition en Afrique de l'Ouest, en particulier en Gambie, Ghana, Guinée- Bissau, Côte d'Ivoire, Libéria, Nigeria, Sierra Leone (**Olugbade et al., 1982**), Bénin (**Aschfalk et al., 2000**), du Niger et au Gabon, en particulier dans les forêts semi-décidue. Selon **Bouquet et Debray (1974)**, les feuilles sont des vermifuges très actifs contre les ascaris. Ces feuilles sont également utilisées pour traiter la gale, l'asthénie, et auraient des propriétés purgatives. Une autre indication thérapeutique que la pharmacopée traditionnelle reconnaît à cette plante est son utilisation pour le traitement des affections oculaires. Plusieurs autres utilisations ont été décrites par certains auteurs. *C. ferruginea* est bien connu en phytothérapie et certaines littératures lui prêtent divers usages thérapeutiques tels que le traitement de conjonctivites, de bronchite, de tuberculose, de migraines, de sinusite et d'infection par voie orale. Elle est également utilisée pour le traitement de la dysenterie, la syphilis, la gonorrhée, la toux, la dysménorrhée, les troubles ovariens et aphrodisiaques, l'avortement et la constipation (**Gill, 1992; Okafor, 1999**). Les feuilles peuvent être utilisées comme laxatif et contre la fièvre (**Jongkind et Lemmens, 1989**). La décoction des écorces permet de traiter les infections des gencives (**Olugbade et al., 1982**). Les racines et les fruits ont été considérés comme un remède des morsures de serpent (**Dalziel, 1937; Olugbade et al., 1982**). Les fruits sont également utilisés dans les pathologies oculaires telles que la conjonctivite et contre plusieurs autres maladies comme la bronchite ou la tuberculose (**Kerharo et Adam, 1974; Jongkind et Lemmens, 1989**). Plusieurs travaux ont prouvés les activités anti-inflammatoire et analgésique (**Ishola et al., 2011; Ishola et al., 2013**) et les activités anti-dépressive et anxiolytique (**Ishola et al., 2012**) de *Cnestis ferruginea*.



Figure 8: Feuilles de *Cnestis ferruginea* (Photographie TUO, 2012)

I-4-5- *Trema orientalis* (L.) Blume (Ulmaceae)

I-4-5-1- Description

Trema orientalis (Figure 9) est un arbuste héliophile dont le fût est droit et cylindrique, à cime plus ou moins conique composées de rameaux étalés et peut aller jusqu'à 18 m de hauteur. L'écorce est lisse ou légèrement fissurée, fine, lenticellée gris claire. Les feuilles sont alternes distiques membraneuses, ovales ou légèrement elliptiques plus large à la base à bords dentés, à base arrondie ou plus ou moins cordée et plus ou moins asymétrique (**Arbonnier, 2009**). Le fruit est petit, arrondi et charnu. Il a un système racinaire étendu qui lui permet de subsister pendant de longues périodes de sécheresse (**Letouzey, 1968; Perry, 1980**).

I-4-5-2- Localisation, utilisations et phytochimie

En Afrique, *Trema orientalis* s'étend du Sénégal à la Somalie, en passant par toute la région d'Afrique centrale. On la retrouve aussi de l'ouest de l'Himalaya jusqu'au Pacifique, au Japon du sud, en Amérique du Sud et atteint l'Australie.

Le bois est adapté pour la production de pâte à papier (**Jahan et al., 2007; Orwa et al., 2009**) donnant du papier avec une bonne résistance à la traction et au pliage (**Orwa et al., 2009**). L'écorce peut être utilisée pour la fabrication de ficelle ou de corde, et pour imperméabiliser des lignes de pêche (**Malan et al., 2005**). En Côte d'Ivoire, *Trema orientalis* est très généralement employé pour traiter les ictères, les affections broncho-pulmonaires, la fièvre, les douleurs rhumatismales et le paludisme. Administrée par voie orale, la plante aurait une action purgative et diurétique (**Bouquet et Debray, 1974**).

Cette espèce a un impact écologique élevé avec au moins 14 espèces de papillons l'utilisant comme source de nourritures pour les chenilles (**Malan et al., 2005**). Ses feuilles, gousses et graines sont utilisées comme fourrage pour nourrir les bovins, les buffles et les caprins aux Philippines (**Orwa et al., 2009**). **Bouquet et Debray (1974)** ont noté l'absence d'alcaloïdes. Quant à **Bekro et al. (2007)**, ils ont noté une absence de tanin gallique, de quinone et de saponosides. **Kerharo et Adam (1974)** ont montré que les feuilles exercent des effets diurétiques du fait des flavonoïdes et des effets vermifuges du fait des polyterpènes. De leur côté, **Dimo et al. (2006)** ont montré que *Trema orientalis* a des propriétés antidiabétiques (activité hypoglycémique) et pourrait être bénéfique pour les diabétiques atteints de maladies cardiovasculaires. **Dijoux-Franca et al. (2001)**, quant à eux ont montré la présence de dihydrophenanthrène et phenyldihydroisocoumarine dans *Trema orientalis*. Une étude récente sur les effets inotropes et chronotropes négatifs des extraits de *Trema orientalis* a été réalisée au niveau du coeur isolé de batracien (**Etou, 2004**).



Figure 9: Feuilles de *Trema orientalis* (Photographie TUO, 2012)

I-4-Stress oxydant

I-4-1-Définition

Le stress oxydant ou stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'azote (ERN) (pro-oxydants) et les systèmes de défenses (antioxydants) en faveur des premiers avec comme conséquence une surproduction de radicaux libres entraînant de nombreux dégâts irréversibles au niveau de la cellule (**Yoshikawa et al., 2000**).

I-4-2- Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe et capables d'une vie indépendante (**Yoshikawa et al., 2000**). Cette caractéristique les rend instables. Par conséquent ils peuvent soit capter un ou plusieurs électrons (agissant alors comme un oxydant) ou en céder (se comportant comme un réducteur) pour se stabiliser.

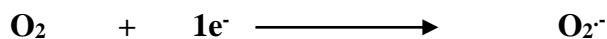
I-4-2-1- Principaux radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans la cellule. Il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle important en physiologie appelés radicaux libres primaires. Les autres sont dits radicaux secondaires et se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Yoshikawa et al., 2000**).

➤ -Radicaux libres primaires

-Le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

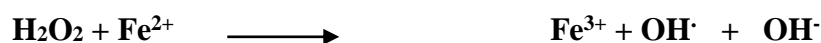
L'anion superoxyde est la première étape de la production de radicaux libres dans les cellules vivantes. Il se forme par réduction de l'oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



Il représente le chef de file des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Garait et al., 2005**).

-Le radical hydroxyle (OH \cdot)

Ce radical se forme par la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sous l'action des métaux de transition tels que le fer II (Fe^{2+}) selon la réaction de Fenton :



Il peut également se former par la réaction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) selon la réaction de Haber et Weiss (**San et al., 2004**).

-Le monoxyde d'azote (NO·)

Il se forme par l'oxydation de l'un des atomes N-terminaux de la L- arginine. La réaction est catalysée par le nitrique oxyde synthétase (NOS) (**San et al., 2004**).

En dehors de ces radicaux libres d'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet ($1O_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être les précurseurs de radicaux libres (**Yoshikawa et al., 2000**). L'ensemble de ces radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou azote (ERN).

➤ Radicaux libres secondaires

Les radicaux libres secondaires sont formés par réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques de la cellule tels que les acides gras (AG), les acides aminés (AA), les acides nucléiques (ADN) etc....

I-4-2-2- Principales sources de production des radicaux libres

Les sources de production des radicaux libres sont autant endogènes qu'exogènes.

➤ Sources endogènes

-La chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de production de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) nécessaires au fonctionnement des cellules. L'ATP produit par les mitochondries est utilisé au cours de différents mécanismes cellulaires comme la synthèse des protéines, le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPase et $Ca^{2+}/ATPase$, lors de la néoglycogénèse ou pour la contraction musculaire avec l'actinomyosine ATPase, etc.... (**Rolfe et Brand, 1997**). Cependant les mitochondries sont une source permanente de production des ERO. En effet la production de l'ATP à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) est couplé à un processus de transfert d'électron jusqu'à un accepteur final (l'oxygène moléculaire) réduit en une molécule d'eau (H_2O).

-L'inflammation

L'inflammation est par ailleurs une source importante de production de radicaux oxygénés par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative. Ce phénomène consiste en l'activation du complexe NADH oxydase, enzyme capable de produire une grande quantité d'anion superoxyde au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte anti-infectieuse. Car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers.

-Le réticulum endoplasmique

Le système de cytochromes P₄₅₀ présent au niveau du réticulum endoplasmique peut conduire à la production d'anion superoxyde non seulement par auto-oxydation (oxydation par oxygène) des composés tels que les neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine), les thiols (cystéines), les coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais également par la détoxification des xénobiotiques

➤ Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables d'induire la production d'ERO.

-L'alcool

L'ingestion d'alcool peut activer la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase, deux enzymes pouvant transformer le principal métabolite, l'éthanol en acétaldéhyde couplé avec une production d'anion superoxyde. L'éthanol peut aussi stimuler la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydases, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450. Enfin l'alcool peut diminuer l'activité des enzymes protectrices (SOD, GPx).

-Les toxiques

Les toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels) sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras (AG) des alvéoles pulmonaires.

➤ Autres sources

En plus de ces sources, on peut citer également les rayonnements UV, les agents photosensibilisants et les radiations ionisantes.

I-4-2-3-Dommages des ERO sur les biomolécules

Les dérivés de l'oxygène produit étant hautement toxique, ils sont susceptibles de jouer un rôle d'oxydant ou d'initiateur de réaction radicalaires vis-à-vis de nombreuses molécules. Ils peuvent ainsi altérer la structure ou les fonctions cellulaires. Les effets en sont observables à l'échelle de l'organisme tout en entier.

➤ Effets des ERO sur les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les radicaux libres pour former un radical diène conjugué qui sera ensuite oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique est une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme à son tour un nouveau diène conjugué. Les peroxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C

pour donner naissance à divers produits de décomposition tels que la malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonanal qui sont les plus toxiques de la peroxydation lipidique (**Martinez-Cayuela, 1995**).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation des LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par les macrophages, forment les dépôts lipidiques de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires. Tandis que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité des membranes et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

➤ **Effets des ERO sur les protéines**

Les acides aminés sont la cible des ERO. Soit au niveau des chaînes latérales avec formation de produits oxydés, soit au niveau de la liaison peptidique provoquant la fragmentation de la chaîne (**Berlette et al., 1997**). Si la majorité des acides aminés (AA) peuvent être oxydés par les ERO, les AA soufrés (Cystéine, Méthionine) et aromatiques (Tyrosine, Tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des AA peut conduire à des modifications structurales plus importantes qui affectent leur fonctionnement, leur antigénicité et leur activité (**Lehucher et al., 2001** et **Valko et al., 2007**). Les protéines modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome.

➤ **Effets des ERO sur les acides nucléiques (AN)**

L'ADN, bien qu'étant la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, est sensible à l'attaque par les radicaux libres de l'oxygène. L'on dénombre cinq principales classes de dommages oxydatifs médiés par le radical hydroxyle (OH[°]). Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Cette modification de l'ADN induit des mutations par transversion GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées dans les cellules cancéreuses (**Yoshikawa et al., 2000**).

I-4-3-Systèmes antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant une substance capable, à concentration relativement faible d'entrer en compétition avec d'autres substances oxydables et retarder ou empêcher l'oxydation de ces substances. Les défenses antioxydantes peuvent être divisées en systèmes enzymatiques et non enzymatiques (**Goudable et Flavier, 1997**).

I-4-3-1-Systèmes enzymatiques

Ils sont au nombre de quatre (04) principalement : les superoxydes dismutases, la catalase, les glutathions peroxydases et les glutathions réductases.

➤ **Superoxydes dismutases (SOD)**

C'est une classe de métalloenzymes étroitement apparentées qui catalyse la dégradation de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (O_2).

Ces enzymes sont présentes dans presque toutes les cellules aérobies et dans les liquides extracellulaires.

➤ **La catalase (CAT)**

La catalase est responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par une transformation en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) selon la réaction suivante :



Cette enzyme est plus abondante dans le foie et les globules rouges (**Garait *et al.*, 2005**). Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. Il agit en synergie avec les SOD car son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2).

➤ **Glutathion peroxydase(GPx) et glutathion réductase**

Les glutathions peroxydases catalysent l'oxydation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion (GSH) sont oxydées en GS-SG. La glutathion réductase quant à elle a pour rôle de régénérer le glutathion GSH à partir du GS-SG grâce au NADH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet la concentration cellulaire en glutathion étant limité, il est nécessaire de le réduire constamment pour le bon fonctionnement de la glutathion peroxydase (**Martinez-Cayuela, 1995**). Ces deux isoenzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

I-4-3-2-Systèmes non enzymatiques

Ce sont généralement des micronutriments apportés par notre régime alimentaire. On peut citer la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les polyphénols et les oligoéléments. Ils peuvent être classés en deux groupes, selon qu'ils soient hydrosolubles ou hydrophobes.

➤ **La vitamine C ou Acide ascorbique**

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur. De ce fait, elle est plus présente dans le sang. Elle permet la régénération de la vitamine E et du glutathion oxydé (GS-SG).

➤ **La vitamine E (vit E)**

Elle désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature: les alphas, bêta, gamma et lambda-tocophérols et tocotrienols. Les rôles principaux des tocophérols sont la protection antioxydante de la surface des lipoprotéines et des membranes cellulaires.

➤ **Les caroténoïdes**

Ce sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangé à rouge. Les principaux caroténoïdes sont le bêta-carotène (provitamine A, le pliocène et la lutéine). Malgré la similarité de leur structure, ils exercent différentes fonctions biologiques dont certaines préviennent ou contrôlent efficacement la production de radicaux libres.

➤ **Les polyphénols**

Les polyphénols ou composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisés en plusieurs classes chimiques avec un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (**Bloor, 2001**). Ils sont très répandus dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de la plante telles que la croissance et la reproduction (**Fleuriet, 1982 ; Yilmaz, 2006**). Deux principales classes sont largement répandues. La première comportant les phénols simples tels les acides phénoliques dont les plus connus sont l'acide gallique et l'acide salicylique et les flavonoïdes avec pour chef de file la quercétine. La seconde classe est constituée de phénols sous forme de polymères tels que les tanins condensés et les lignines. Les principaux mécanismes des activités antioxydantes à polyphénols sont la réduction des radicaux libres grâce à leur faible potentiel redox dû la présence de groupements aromatiques, l'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant, la chélation des traces métalliques responsables de la production de ERO telles que le fer et le cuivre et enfin la protection des systèmes antioxydants (**Halliwell, 1994**).

➤ **L'acide urique**

L'acide urique est l'antioxydant qui a la plus forte concentration dans le sang et fournit plus de la moitié de la capacité antioxydante totale du sérum humain (**Becker, 1993**).

➤ **Le Glutathion(GSH)**

Le glutathion est un peptide contenant la cystéine. Il est synthétisé dans les cellules à partir des constituants en acides aminés (**Halliwell et McGutteridge, 2007**). Les propriétés antioxydantes du glutathion sont dues à la présence de la fonction thiol dans son fragment cystéine. En raison de sa forte concentration et son rôle central dans le maintien de l'état redox de la cellule, il constitue l'un des plus importants antioxydants cellulaires (**Meister & Anderson, 1983**)

➤ **Les oligoéléments**

Ce sont les micronutriments tels que le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le sélénium (Se). Ces oligoéléments ne sont pas des antioxydants au sens strict du terme mais ils contribuent au renforcement des systèmes de défenses en tant que cofacteurs essentiels des systèmes antioxydants enzymatiques.

I-4-4-Les pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies. La théorie radicalaire explique ces altérations par l'accumulation de molécules oxydées et par conséquence l'apparition de mutations, la carbonylation des protéines, leur dénaturation et leur agrégation, l'oxydation des lipides (**Pincemail et al., 2002**).

I-4-5-Stress oxydatif et paludisme

La défense de l'hôte contre cette infection est contrôlée par un système immunitaire inné et adaptatif. Globalement, les réponses immunitaires visant à contrer les infections à *Plasmodium* résultent en la destruction des parasites, mais ces réponses sont aussi exacerbées et conduisent à des dommages à l'hôte (**Lamb et al., 2006**). Durant les infections à *Plasmodium* chez l'homme ainsi que chez des modèles expérimentaux (primates, souris), un fort stress oxydatif est généré, en partie dû au métabolisme des composants riches en fer (**Schwarzer et al., 2003; Becker et al., 2004; Hans et al., 2009**). Une des conséquences du paludisme consiste en une diminution des enzymes antioxydantes et des composés tels la catalase, la GSH peroxydase, les SOD, le GSH et bien d'autres (**Mathews et Selvam, 1991; Delmas-Beauvieux et al., 1995; Erel et al., 1997; Luersen et al.,**

2000) ainsi qu'en une augmentation de la production des ERO. En effet, les faibles niveaux d'enzymes antioxydantes observés durant la phase aiguë de la malaria seraient attribués au fait qu'une activité enzymatique élevée est nécessaire afin de protéger et régénérer les érythrocytes durant l'hémolyse, causée par une production excessive de radicaux superoxyde (**Delmas-Beauvieux et al., 1995, Pincemail, et al., 1999**). Le niveau de malondialdéhyde, un des principaux marqueurs du stress oxydatif est plus élevé chez les sujets atteints du paludisme (**Adil et al., 2013**). Ainsi, le stress oxydatif induit durant ces infections semblerait résulter d'un déséquilibre entre cette diminution des enzymes anti-oxydantes et cette production accrue d'ERO. Parallèlement, on note une décroissance significative des facteurs antioxydants tels que les vitamines A et E chez les patients (**Djossou et al., 1996**). D'autres parts, selon **Hemmer et al., 2005**, le paludisme grave à *P. falciparum* est associé à une activation des neutrophiles et des monocytes, à une élévation du taux de cytokines et à des dommages au niveau des cellules endothéliales. Et que l'activation des neutrophiles et des produits sécrétoires pourrait non seulement produire l'activité antiparasitaire mais aussi des dommages au niveau des cellules endothéliales qui peut être prévenue par les antioxydants et les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques *in vitro*. Un traitement par des antioxydants vise à renforcer les systèmes antioxydants déjà présents et protège l'hôte. En effet, il a été suggéré que l'administration de vitamine E ou de trolox protégerait partiellement contre la malaria cérébrale (**Postma et al., 1996 ; Hans et al., 2009**).

I-4-6-Rôle controversé des antioxydants dans l'action de l'artémisinine

Un fort stress oxydatif est généré, en partie dû au métabolisme des composants riches en fer (**Schwarzer et al., 2003; Becker et al., 2004; Hans et al., 2009**) dont une des conséquences au cours de l'accès palustre consiste en une diminution des enzymes anti-oxydantes. Ainsi l'importance de l'administration d'antioxydants pendant les accès palustres n'est plus à démontrer (**Akpotuzor et al. 2012**). Cependant, l'action des antioxydants pourrait contrarier celle de l'artémisinine (qinghaosu), principe actif de *Artemisia annua*; il s'agit d'une plante médicinale utilisée depuis 2 000 ans contre les fièvres palustres. Cette plante contient l'un des plus puissants antipaludique (artémisinine) de la pharmacopée actuelle avec une forte activité *in vitro* de l'ordre du nanomole. La molécule d'artémisinine a été isolée sous forme cristalline en 1972; sa structure chimique a été déterminée en 1975. C'est un sesquiterpène lactone avec un pont endopéroxyde (pont reliant deux atomes d'oxygène), est unique en chimie des substances naturelles (**Fleurentin et al., 2002**). Elle est également une molécule à haute énergie, prompte à réagir et à perdre son énergie car peu stable (**Jansen et al., 2007**). L'étude des relations structure-activité du qinghaosu a mis en évidence que l'endopéroxyde est indispensable à l'activité antipaludique. Le pont endopéroxyde

réagit avec les atomes de fer contenu dans la cellule pour former des radicaux libres, toute substance protégeant des dommages radicalaires pourrait contrarier son activité (**Blanc et al., 2008**). Or on sait que *Artemisia Annua* contient en outre un véritable cocktail de molécules de flavonoïdes (scopolétine, casticine, chrysoplenetine, chrysofenol-D, cirsilineol...) (**Chiung-Sheue et al., 1992**). Ces flavonoïdes se trouvent dans les feuilles, mais également et peut-être à concentration plus importante dans les tiges de la plante (**Woerdenbag et al., 1991**). Par ailleurs, à doses faibles les molécules, comme notamment la quercétine, potentialisent l'action de l'artémisinine, peut-être en inhibant des enzymes destructeurs de l'artémisinine (**Ferreira et al., 2010**). Selon **Ferreira et al. (2010)**, certains enzymes (et notamment le CYP450) sont détruits par les flavonoïdes présents dans *Artemisia annua*. Les flavonoïdes favoriseraient ainsi l'efficacité des molécules d'artémisinine qui resteraient actives plus longtemps dans l'organisme. De plus les flavonoïdes auraient une action synergique de l'artémisinine, en favorisant la pénétration de l'artémisinine à travers les membranes cellulaires du parasite. Les différents composants ont un effet synergique comme le confirme certaines études récentes qui montrent que l'efficacité de la tisane est trois fois plus importante que ne le serait la même quantité d'artémisinine prise isolément (**De Donno et al., 2012; Elfawal et al., 2012**). Le traitement par l'*Artemisia annua* n'est donc pas une monothérapie, mais plutôt une véritable polythérapie, et peut-être les recherches ont-elles négligé ces différentes molécules au profit de l'artémisinine elle-même. Les flavonoïdes ayant un important pouvoir antioxydant, la question d'antagonisme entre les antioxydants et l'artémisinine mérite une étude approfondie pour savoir avec exactitude les molécules qui peuvent contrarier son action.

II-MATERIEL
ET
METHODES

II-1-Matériel

II-1-1-Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* et *Trema orientalis*. Il s'agit de 5 plantes n'ayant pas (ou très peu) fait l'objet d'étude pour leur activité antiplasmodiale. Les feuilles de *Diospyros monbuttensis* ont été récoltées dans le mois de Janvier 2013 à Talahini-Sokoura dans le Département de Sandegué (Nord-Est de la Côte d'Ivoire). Celles de *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* et *Trema orientalis* dans le mois de Mars 2013 dans le District d'Abidjan. Le moment choisi pour la récolte des plantes était la matinée (9 heures).

II-1-2-Matériel technique et réactifs pour les tests phytochimiques et antioxydants

Le matériel technique comprend un broyeur mécanique (Retsch, M6951), un agitateur magnétique (IKAMAG RCT), un mixeur (Blender Bruon H-999A), une étuve (Selecta) et une balance de précision (Denver Instrument), un spectrophotomètre UV-Vis (BioMérieux).

L'essentiel des réactifs utilisé est principalement constitué du réactif de Folin-ciocalteu (Sigma Chemical Co, USA), de la vanilline (Sigma Chemical Co, USA), du carbonate de sodium (Sigma Chemical Co, USA), du méthanol (Sigma Chemical Co, USA), du chlorure d'aluminium (Prolabo), de l'acétate de potassium (Prolabo), l'acétate de sodium (Prolabo), du 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH) (Sigma Chemical Co, USA), du tampon phosphate (Prolabo), de l'éthanol (Sigma Chemical Co, USA), de l'acide hydrochlorique (Sigma Chemical Co, USA), du chlorure ferreux (Prolabo), du ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] (Prolabo), de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) (Sigma Chemical Co, USA), de l'acide trichloroacétique (TCA) (Prolabo).

L'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine tous de chez Sigma Chemical Co, USA ont été utilisés pour déterminer les droites d'étalon. Tous les produits chimiques et les solvants utilisés sont de qualité analytique.

II-1-3-Matériel technique, milieux de culture et réactifs pour les tests *in vitro*

Pour la réalisation de la culture *in vitro* de *P. falciparum*, nous avons eu besoin de RPMI 1640 (Gibco[®], Life Technologie, UK), du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) (Sigma Chemical Co, USA), du NaCl (Sigma Chemical Co, USA), de l'HEPES (Sigma Chemical Co, USA), de l'hypoxanthine tritiée (Sigma Chemical Co, USA), du glycérol (Sigma Chemical Co, USA), du D-sorbitol (Sigma Chemical Co, USA) et de Albumax[®] (sérum albumine bovine; il est utilisé en remplacement du sérum humain et est préparé à 5% dans de l'eau distillée) (Gibco[®], Life Technologie, UK). Ces produits étaient nécessaires pour la préparation du milieu de culture. Le bicarbonate de sodium et

l'HEPES [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)] jouent le rôle de tampon afin de maintenir le pH du milieu entre 7,2 et 7,4 (**Trager et Jensen, 1976**). L'antibiotique utilisé pour limiter toute contamination microbienne est la neomycine (Sigma Chemical Co, USA).

Nous avons également utilisé, la chloroquine, la quinine et l'artesunate (MMV, N°: S222301) comme témoins positifs.

Le matériel technique utilisé est principalement constitué de microplaques 96 puits (Costar™ 96), de microscope Leica® DM500, de hotte à flux laminaire (ESCO Airstream® Class II) d'incubateur (Heratherm®, Thermo Scientific), de spectrofluorimètre (Spectra max GEMINI XPS, Molecular Devices), d'un vortex (Lab dancer VWR), des filtres millipores 0,22 µm (Stericup Durapore®), d'un aspirateur (Vacum pump XF54), d'une centrifugeuse (Eppendorf, Centrifuge 5702), de cloches à bougie (Bilups-Rothenber inc.), un Bain-Marie (LabArmor) et un lecteur de plaque (Multiskan FC, Thermo Scientific) pour les tests hémolytiques. Les Bombonnes d'azote liquide (Biocane, Thermo Scientific) sont utilisées pour la conservation des souches de référence.

II-1-4- Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué:

-De globules rouges du groupe O et de Rhésus positif pour une bonne compatibilité sérique.

-De souches de *Plasmodium falciparum*:

- Isolats cliniques: ce sont des souches plasmodiales hospitalières prélevées chez des malades à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et au Centre de Santé Communautaire de Wassakara (Yopougon).
- Souches de référence ATCC sélectionnées pour leurs sensibilités différentes à la chloroquine :
3D7 chloroquinosensible avec une valeur de CI₅₀ moyenne de la chloroquine de 27 nM gracieusement offerte par le Département de Biochimie, Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire de l'Université du Ghana (Accra) ;
Dd2 (MRA-156, lot N°58319486, MR4 ATCC® Manassas, Virginie) chloroquinorésistante, avec une valeur de CI₅₀ de la chloroquine de 114 nM.

II-2-Méthodes

II-2-1-Enquête ethnobotanique, recherches bibliographiques et sélection des plantes étudiées

Les méthodes de pharmacopée populaire ont été utilisées pour dresser une liste de plantes traitant le paludisme. La pharmacopée populaire (**Betti, 1998**) consiste en des entretiens directs, collectifs ou individuels avec les populations sur les plantes utilisées dans les soins courants (Annexe I). Les investigations ont été menées dans le mois de novembre 2012 à Abidjan et à

Bondoukou (ville de l'est de la Côte d'Ivoire) par des approches ethnobotaniques auprès de 27 acteurs de la médecine traditionnelle. Les données ethnobotaniques (nom local, mode de préparation, usage traditionnel, association des plantes, indications, posologie, contre indication et effets secondaires) sont obtenues via les conversations avec les tradipraticiens.

Les échantillons recensés ont été identifiés au Centre National de Floristique (C.N.F.) de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan (Côte d'Ivoire) par Feu le Professeur Aké-Assi Laurent. Ensuite, les recherches bibliographiques poussées sur les plantes dans les bases de données (PubMed et Hinari) en utilisant les mots clefs ont permis de rassembler les informations concernant les plantes antipaludiques. Les articles sélectionnés concernent des études sur l'ethnobotanique et l'activité antipaludique *in vitro* des plantes répertoriées. Ces différentes données bibliographiques nous ont permis de dresser un tableau synoptique des informations relatives à chaque plante. A l'issue de cette revue, les plantes n'ayant pas (ou très peu) fait l'objet d'étude pour leur activité antiplasmodiale ont été sélectionnées pour les études ultérieures.

II-2-2-Méthode d'extraction

II-2-2-1-Préparation des extraits

Les feuilles ont été séchées à l'abri du soleil pendant une semaine à température ambiante avant d'être réduites en poudre fine par broyage à l'aide d'un broyeur mécanique broyeur mécanique (Retsch, M6951). A partir de la poudre obtenue, les différents extraits bruts ont été préparés. Sur la poudre fine obtenue, dans un premier temps des décoctions de chaque plante ont été réalisées pour être le plus proche possible de la forme d'utilisation traditionnelle. Ensuite, 3 extractions successives par des solvants de polarité croissante, selon les protocoles de **Zirihi *et al.* (2003)** et **Bekro *et al.* (2007)** ont été réalisées. Dans cet ordre, trois solvants à savoir l'hexane, le méthanol et l'eau ont été utilisés (Figures 10 et 11).

Les rendements des extractions ont été déterminés à partir du rapport de la masse de l'extrait sur la masse de poudre sèche utilisée.

➤ Décoction

Dans un Erlenmeyer, 20 g de poudre fine sèche ont été dissouts dans 1L d'eau distillée. L'ensemble a été homogénéisé puis porté à ébullition pendant 30 min. L'homogénat obtenu a été filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier Whatman 3 mm. Un premier filtrat nommé filtrat 1 a été obtenu. Sur les marcs résiduels, un litre d'eau distillée a été ajouté. La même opération a été reprise pour donner le filtrat 2. Ces 2 filtrats obtenus ont été ensuite regroupés et évaporés à l'étuve « Venticel » à 55°C pendant 48 heures. Cette série d'opérations a conduit à un extrait que nous avons appelé extrait de décoction.

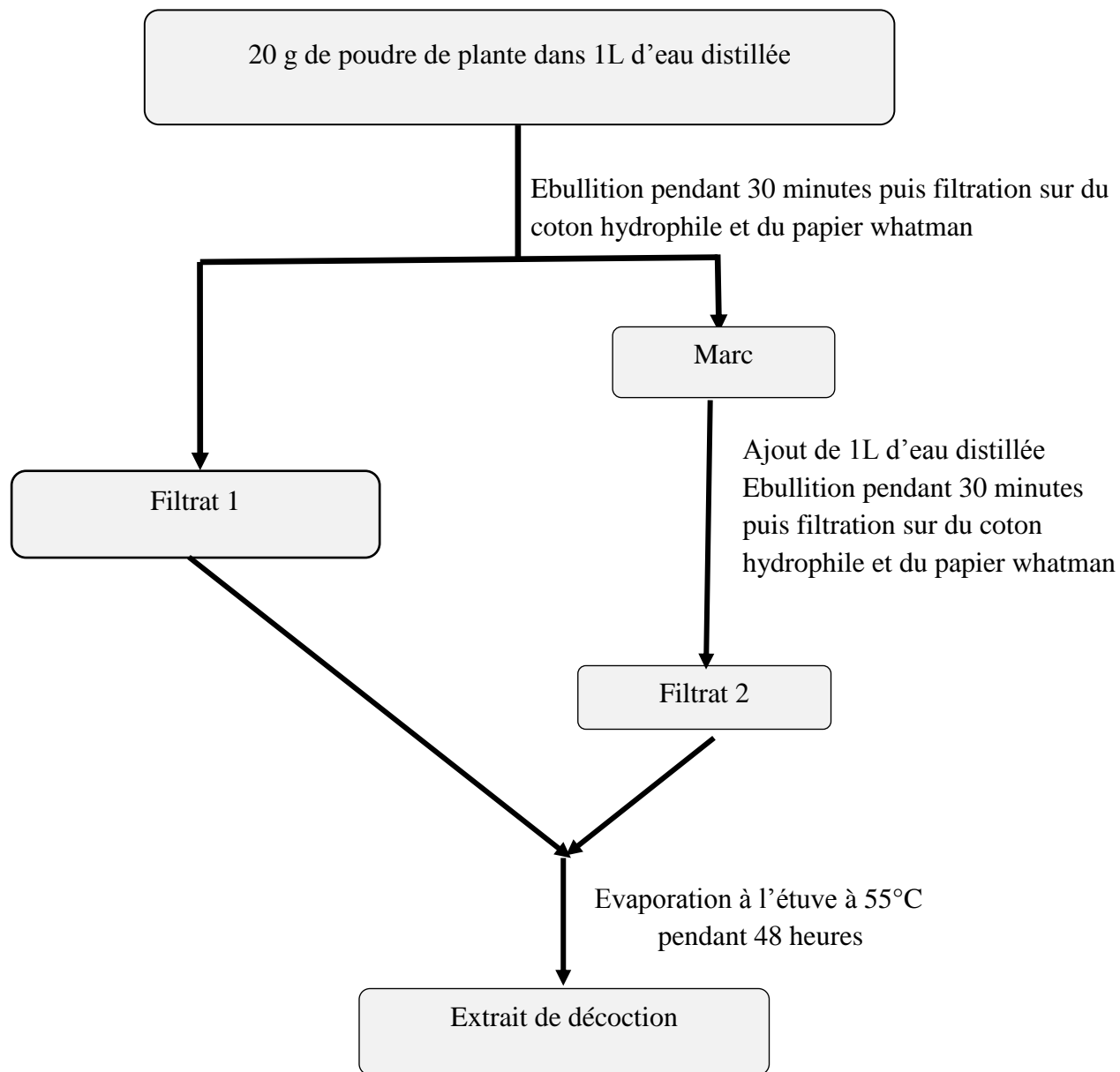


Figure 10: Diagramme d'obtention de l'extrait de décoction des plantes

➤ **Extraction par l'hexane.**

Cinquante gramme de la poudre fine sèche ont été dissout dans 150 mL d'hexane, dans un blender. L'ensemble a été homogénéisé par agitation vigoureuse au blender pendant 10 min. L'homogénat obtenu a été filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier Whatman 3 mm. Le premier filtrat obtenu a été nommé filtrat hexanique 1. Sur les marcs résiduels, 150 mL d'hexane ont été ajoutés; après 10 min d'agitation puis filtration, le filtrat hexanique 2 a été obtenu. La même opération reprise données le filtrat hexanique 3. Ces 3 filtrats obtenus ont été ensuite regroupés et évaporés à l'étuve «Venticel» à 55°C pendant 24 heures. Cette série d'opérations a conduit à un extrait que appelé extrait hexanique.

➤ **Extraction par le méthanol.**

Après l'extraction par l'hexane, le marc résiduel a été séché. La poudre obtenue a été récupérée dans 150 ml de méthanol. Après 10 min d'homogénéisation par agitation au blender et filtration, le le filtrat méthanologique 1 a été obtenu. La même opération a été reprise et elle a permis d'obtenir le filtrat méthanologique 2 puis le filtrat 3. Ces 3 filtrats obtenus ont été ensuite regroupés et évaporés à l'étuve «Venticel» à 55°C pendant 24 heures. Cette série d'opérations a conduit à un extrait appelé extrait méthanologique.

➤ **Préparation de l'extrait aqueux.**

L'opération précédente est répétée sur le marc résiduel de l'extrait méthanologique avec 150 mL d'eau distillée. Les 3 filtrats obtenus ont été ensuite regroupés et évaporés à l'étuve « Venticel » à 55°C pendant 48 heures. Cette opération a conduit à un extrait appelé extrait aqueux.

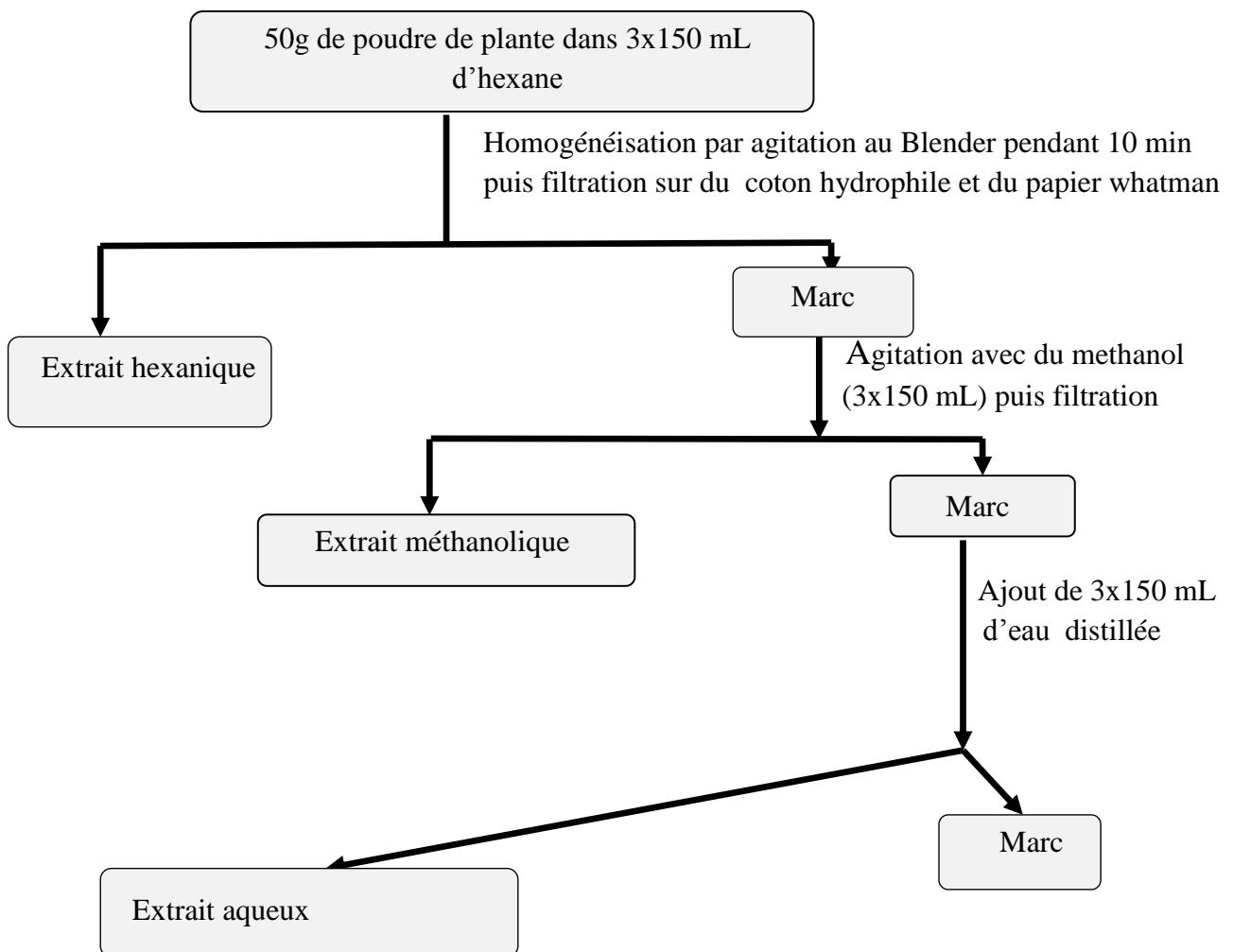


Figure 11: Diagramme d'obtention des extraits hexanique, méthanolique et aqueux des plantes (Zirihi *et al.*, 2003; Bekro *et al.*, 2007)

➤ **Partition liquide-liquide**

Dans l'optique d'améliorer l'activité des extraits bruts ayant donné de bonnes activités antiplasmodiales, ils ont subi une chromatographie de partage, en utilisant des solvants de polarité croissante: le diéthylique éther, le butanol et l'acétate d'éthyle. C'est la méthode d'extraction liquide-liquide ou partition liquide-liquide.

Cette méthode consiste en un partage liquide-liquide avec des solvants non miscibles entre eux. Toutes les partitions obtenues ont subi les tests d'activité biologique. Seules les partitions ayant montré une activité intéressante sont retenues.

La méthode de partition est inspirée de celles de **Sanogo *et al.* (2006)**, **N'Guessan *et al.* (2007)** et **Bolou *et al.* (2011)**. Cinq grammes de lyophilisat des extraits bruts ayant donné de bonnes activités antiplasmodiales sont repris dans 100 mL d'eau distillée. La solution aqueuse ainsi obtenue a été mise dans une ampoule à décanter. Il est ensuite procédé à une séparation liquide-liquide, avec des solvants de polarité croissante: le **diéthylether**, le **butanol** (*n*-BuOH) et l'**acétate d'éthyle** (ACoET). La solution aqueuse sera extraite avec 3 x 100 mL de chaque solvant. Chaque portion restera 20 min en contact avec la phase aqueuse. Les trois portions de chaque phase organique sont réunies et concentrées. La phase aqueuse résiduelle après traitement par les solvants organiques a été également concentrée et évaporée (Figure 12).

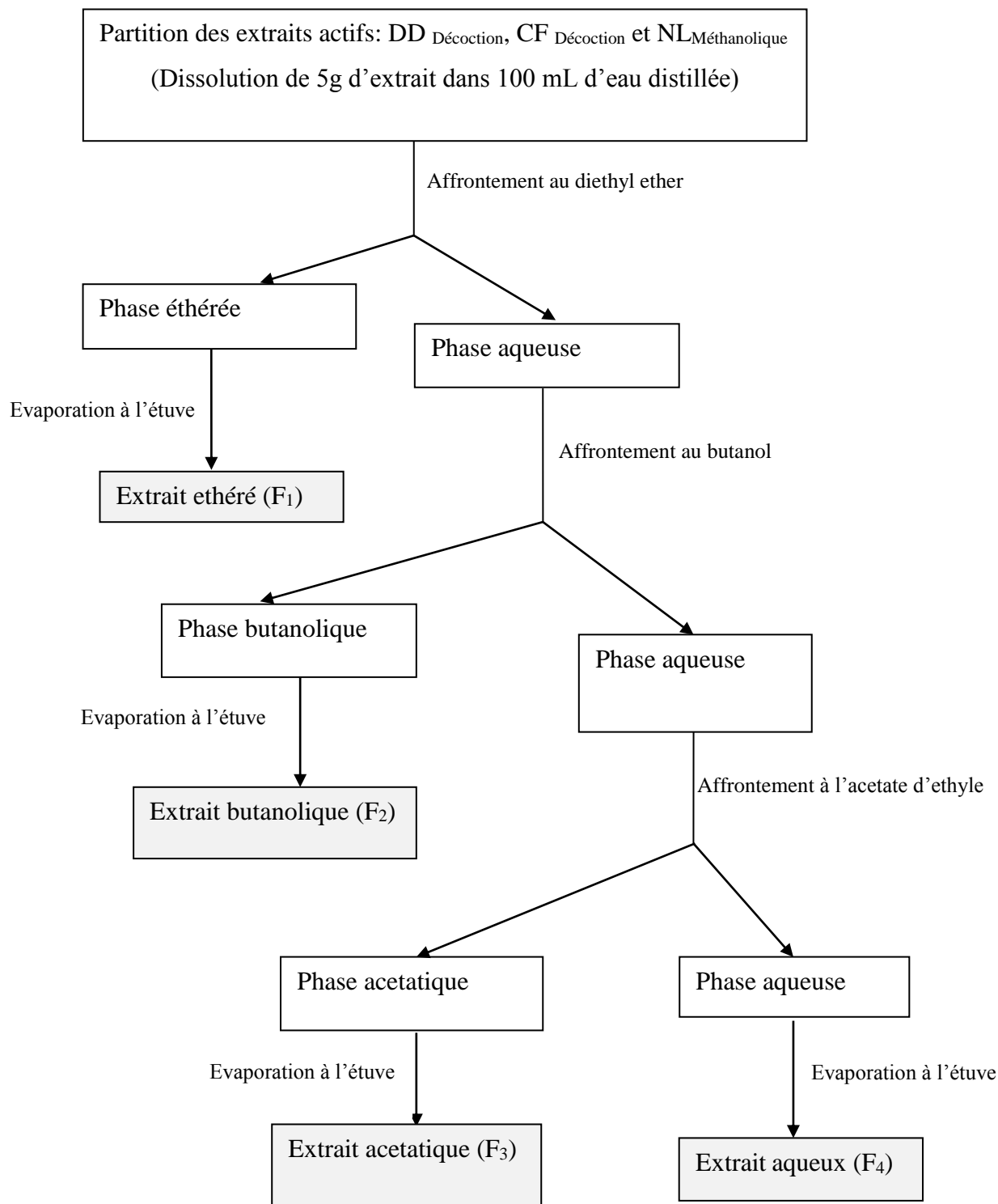


Figure 12 : Diagramme des partitions liquide-liquide avec le diethylether, le butanol, l'acétate d'éthyle et l'eau (Sanogo *et al.*, 2006 ; N'Guessan *et al.*, 2007 ; Bolou *et al.*, 2011)

DD Décoction : Décoction de *Dialium dinklagei*

CF Décoction : Décoction de *Cnestis ferruginea*

NL Méthanologique : Extrait méthanologique de *Newboudia laevis*

II-2-3-Etudes phytochimiques

II-2-3-1-Criblage phytochimique

L'analyse phytochimique est réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. Elle a porté d'une part sur les extraits de décoction, hexanique, méthanolique, aqueux et d'autres parts sur partitions des drogues des plantes répertoriées. Les différents groupes chimiques ont été caractérisés selon les techniques décrites dans les travaux de **Nemlin et Brunel (1995)**, **Békro et al., (2007)** et **Bruneton (2009)**. Les résultats sont classés selon :

Présence: +;

Absence: -

➤ **Mise en évidence des stéroïdes**

Test de Salkowski: 5 gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutées à 1 mL d'extrait, l'observation d'une coloration rouge dans chaque extrait indique la présence de stéroïdes.

➤ **Mise en évidence des stérols et polyterpènes** (Réaction de Liebermann)

A 0,1 g d'extrait dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique dans une capsule puis repris dans un tube à essai sont coulés 0,5 mL de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert révèle la présence de stérols et triterpènes.

➤ **Mise en évidence des saponines** (Indice mousse)

0,1 g d'extrait est dissous dans un tube à essai contenant 10 mL d'eau distillée. Le tube est agité vigoureusement pendant 30-45 secondes dans le sens de la longueur puis laissé au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse est mesurée.

La persistance d'une mousse de plus de 1 cm de hauteur indique la présence de saponines.

➤ **Mise en évidence des alcaloïdes** (Réaction de Burchard)

A 1mL de chaque solution, 2 gouttes de réactif de Burchard (réactif iodo-ioduré) sont ajoutés. L'observation d'un précipité de coloration brun-rougeâtre indique une réaction positive.

➤ **Mise en évidence des polyphénols:** La réaction au chlorure ferrique (FeCl₃)

A 2 mL d'extraits, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % est ajoutée. L'obtention d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique une réaction positive.

➤ **Mise en évidence des flavonoïdes** (Test à la soude)

Dans un tube contenant 3 mL de la solution d'extrait, quelques gouttes d'une solution de NaOH10 % sont ajoutées. Une coloration jaune-orangée caractérise la présence des flavonoïdes.

➤ **Mise en évidence des anthocyanes**

A 5 mL d'extrait à 5 %, sont ajoutés 5 mL H₂SO₄ à 10 %, puis une base (5 gouttes de NH₄OH 25 %). Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu-violacé en milieu basique, cela permet de conclure la présence d'anthocyanes.

➤ **Mise en évidence des leucoanthocyanes**

A 1 mL d'extrait, sont ajoutés 5 mL d'alcool chlorhydrique. L'ensemble est chauffé au bain-marie pendant 15 minutes. Une coloration rouge cerise ou violacée permet de conclure à la présence de leucoanthocyanes.

➤ **Mise en évidence des tannins** (Réaction au chlorure ferrique 1 %)

A 1 ml d'extrait contenu dans un tube à essai sont ajoutés 2 mL d'eau puis une à deux gouttes de chlorure ferrique 1 %. L'apparition d'une coloration bleue, bleu-noire ou noire indique la présence de tannins galliques ; la coloration verte ou vert-foncé indique la présence de tannins catéchiques.

➤ **Mise en évidence des quinones** (Réaction de Borntraeger)

Un aliquote d'extrait est dissout dans 5 mL de HCl dilué au 1/5 et chauffée au bain-marie bouillant pendant 30 min, puis extrait avec 20 mL de CHCl₃ après refroidissement. A la phase organique sont additionnés 0,5 mL de NH₄OH diluée à 50 %. L'apparition d'une teinte allant du rouge au violet indique une réaction positive.

➤ **Mise en évidence des coumarines**

A 5 mL d'extrait, sont ajoutés 2 mL d'eau chaude, puis la solution est partagée entre deux tubes à essai. Au contenu des tubes, ajouter 0,5 mL de NH₄OH à 25 % et procéder à l'observation sous l'UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence de coumarines.

➤ **Mise en évidence des glycosides cardiotoniques** (Test de Keller-Kiliani)

Cette réaction est exothermique. Elle se déroule en milieu glacial. A 2 mL de solution aqueuse d'extrait est ajoutée 1 mL d'acide acétique glacial puis 1 mL d'acide sulfurique concentré. L'ajout de 2 à 3 gouttes de FeCl₃ (2 %) donne une coloration vert-bleutée qui caractérise la présence de glycosides cardiotoniques.

II-2-3-2-Dosage des phénols, flavonoïdes et tannins

➤ Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits de plantes ont été déterminées par la méthode au Folin-Ciocalteu (**Li et al., 2007; Bidié et al., 2010 ; Bidié et al., 2011**). A 0,5 mL de chaque extrait de plante de concentration 100 µg/mL sont ajoutés respectivement 5 mL de Folin-ciocalteu dilué au 1/10 dans l'eau distillée et 4 mL de carbonate de sodium (1M). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 15 minutes. Les densités optiques (DO) sont ensuite lues au spectrophotomètre à 765 nm contre un blanc. L'acide gallique qui constitue notre étalon est préparé dans les mêmes conditions que précédemment avec un mélange de solvant méthanol/eau (50 : 50, V/V) à des concentrations allant de 0 à 200 µ/mL.

Les teneurs en phénols totaux des extraits sont exprimées en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extraits).

➤ Dosage des flavonoïdes totaux

La technique utilisée pour la détermination des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits est la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (**Chang et al., 2002**). Ainsi 0,5 mL de chaque extrait de plante de concentration (100 µg/mL) sont prélevés, auxquels sont ajoutés successivement 1,5 mL de méthanol; 0,1 mL de chlorure d'aluminium 10 %, 0,1 mL d'acétate de potassium (1 M) et 2,5 mL d'eau distillée. Après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, les densités optiques sont mesurées au spectrophotomètre à 415 nm. Une solution méthanolique de quercétine avec des concentrations allant de 0 à 100 µg/mL est utilisée comme étalon. Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont exprimées en milligramme d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

➤ Dosage des tannins

Le dosage des tannins se fait par la méthode à la vanilline de **Bainbridge et al., (1996)** avec quelques modifications. Le principe du dosage est basé sur le fait que l'acide tannique (plus particulièrement le flavane-3-ol) en présence du réactif constitué de la vanilline (0,1 mg/mL) en milieu acide (acide sulfurique 70 % (v/v)) donne une coloration rouge dont le maximum d'absorption se situe à 500 nm. La solution étalon est constituée de l'acide tannique (0,1 mg/mL) préparé dans du méthanol 98 %. Une gamme d'étalon est préparée avec une série de 6 tubes dont le premier représente le blanc. Dans les 5 autres tubes sont introduites respectivement 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mL de solution étalon puis le volume de chaque tube est complété à 1 mL avec de l'eau distillée. Le tube test contient 1 mL d'extrait. A chacun d'eux sont ajoutés 5 mL de réactif à la vanilline. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 500 nm contre un

blanc (sans extrait). L'acide tannique (1 mg/mL) a été utilisé comme standard. Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalents acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT/g d'extrait).

II-2-4-Etude *in vitro* de l'activité antioxydante

Cette étude comporte plusieurs étapes qui sont la mesure du pouvoir réducteur, la mesure du pouvoir chélateur et la mesure du pouvoir anti-radicalaire.

II-2-4-1-Activité antiradicalaire: Test qualitatif du DPPH

Une plaque CCM a été utilisée pour déceler l'activité antioxydante des extraits. Ce test est basé sur le principe de la réduction d'un radical stable, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) qui présente une absorption spécifique à 517 nm ce qui lui confère une couleur violette. Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux, sa couleur disparaît pour donner des tâches jaunes sur fond violet.

Les plaques utilisées sont en aluminium recouvertes de silice (Silicagel 60 F₂₅₄, Merck). Sur ces plaques de silicagel, 5 µL d'une solution de concentration 5 mg/mL d'extrait a été déposée. Le développement des plaques s'est effectué dans des cuves en verre contenant l'éluant approprié. Les phases mobiles sont constituées d'un mélange tertiaire de solvants butanol-acide acétique-eau dans des proportions 60 /15 /25.

Après migration, le chromatogramme est pulvérisé avec le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) (0,1 %), dissout dans du méthanol. La plaque chromatographique est ensuite séchée à la température ambiante pendant quelques minutes. L'apparition au visible de taches jaune-pâles sur fond violet (ou pourpre) après un temps de réaction optimal de 30 min, témoigne de l'activité anti-radicalaire.

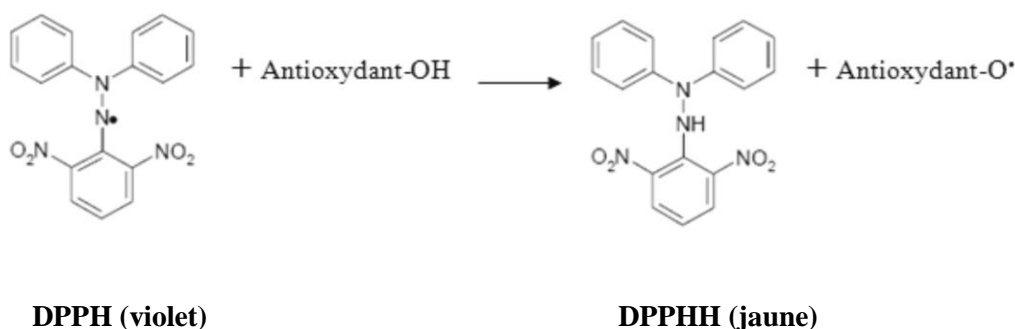
II-2-4-2-Mesure du pouvoir anti-radicalaire: Test quantitatif du DPPH

La mesure de l'activité anti radicalaire des extraits de plantes à été effectuée par le test au 2,2-diphényle -1- picrylhydrazyle (DPPH) selon la méthode de (**Bidié *et al.*, 2010 ; Bidié *et al.*, 2011**). Elle consiste à évaluer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres en mesurant la diminution de la coloration violette due à la réduction des radicaux produits par le DPPH. Ainsi, à partir d'une solution mère d'extrait de plante à 0,1 mg/mL, une gamme de concentration est préparée par double dilution successive. Puis à chaque concentration d'extrait, un même volume de solution méthanolique de DPPH (100 µM) est ajouté. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante (37 °C) et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc échantillon (0 mg/mL d'extrait). La vitamine C (0,1 mg/mL) qui est la substance de référence

est préparée dans les mêmes conditions. Les pourcentages d'inhibition des radicaux DPPH sont calculés par la formule suivante :

$$\text{Inhibition} = \frac{(\text{ABS blanc} - \text{ABS échantillon})}{\text{ABS blanc}} \times 100$$

L'*Abs blanc* correspond à l'absorbance du blanc échantillon tandis que l'*Abs échantillon* représente l'absorbance des extraits de plantes et de la vitamine C. A partir d'une courbe représentant le pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH en fonction des concentrations des extraits et de la vitamine C, les concentrations réduisant 50 % des radicaux DPPH (CI₅₀) sont déterminées et comparées.



II-2-4-3-Mesure du pouvoir réducteur

La méthode décrite par **Topçu *et al.* (2007)** a été utilisée pour déterminer le pouvoir réducteur des extraits de plantes. Elle permet de mesurer la capacité des extraits à réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Ainsi 1 mL d'extraits de plantes ou de vitamine C à différentes concentrations sont mélangés séparément avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 mM ; pH 6,6) et 2,5 mL de ferricyanure de potassium à 1 %. Le mélange est incubé au bain marie à 50 °C pendant 30 minutes. Après l'ajout de 2,5 mL d'acide trichloracétique 10 %, le milieu réactionnel est centrifugé à 3000 trs/minute pendant 10 minutes. A 2,5 mL du surnageant sont ajoutés 0,5 mL de chlorure de fer III à 0,1 %. Après encore 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. L'augmentation de l'absorbance des échantillons indique une augmentation du pouvoir réducteur en fonction des concentrations des extraits et de la vitamine C. Les concentrations induisant une absorbance de 0,5 (EC_{0,5}) des extraits sont déterminées et comparées à celle de la vitamine C.

II-2-4-4-Mesure du pouvoir chélateur

La méthode colorimétrique (**Yildirim *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2007**) basée sur le dosage du complexe formé par l'ion ferreux (Fe²⁺) et la ferrosine (chromophore rouge) ayant un maximum d'absorption à 562 nm a permis de mesurer le pouvoir chélateur des extraits de plantes. En présence

d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur rouge qui est suivie par spectrophotométrie.

Le milieu réactionnel est constitué de 3,7 mL de méthanol et de 0,1 mL de chlorure de fer II (2 mM). Après 5 min d'incubation, 0,2 mL de ferrosine (5 mM) sont ajoutés. Le mélange est agité puis laisser reposer pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe²⁺-ferrosine est mesurée à 562 nm contre un blanc. L'EDTA à différentes concentrations est utilisé comme solution de référence. Le pouvoir chélateur des échantillons est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Pouvoir chélateur (\%)} = [(\text{ABS blanc} - \text{ABS échantillon})/\text{ABS blanc}] \times 100$$

Les concentrations d'extraits de plantes capables de fixer 50 % de métaux (CI₅₀) sont déterminées et comparées à celle de l'EDTA.

II-2-4-5-Analyse statistique

La représentation graphique des données a été réalisée grâce au logiciel Graph Pad Prism 5.0 (Microsoft, USA). La valeur moyenne est accompagnée de l'erreur standard sur la moyenne (Moyenne ± SEM). La différence entre deux valeurs est considérée comme significative lorsque P < 0,05. L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant l'analyse des variances (ANOVA). Lorsqu'une différence significative est observée, des tests de comparaison multiple de Tukey et de Dunnett sont effectués.

II-2-5-Tests biologiques

Les tests d'activité biologique concernent *Plasmodium falciparum*. Deux paramètres sont évalués, l'activité antiparasitaire et l'activité hémolytique.

Le protocole d'étude a eu l'approbation du Comité National d'Ethique et de la Recherche sous le numéro 03-2013 /MSLS/CNER-P (Annexe II).

II-2-5-1-Tests réalisés sur *Plasmodium falciparum*

II-2-5-1-Culture continue

Le milieu de culture est le milieu RPMI (1640, Cambrex) enrichi à 10 % de sérum humain AB+ ou d'Albumax (sérum albumine bovine; il est utilisé en remplacement du sérum humain et est préparé à 5 % dans de l'eau distillée) et de la L-glutamine (2 mM). Les globules rouges sains utilisés sont du groupe O et de Rhésus positif.

Ce milieu est changé tous les jours afin de renouveler les nutriments et de rehausser le pH (autour de 7,2), car les parasites libèrent dans le milieu de l'acide lactique issu du métabolisme du glucose.

La culture est réalisée dans des flacons de 25 et 75 mL, placée dans un incubateur, et maintenue à 37 °C dans un air humidifié et enrichi en CO₂ (5 %). La parasitémie est maintenue à 2 % par dilution quotidienne permettant ainsi le développement du parasite dans des conditions optimales. La parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope (x 1000) à partir d'un frottis sanguin, coloré au Giemsa. Lorsque la parasitémie est supérieure à 2 %, elle est abaissée par division du culot globulaire centrifugé (avec ajout de globules rouges sains).

Mode opératoire

➤ **Congélation et décongélation des hématies**

• **Congélation des hématies**

Les cultures de *Plasmodium falciparum* sont régulièrement sauvegardées par congélation dans de l'azote liquide (-180°C pour le long terme) ou au congélateur (- 80 °C pour quelques jours). Pour cela, une culture de parasitémie élevée (supérieure à 4%) avec une grande proportion de trophozoïtes jeunes est centrifugée à 1000 g pendant 5 minutes. En effet, les trophozoïtes âgés et les schizontes sont détruits pendant la congélation. Le culot est alors repris dans une solution de congélation contenant 28% de glycérol, 3% de sorbitol (ou mannitol) et 0,65% de NaCl préalablement préchauffée à 37 °C, deux fois le volume du culot globulaire. Cette solution est ajoutée goutte à goutte à température ambiante pour permettre au glycérol de bien pénétrer dans les hématies. La culture est ensuite répartie dans des cryotubes en aliquots de 0,5 mL maximum. Ces cryotubes sont plongés dans de l'azote liquide (Figure 13) ou placés dans le congélateur à - 80 °C.

• **Décongélation des hématies**

Pour utiliser une culture congelée, le cryotube est retiré de l'azote liquide et décongelé rapidement au bain-marie à 37 °C. Le contenu est transféré dans un tube 15 mL stérile. Par la suite, une solution de 12% de NaCl stérile est ajoutée goutte à goutte à raison de 0,2 mL pour 1 mL de culture congelée. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, une solution de 1,6% de NaCl stérile est de nouveau ajoutée goutte à goutte à raison de 10 mL pour 1 mL de culture congelée. Après centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et une solution de 0,9% de NaCl stérile est encore ajoutée goutte à goutte à raison de 10 mL pour 1 mL de culture congelée. Après une nouvelle centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot repris dans du milieu complet.

➤ **Préparation du milieu de culture RPMI**

Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institut). La néomycine est utilisée comme antibiotique, pour éviter les contaminations bactériennes. Ainsi donc, le milieu a

été obtenu en dissolvant dans 900 mL d'eau distillée 10,44 g de RPMI 1640, 5,94 g de HEPES, 2,1 mg de NaHCO₃, 100 mg de Néomycin, 50 mg de d'Hypoxanthine, et 5 g d'Albumax. Le volume du mélange obtenu a été ajusté à 1 Litre, puis stérilisé par filtration avec des stericup 0,22 µm et aliquoté dans des tubes à fond cône de 50 mL, hermétiquement fermé. Le milieu ainsi préparé est conservé à 4°C.

➤ **Préparation du stock de culture**

Le culot globulaire est mis en culture dans le milieu RPMI supplémenté d'Albumax ; le volume de la suspension avec des globules rouges non infectés est ajusté pour avoir un hématocrite de 3 à 8 %. La culture est alors placée dans la cloche à bougie puis à l'incubateur à 37 °C.

➤ **Entretien quotidien de la culture et contrôle de la parasitémie**

Les boîtes de culture sont sorties de l'incubateur sans être secouées et le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette stérile (Figure 14). Du milieu de culture RPMI supplémenté d'Albumax est ensuite rajouté au culot globulaire. Puis 0,3 mL de suspension sont prélevés pour le contrôle de la parasitémie. Cet aliquot est centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 min. Ensuite le surnageant est prélevé à l'aide d'une pointe jaune et une pipette automatique. Puis le culot globulaire est homogénéisé. Un frottis sanguin et une goutte épaisse sont réalisés avec 10 µL de culot de globule rouge et la parasitémie est notée.



Figure 13: Bouteilles d'azote liquide utilisées pour la conservation des souches plasmodiales
(Photographie TUO, 2014)

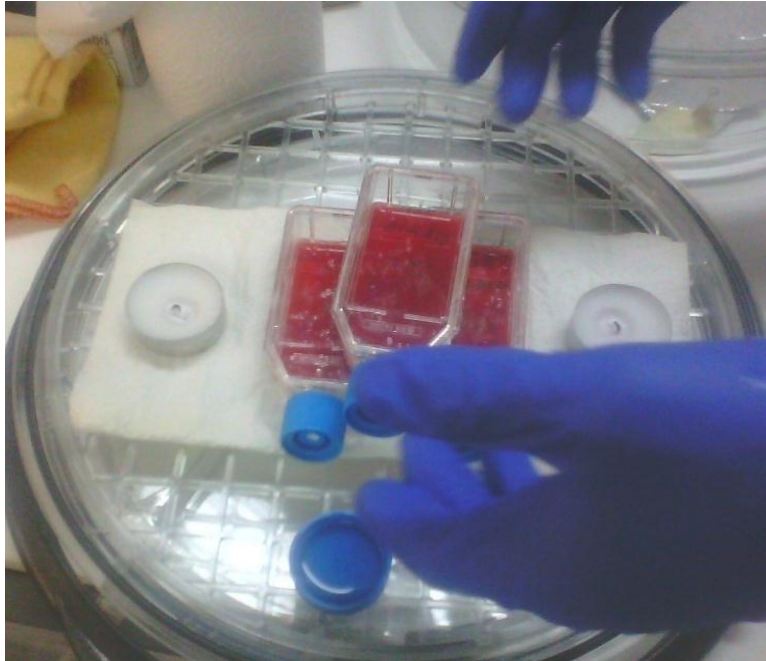


Figure 14 : Boîtes de culture de *Plasmodium falciparum* (Photographie TUO, 2014)

➤ **La synchronisation**

Certains tests requièrent la synchronisation de la culture (tous les parasites au même stade). Le Plasmodium au stade de schizonte mûr est capable de perméabiliser la membrane cellulaire afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques. Ceci provoque une fragilité membranaire qui est plus sensible aux chocs osmotiques. Le sorbitol provoque par choc osmotique la lyse des globules rouges parasités aux stades schizontes. Les formes anneaux (jeunes trophozoïtes) sont donc les seules à survivre.

Protocole

Pour synchroniser une culture, il faut une parasitémie supérieure à 5 %. La culture est centrifugée à 3000 t/min pendant 5 minutes, le volume de surnageant est remplacé par un même volume d'une solution de sorbitol 5 % (dans l'eau distillée stérile) et incubée 10 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps. La suspension est ensuite centrifugée et le culot est lavé 3 fois avec du milieu de lavage. Le culot repris avec le milieu de culture supplémenté de 10 % de sérum humain ou Albumax 0,5 %.

II-2-5-1-2- La culture *ex vivo*

-Collecte des échantillons

Les patients venus en consultation à la Formation Sanitaire Urbaine et Communautaire de Yopougon Wassakara, après un diagnostic clinique du paludisme simple ont été orientés au laboratoire d'analyse pour le diagnostic biologique par Test de Detection Rapide (TDR) (permettant de distinguer les mono infections à *P. falciparum* et les infections mixtes). Les patients de 18 ans et plus, présentant un TDR positif pour la mono infection, ont reçu toutes les informations relatives au projet de recherche par notre équipe. Après avoir obtenu l'assentiment des patients, leur sang est prélevé par les techniciens du laboratoire. Ces échantillons de sang ont été prélevés au pli du coude, par ponction veineuse et recueillis dans des tubes héparinés préalablement identifiés. Les échantillons sanguins sont ensuite acheminés au Laboratoire de chimiosensibilité du Centre Suisse de Recherches Scientifiques dans une glacière.

- Préparation globules rouges sains (GRS)

Le sang de groupe O Rhésus positif est prélevé chez des personnes ne souffrant pas de paludisme. Les prélèvements ont été faits de façon stérile sur tube violet contenant un anticoagulant, l'EDTA. Les échantillons de sang ont été lavés trois fois avec du RPMI 1640 après centrifugation à 3000 tours par minute pendant 10 minutes pour éliminer le sérum et les globules blancs. Les globules rouges sains ont été conservés à + 4°C.

- Préparation globules rouges parasités (GRP)

Les isolats de *Plasmodium falciparum* ont été prélevés dans des conditions stériles sur tube hepariné chez des personnes souffrant de paludisme simple puis acheminés au laboratoire. Le sang parasité est lavé trois fois avec du RPMI après centrifugation à 3000 tours par minute pendant 10 minutes pour éliminer le sérum et les globules blancs. Parallèlement des gouttes épaisses et frottis sanguins ont été réalisés afin d'évaluer la parasitémie des échantillons. En cas de parasitémie supérieure à 0,3 %, une dilution avec des hématies saines du groupe O+ est effectuées pour avoir des parasitémies < 0,3 %.

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir du culot globulaire parasité et du RPMI-1640 pour obtenir un hématocrite de 5 %. Pour deux plaques de 96 puits, un volume d'inoculum de 24 mL a été préparé. Les volumes des différents constituants de l'inoculum étaient de 1,2 mL de GRP et de 22,8 mL de RPMI enrichie à 0,5 % d'Albumax.

-Tests de chimiosensibilité: Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro*

Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume d'hématies parasitées (parasitémie < 0,3 % et hématocrite 5 %). Les tests *in vitro* sur *Plasmodium* nécessitent l'accessibilité permanente à une souche entretenue quotidiennement. La technique de culture continue de *P. falciparum in vitro* utilisée dans nos essais est dérivée de celle mise au point par **Trager et Jensen (1976)**. Le milieu de culture est le RPMI 1640 (SIGMA®) enrichi à 5 % d'Albumax et de L-glutamine (acide aminé essentiel). Les globules rouges sains utilisés sont du groupe O, pour une bonne compatibilité sérique et de Rhésus positif.

L'inhibition de la schizogonie érythrocytaire (à *P. falciparum*) est mesurée suivant la méthode du SYBR Green (**Smilkstein et al., 2004 ; Basco, 2007 ; Johnson et al., 2007; Akala et al., 2011; Le Nagard et al., 2011**). Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume fixe d'hématies parasitées (parasitémie de 0,1 % et hématocrite de 5 %). Les extraits à tester à différentes concentrations sont additionnées en *duplicata* dans les puits.

-Principe de la méthode du SYBR Green

Cette méthode basée sur la fluorescence de l'ADN (**Smilkstein et al., 2004**) est utile pour le screening des drogues et est intéressante à cause de l'absence d'acides nucléiques dans les hématies. Le SYBR Green I est largement utilisé dans les études *in vitro* (**Izumiyama et al., 2009**) et *in vivo* (**Somsak et al., 2012**) et moins coûteux que toute autre test fluorimétrique et même colorimétrique.

Le SYBR Green est un intercalant de l'ADN. Après 72 heures d'incubation des parasites en présence de la drogue, les globules rouges sont lysés. Puis le SYBR Green est ajouté à la culture. Celui-ci s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à l'ADN du milieu qui est lui-même proportionnel au nombre de parasites. La fluorescence est alors évaluée à l'aide d'un spectrofluorimètre permettant ainsi de suivre la croissance parasitaire.

Mode opératoire

Préparation de la gamme de concentration des extraits bruts

A partir d'une solution mère de concentration 100 µg/mL, une gamme de concentration par dilution au 1/5^{ème} est préparée. Dans le premier puits, 125 µL de solution de concentration 100 µg/mL pour l'extrait ou 800 nM pour la chloroquine (molécule de référence) ont été ajoutés.

Dans les autres puits, 100 µL de RPMI sont ajoutées, ensuite 25 µL de solution du premier puits sont prélevés et ajoutés au puits suivant. Après homogénéisation de ce puits, 25 µL sont prélevés et ajoutés au puits suivant et ainsi de suite. Après homogénéisation du dernier puits, 25 µL sont prélevés et jetés.

On obtient une gamme de concentration après ajout de 100 µL d'inoculum pour les extraits de C₁=50; C₂=10; C₃=2; C₄=0,4 µg/mL et pour la chloroquine C₁=800; C₂=160; C₃=32; C₄=6,4 nM (Figure 15)

Préparation de la gamme de concentration des fractions après partition liquide-liquide

A partir d'une solution mère de concentration 100 µg/mL, on prépare une gamme de concentration par dilution au 1/2. On obtient une gamme de concentration allant de 100 µg/mL à 0,19 µg/mL (Figure 16). La concentration finale du solvant de dissolution (DMSO) pour les solvants non aqueux ne doit pas être supérieure à 1 %, ce qui évite la toxicité cellulaire du DMSO pour les parasites.

Mise en culture

Plusieurs témoins sont également préparés (le témoin de croissance et le témoin négatif):

Puits test: 100 µL de solution à tester + 100 µL de suspension globulaire (RPMI + Albumax 5 %, L-Glutamine 1 %, GRP hématocrite 5 %),

Témoin de croissance RPMI (sans produit): 100 µL RPMI + 100 µL suspension globulaire (RPMI + Albumax 0,5 %, L-Glutamine 1%, GRP hématocrite 1,5%),

Témoin négatif (hématies saines) ou bruit de fond: 100 µL de RPMI + 100 µL suspension globulaire (RPMI + Albumax 0,5 %, L-Glutamine 1%, GRS hématocrite 5 %).

L'incubation est faite pendant 72 h à 37°C en atmosphère humide sous cloche à bougie.

Les extraits à tester (à différentes concentrations) sont additionnés en *duplicata* dans les puits. Les différentes concentrations des extraits sont obtenues par double dilution de la solution mère. Notons qu'il est possible de réaliser des solutions-mères directement dans le RPMI avec les molécules hydrosolubles.

Evaluation de la parasitémie

Après 72 heures d'incubation, la parasitémie est évaluée par la méthode du SYBR Green.

Dans un premier temps une hémolyse de la culture est effectuée avec un tampon de lyse préparé en dissolvant 1,21 g de Tris-HCl dans 350 mL d'eau distillée. Puis 5 mL d'EDTA (0,5M), 40 mg de saponine et 400 µL de Triton X-100 y sont ajoutés. Le volume est ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée. La solution obtenue est filtrée avec un filtre millipore 0,22 µm (Stericup Durapore®) et est stockée à température ambiante.

Ensuite un mix contenant 5 µL de SYBR Green et 25 mL de tampon lyse est préparé. La lyse est effectuée en transférant 100 µL de la suspension parasitaire dans une plaque vierge. A ces 100 µL de la suspension parasitaire, 100 µL de mix est ajouté.

La plaque est ensuite incubée pendant une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. Puis la lecture est faite au spectrofluorimètre Spectra Max GEMINI XPS (Molecular Devices) (Figure 17) à 535 nm après une excitation à 485 nm.

Détermination de la CI₅₀ : Interprétation du test

Les CI₅₀ (concentration d'extrait qui inhibe de 50 % la croissance parasitaire) et les coefficients de corrélation correspondants sont déterminés graphiquement, en utilisant le logiciel IVART (*In Vitro* Analysis and Reporting Tool) du WWARN (Basco *et al.*, 2007 ; Le Nagard *et al.*, 2011). Il s'agit d'une régression non linéaire de type sigmoïde; le modèle de concentration-inhibition appliqué aux données est fondé sur des approches établies par Le Nagard *et al.*, 2011. L'effet du parasite est différent en fonction de la drogue et de l'isolat, ce qui conduit à des réponses très hétérogènes. Afin d'estimer la concentration qui inhibe un certain nombre de parasite, la réponse pour chaque concentration (E_i) est convertie en pourcentage pour obtenir l'effet relatif. Pour chaque donnée, on admet la moyenne des réponses initiales lorsque la concentration de la drogue est nulle (C₀) est égale à 100% la moyenne des dernières réponses lorsque la concentration de drogue est la plus élevée (C_{max}) égale à 0% (Figure 18).

Le modèle utilisé pour E_{max} est défini comme suit : $ER_i = 100 - [(E_{max} \times C_i^Y) / (C_i^Y + IC_{50}^Y)]$

Avec E_{max} fixé à 100 comme l'effet maximum, où C_i correspond à la concentration de drogue et Y, le facteur de sigmoïdité.

-Classification de l'activité antiplasmodiale

Suite aux données de la littérature (**Bero *et al.*, 2009** ; **Bero et Quetin-Leclercq, 2011** ; **Jansen *et al.*, 2012**), l'effet antiplasmodial a été classé selon les valeurs des CI_{50} .

En ce qui concerne les extraits végétaux :

- ✚ $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$, l'extrait est rejeté car considéré comme inactif ;
- ✚ $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, l'effet est modéré ;
- ✚ $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$: l'effet est prometteur ;
- ✚ $CI_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$: l'effet est puissant.

En ce qui concerne les substances pures :

- ✚ $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$, le composé est considéré comme inactif ;
- ✚ $11 < CI_{50} < 50 \mu\text{M}$, le composé est peu actif ;
- ✚ $2 < CI_{50} < 11 \mu\text{M}$, le composé est actif ;
- ✚ $CI_{50} < 1 \mu\text{M}$, le composé est très actif et peut être considéré comme un "*lead compound*".

Plaque1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1;C1	E1;C2	E1;C3	E1;C4	E2;C1	E2;C2	E2;C3	E2;C4	E3;C1	E3;C2	E3;C3	E3;C4
B	E1;C1	E1;C2	E1;C3	E1;C4	E2;C1	E2;C2	E2;C3	E2;C4	E3;C1	E3;C2	E3;C3	E3;C4
C	E4;C1	E4;C2	E4;C3	E4;C4	E5;C1	E5;C2	E5;C3	E5;C4	E6;C1	E6;C2	E6;C3	E6;C4
D	E4;C1	E4;C2	E4;C3	E4;C4	E5;C1	E5;C2	E5;C3	E5;C4	E6;C1	E6;C2	E6;C3	E6;C4
E	E7;C1	E7;C2	E7;C3	E7;C4	E8;C1	E8;C2	E8;C3	E8;C4	E9;C1	E9;C2	E9;C3	E9;C4
F	E7;C1	E7;C2	E7;C3	E7;C4	E8;C1	E8;C2	E8;C3	E8;C4	E9;C1	E9;C2	E9;C3	E9;C4
G	E10;C1	E10;C2	E10;C3	E10;C4	E11;C1	E11;C2	E11;C3	E11;C4	E12;C1	E12;C2	E12;C3	E12;C4
H	E10;C1	E10;C2	E10;C3	E10;C4	E11;C1	E11;C2	E11;C3	E11;C4	E12;C1	E12;C2	E12;C3	E12;C4

Plaque2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E13;C1	E13;C2	E13;C3	E13;C4	E14;C1	E14;C2	E14;C3	E14;C4	E14;C1	E15;C2	E15;C3	E15;C4
B	E13;C1	E13;C2	E13;C3	E13;C4	E14;C1	E14;C2	E14;C3	E14;C4	E14;C1	E15;C2	E15;C3	E15;C4
C	E16;C1	E16;C2	E16;C3	E16;C4	E17;C1	E17;C2	E17;C3	E17;C4	E18;C1	E18;C2	E18;C3	E18;C4
D	E16;C1	E16;C2	E16;C3	E16;C4	E17;C1	E17;C2	E17;C3	E17;C4	E18;C1	E18;C2	E18;C3	E18;C4
E	E19;C1	E19;C2	E19;C3	E19;C4	E20;C1	E20;C2	E20;C3	E20;C4	E21;C1	E21;C2	E21;C3	E21;C4
F	E19;C1	E19;C2	E19;C3	E19;C4	E20;C1	E20;C2	E20;C3	E20;C4	E21;C1	E21;C2	E21;C3	E21;C4
G												
H	T	T	T	T	T	T	T	T				

Figure 15 : Plan de plaque pour les 20 extraits bruts et la chloroquine

E1=DM_{Déccotion}
 E2=DM_{Hexanique}
 E3=DM_{Méthanolique}
 E4=DM_{Aqueux}
 E5=DD_{Déccotion}
 E6=DD_{Hexanique}
 E7=DD_{Méthanolique}
 E8=DD_{Aqueux}
 E9=NL_{Déccotion}
 E10=NL_{Hexanique}
 E11=NL_{Méthanolique}

E12=NL_{Aqueux}
 E13=CF_{Déccotion}
 E14=CF_{Hexanique}
 E15=CF_{Méthanolique}
 E16=CF_{Aqueux}
 E17=TO_{Déccotion}
 E18=TO_{Hexanique}
 E19=TO_{Méthanolique}
 E20=TO_{Aqueux}
 E21=Chloroquine
 T= puits témoin (sans extrait)

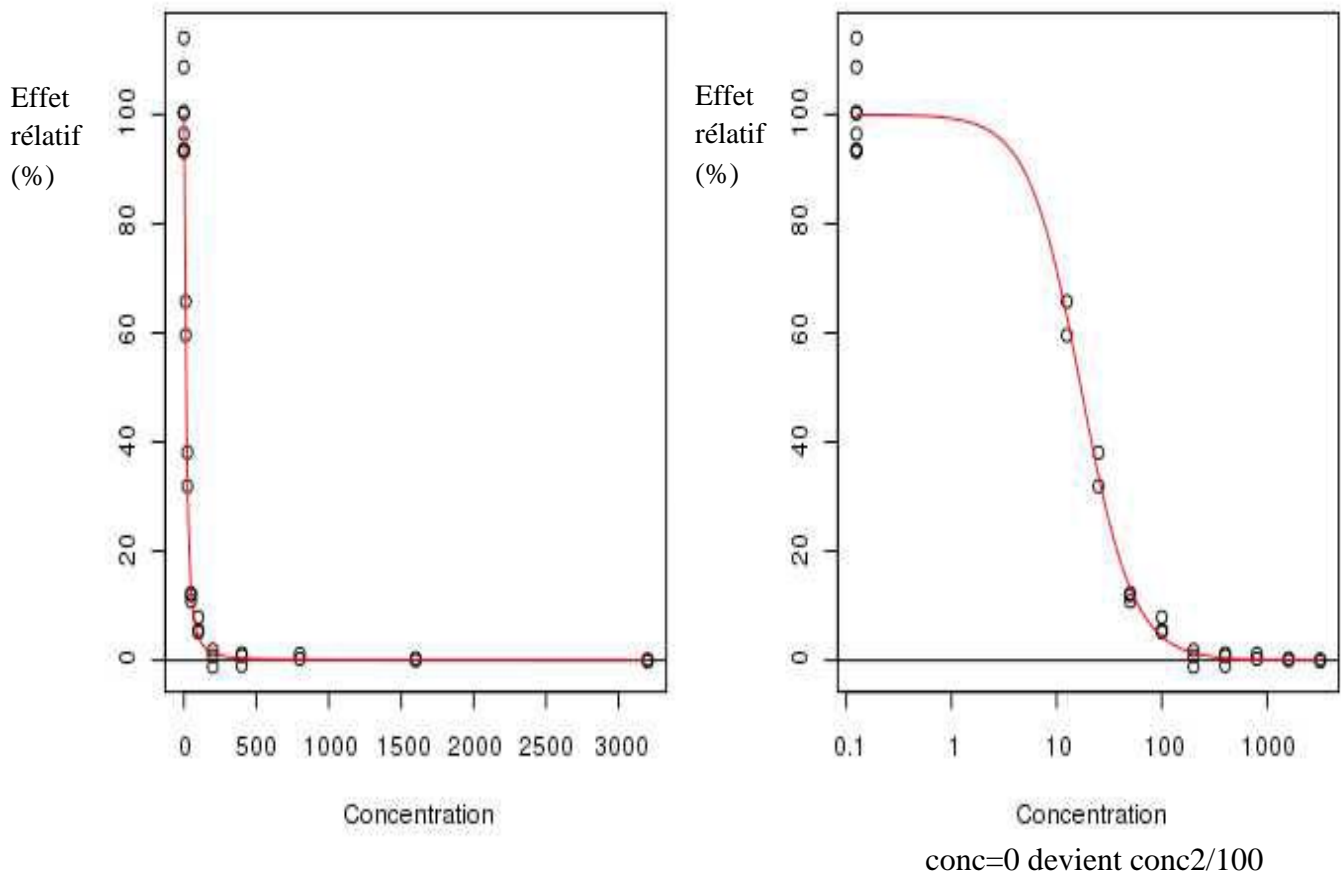
Plaque1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T	F1 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
B	T	F1 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
C	T	F2 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
D	T	F2 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
E	T	F3 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
F	T	F3 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
G	T	F4 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	
H	T	F4 ;100	50	25	12 ,5	6,25	3,125	1 ,56	0,78	0,39	0,19	T	

Figure 16: Plan de plaque des extraits après partition liquide-liquide

F1=Extrait etheré
F2=Extrait butanolique
F3=Extrait acetatique
F4=Extrait aqueux
T=Témoin



Figure 17 : Spectrofluorimètre (Spectra max GEMINI XPS) utilisé pour la mesure de l'activité antipaludique (Photographie TUO, 2014)



Les données sont présentées à la fois linéaire (à gauche) et log (à droite)

Figure 18: Régression non-linéaire, avec 100% et 0%, correspondant respectivement à l'effet maximal (E_{C_0}) et effet minimal (E_{min})

II-2-5-2-Etude de la combinaison d'extraits antipaludiques

Les études de combinaisons utilisent la technique du test de chimiosensibilité (**Wagner et al., 2009; Huang, et al., 2011**). Dans ce test, deux extraits à évaluer en combinaison sont déposés en dilutions sériées et croisées sur une plaque de 96 puits selon le plan de plaque de la Figure 19. Les extraits F₃ de *Dialium dinklagei* et F₂ de *Cnestis ferruginea* ayant été les plus actifs ont été testés en combinaison dans l'optique de rechercher un effet synergique. L'effet de la combinaison s'évalue sur des courbes dites «isobogrammes». Pour ce test, différentes concentrations de chaque extrait (correspondant à des fractions des CI₅₀ respectives) ont été ajoutées à une culture de *Plasmodium falciparum*.

Ainsi, pour une fraction de la CI₅₀ d'une drogue A, on cherche la concentration de la seconde (B) qui permet d'atteindre la CI₅₀ de la combinaison. La valeur CI₅₀ de B dans cette combinaison / CI₅₀ de B seule est l'ordonnée du point dans l'isobogramme. Puis pour le correspondant de la drogue B (100-la fraction de A) la concentration de A qui permet d'obtenir la CI₅₀ est recherchée. La valeur CI₅₀ de A dans cette combinaison / CI₅₀ de A seule est l'abscisse du point dans l'isobogramme.

Dans le cas où les produits se substituent mutuellement, la courbe tracée est une diagonale, qui montre un effet additif. Quand les deux produits accentuent mutuellement leurs activités respectives, la courbe qui en résulte se rapproche de l'origine des deux axes et prend un aspect concave: il s'agit dans ce cas d'un effet de synergie. A l'inverse lorsque la courbe est convexe et se situe au-dessus de la diagonale, l'inhibition mutuelle des activités indique que l'on est en présence d'antagonisme (Figure 20).

		% de la CI ₅₀ la drogue A, V=50 µL											
		0 %		25 %		50 %		75 %		100 %			
		H ₂ O											
Drogue B %CI ₅₀ , V=50 µL	25%												
	50%												
	75%												
Drogue A %CI ₅₀ , V=50 µL	25%												
	50%												
	75%												
Témoin RPMI													
		0 %		25 %		50 %		75 %		100 %			
		% de la CI ₅₀ la drogue B, V=50 µL										Témoin Négatif	

Figure 19: Plan de plaque pour l'étude des combinaisons

Dans les 72 puits sont déposés 100 µL de sang parasité (5 % d'hématocrite et 0,1 % de parasitémie dans du RPMI).

Le témoin RPMI correspond à 100 µL de RPMI.

Le témoin négatif ou bruit de fond n'est constitué que d'hématies non parasitées (200 µL de RPMI et à 5 % d'hématocrite).

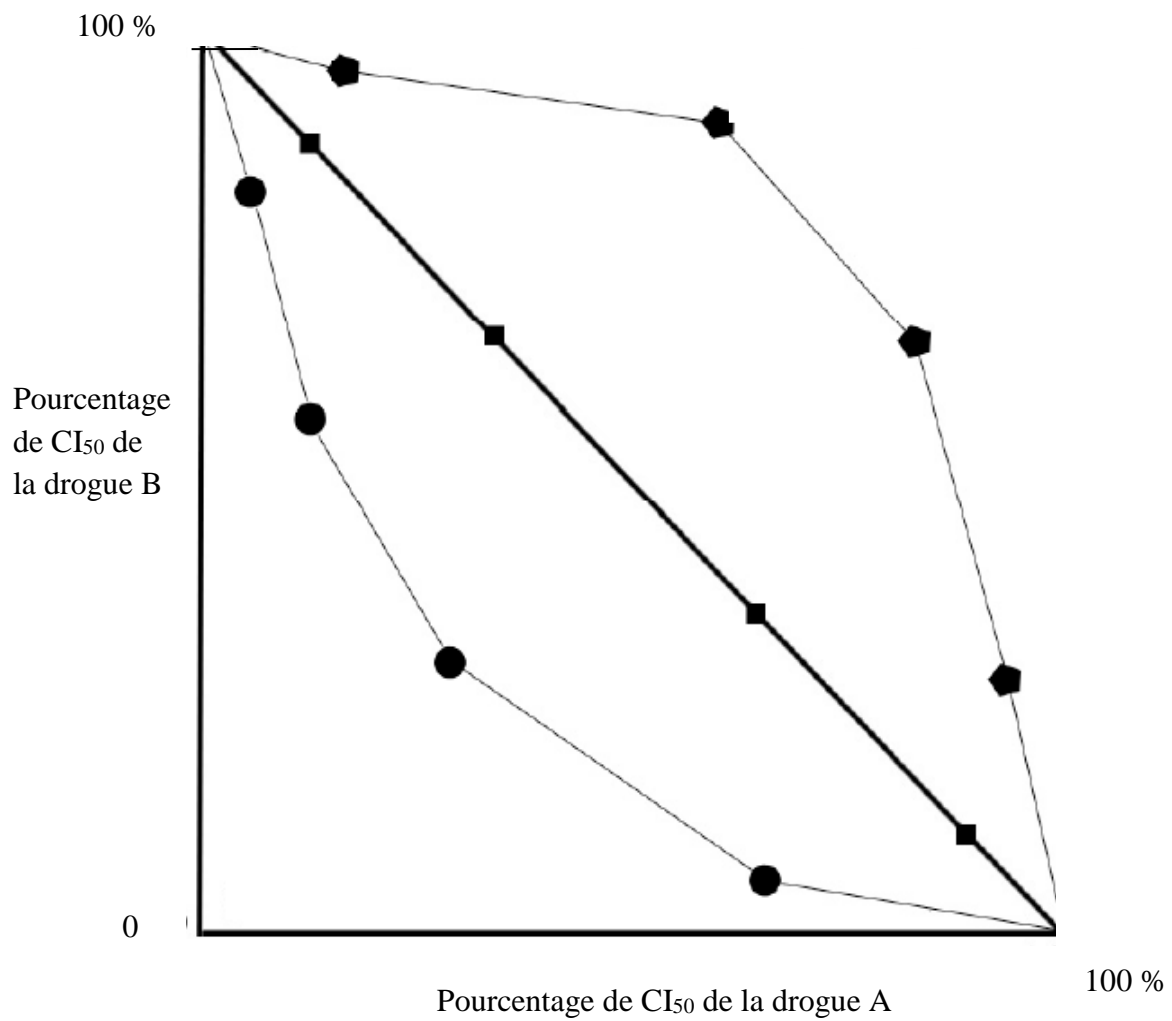


Figure 20: Représentation graphique des isobologrammes: Les différents effets combinatoires pouvant être observés

- ◆ Antagonisme
- ◆ Additivité
- Synergie

II-2-5-3-Tests d'hémolyse *in vitro*

La littérature montre que ce test n'est pas très souvent présenté dans les criblages antiplasmodiaux alors que le protocole est simple et rapide. S'il est inclus dans le protocole des tests antiplasmodiaux *in vitro*, il pourrait éviter la réalisation de fractionnements bioguidés inutiles par la détection de résultats «faux positifs». Ces tests d'hémolyse ont été réalisés afin de vérifier l'absence de faux positifs avec des érythrocytes humains. En effet, si l'échantillon engendre une hémolyse, le parasite ne peut se développer correctement et donc l'effet antiplasmodial mesuré ne reflèterait pas l'action de l'échantillon sur le *plasmodium*.

Les extraits seront donc testés à deux concentrations : 100 µg/mL et 200 µg/ml. Un pouvoir hémolytique se définit si le pourcentage d'hémolyse est supérieur à 5 % (**Jansen *et al.*, 2012 ; Laurencin *et al.*, 2012**).

Technique

Cinq millilitres de sang humain sont collectés dans des tubes à EDTA (50 mM) et conservés dans un bain de glace. Le sang est ensuite lavé avec du tampon PBS à pH 7,4 puis centrifugé à 2200 tr/min à 4°C pendant 15 min. Après élimination du surnageant, l'opération est répétée deux fois de suite sur le culot obtenu. Puis la densité optique a été ajustée à 1,5 à 550 nm.

Les globules rouges sont ensuite dilués à 10 % (v/v) dans du PBS à température ambiante. Afin de vérifier que ces derniers sont encore entiers, 10 µL de PBS sont placés dans un microtube Eppendorff et 10 µL de Triton X-100 (20 % dans l'eau, v/v) dans un deuxième microtube. Ensuite, 190 µL de globules rouges sont ajoutés aux deux tubes eppendorff.

Le tube «Triton» ne doit pas avoir de culot après 3 minutes de centrifugation à 2200 tr/min, tandis que le tube « PBS » doit présenter un culot rouge et un surnageant transparent.

Une solution mère des échantillons à tester est préparée dans le solvant adéquat aux concentrations 100 µg/mL et 50 µg/mL en tenant compte que le volume de solvant ne doit pas être supérieur à 1 % dans la solution finale.

Pour réaliser le test d'hémolyse, 10 µL de solution mère sont placés dans un microtube Eppendorff et mélangés avec 190 µL de globules rouges à 10 %. Des solutions témoins sont également préparées. Le témoin négatif comprenant 10 µL de PBS + 190 µL de globules rouges à 10 % et le témoin positif comprenant 10 µL de Triton X-100 à 20 % + 190 µL de globules rouges à 10 %. Chaque échantillon est testé en triplicata (y compris les solutions témoins) et incubé pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente.

Finalement, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 2200 trs/min et 150 µL de surnageant sont placés dans une plaque 96 puits. L'absorbance est lue à 550 nm avec un lecteur de plaque (Multiskan FC, Thermo Scientific).

La formule suivante est utilisée pour calculer le pourcentage d'hémolyse:

$$\% \text{ hémolyse} = [(A \text{ échantillon testé} - A \text{ témoin négatif}) / (A \text{ témoin positif} - A \text{ témoin négatif})] \times 100$$

où A est l'absorbance à 550 nm.

III-RESULTATS

III-1-Enquête ethnobotanique, recherches bibliographiques et sélection des plantes étudiées

Dans le cadre d'une enquête ethnobotanique couplée d'une recherche bibliographique, un total de 58 espèces de plantes appartenant à 53 genres et 30 familles ont été recensées. L'analyse bibliographique a montré que 74,14 % des plantes (43 sur 58 plantes) répertoriées ont une efficacité *in vitro* sur souches de *Plasmodium*; 48,29 % plantes (28 sur 58 plantes) ont présenté une très bonne activité *in vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum* de laboratoire avec une CI₅₀ d'au moins un de leurs extraits bruts testés inférieure à 5 µg/mL (Tableau I). Plusieurs familles de plantes présentant une efficacité antipaludique sont retrouvées dans d'autres régions endémiques d'Asie et d'Amérique du Sud. Cependant, 15,51 % des plantes (09 sur 58 plantes) n'ont fait l'objet d'aucune étude antiplasmodiale *in vitro*, et pour 10,34 % (06 sur 58 plantes) des plantes sélectionnées, les études n'ont pas montré d'efficacité antipaludique *in vitro* (Figure 21).

Notons que très peu d'activités *in vivo* sur des modèles murins de paludisme ont été publiées, comparées aux tests *in vitro*. La famille la plus représentée est celle des Asteraceae (7 espèces), viennent ensuite les Caesalpinaceae, les Meliaceae, les Rubiaceae, les Combretaceae, les Apocynaceae (4 espèces chacune) puis la famille des Euphorbiaceae (3 espèces). Le Tableau I énumère les espèces enregistrées et leur mode d'administration dans la gestion du paludisme et les symptômes semblables. Huit plantes ont montré des activités antiplasmodiales très puissantes avec des CI₅₀ inférieures à 1 µg/mL; il s'agit de *Combretum micranthum* (Combretaceae), *Enantia polycarpa* (Annonaceae), *Guiera senegalensis* (Combretaceae), *Nauclea latifolia* (Rubiaceae), *Sida acuta* (Malvaceae), *Terminalia glucaucescens* (Combretaceae), *Vernonia colorata* (Astraceae) et *Ximenia americana* (Oleaceae).

Par ailleurs, les investigations ethnobotaniques et la revue littéraire ont permis de sélectionner *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* et *Trema orientalis* utilisées par la pharmacopée traditionnelle ivoirienne et très peu étudiées pour leur activité antipaludique (Tableau II).

Tableau 1: Plantes utilisées en Côte d'Ivoire contre le paludisme

	Espèce	Nom vernaculaire	Partie utilisée	Mode de préparation et d'administration	Solvant d'extraction; activité antiplasmodiale CI₅₀ (µg/ml) et souche plasmodiale testée	Références bibliographiques
1	<i>Adenia lobata</i> (<i>Passifloraceae</i>)	Kouakouabié (Akyé)	Plante entière	Décoction	Chlorure de méthylène:6.1(FCB1) Méthanol:>20(FCB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004
2	<i>Ageratum conyzoides</i> (<i>Asteraceae</i>)	Koungbèni (Malinké); Pepien (Akyé)	Feuille	Décoction (Ablution)	CH ₂ Cl ₂ /Méthanol(1:1):27(D10) Eau:>100(D10)	Cailean <i>et al.</i> , 2004
3	<i>Alchornea cordifolia</i> * (<i>Euphorbiaceae</i>)	Djeka (Baoulé)	Tige, feuille	Macération	Ethanol:2.3(FcM29) Ethanol:3.06(FcB1) Ethanol:3.15 (Nigerian) Eau:3.5(FcB1) Eau:4.01(FcB1) Eau: 2.47(Nigerian)	Mustofa <i>et al.</i> , 2000 Zirihi <i>et al.</i> , 2010
4	<i>Alstonia boonei</i> (<i>Apocynaceae</i>)	Emien (Baoulé); Kôkpè (Akyé); Sikolamissimba (Malinké)	Feuille, tige, racine	Décoction	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
5	<i>Anogeissus leiocarpus</i> * (<i>Combretaceae</i>)	Kalama (Malinké); N'galama (Baoulé)	Feuille	Décoction	Méthanol:2.6(FcB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004, Vonthron-Senecheau <i>et al.</i> , 2003
6	<i>Annona senegalesis</i> (<i>Annonaceae</i>)	Sounsoun-gbèni (Malinké)	Feuille	Décoction	CH ₂ Cl ₂ :35(D10)	Cailean <i>et al.</i> , 2004
7	<i>Azadirachta indica</i> * (<i>Meliaceae</i>)	Djekouadjobrou (Malinké)	Tige, feuille	Décoction	Eau: 2.35(F32) Ethanol:2.40(W2) Ethanol:2.50(D6)	Benoit-Vical <i>et al.</i> ,1996, MacKinnon <i>et al.</i> , 1997 Kirira <i>et al.</i> , 2006
8	<i>Bidens pilosa</i> (<i>Asteraceae</i>)	Alongoa (Baoulé)	Feuille	Décoction	CH ₂ Cl ₂ :8.5(D10) CH ₂ Cl ₂ /Méthanol(1:1):11(D10) Méthanol:5(D10) Eau:70(D10)	Cailean <i>et al.</i> , 2004
9	<i>Bambusa vulgaris</i> * (<i>Poaceae</i>)	Bôbrou (Malinké) Assakatou (Akyé)	Feuille, tige, racine	Décoction	Ethanol 80%:4.7(GHA : <i>P. falciparum</i> Ghana strain)	Valdés <i>et al.</i> , 2010
10	<i>Boerhavia diffusa</i> (<i>Nyctaginaceae</i>)	Kôgbè (Malinké); Kpokpolekpo (Baoulé)	Feuille	Décoction	ND	ND
11	<i>Carapa procera</i> (<i>Meliaceae</i>)	Keby (Malinké)	Feuille	Décoction	Méthanol:>20(FCB1) Chlorure de méthylène:18.4(FCB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004
12	<i>Carica papaya</i> (<i>Caricaceae</i>)	Vinyiri (Gouro) Offlé (Baoulé)	Feuille, racine, fruit	Décoction, infusion	Ether de petrole:15.19(FCK2) Méthanol: >100(FCK2) Eau:>1000(FCK2)	Bhat et Surolia, 2001
13	<i>Cassia alata</i> (<i>Caesalpiniaceae</i>)	Kababrou (Malinké)	Feuille, tige, racine	Décoction, pétrissage	Ethanol:>50 (FcB1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2005
14	<i>Cassia occidentalis</i> (<i>Caesalpiniaceae</i>)	Alouklousrèsé (Baoulé)	Feuille, tige, racine	Décoction, pétrissage, instillation	Pentane:26(FcM29) Ethanol:60 (Nigerian CQ-S)	Menan <i>et al.</i> , 2006
15	<i>Cassia siamea</i> (<i>Caesalpiniaceae</i>)	Cassiyiri (Gouro)	Feuille	Décoction	Eau:21 (FcM29)	(Mbatchi <i>et al.</i> ,2006)
16	<i>Chromolaena odorata</i> (<i>Asteraceae</i>)	Flota (Malinké)	Feuille	Décoction (Boisson)	CH ₂ Cl ₂ /eau:9.39 (K1)	Pisutthanant <i>et al.</i> , 2005
17	<i>Citrus aurantifolia</i> (<i>Rutaceae</i>)	Glolowouhoyiri (Gouro)	Feuille, racine, fruits	Décoction, infusion	Méthanol:>100(K1)	Addae-Kyereme <i>et al.</i> , 2001

18	<i>Cnestis ferruginea</i> (<i>Connaraceae</i>)	Kèrèkèssè (Baoulé)	Feuille	Décoction	Méthanol :>100 (K1)	Addae-Kyereme <i>et al.</i> , 2001
19	<i>Combretum micranthum</i> ** (<i>Combretaceae</i>)	N'golobe (Malinké)	Tige, feuille	Décoction	Eau: 0.8 (W2) Eau :1.18 (FcB1) Eau:1.7 (F32)	Benoit-Vical <i>et al.</i> ,1996 Ancolio <i>et al.</i> , 2002
20	<i>Cordia vignei</i> (<i>Borraginaceae</i>)	. ?	Feuille	Décoction (Boisson)	ND	ND
21	<i>Cymbopogon citratus</i> (<i>Poaceae</i>)	Citronnelle (nom usuel)	Feuille	Infusion	Ethanol 80% : >100(GHA : <i>P. falciparum</i> Ghana strain)	Valdés <i>et al.</i> , 2010
22	<i>Dialium dinklagei</i> (<i>Caesalpiniaceae</i>)	N'sehia (Ebrié)	Feuille	Décoction	ND	ND
23	<i>Diospyros monbuttensis</i> (<i>Ebenaceae</i>)	Gnamien-baka (Baoulé) Mianômouroukalan (Malinké)	Feuille	Décoction	Ethanol : 32(Isolat)	Olasehinde <i>et al.</i> , 2012
24	<i>Enantia polycarpa</i> ** (<i>Annonaceae</i>)	Tsain (Akyé)	Tige, écorces	Décoction	Ethanol : 0.126(K1)	Kamanzi <i>et al.</i> , 2004
25	<i>Erigeron floribundus</i> * (<i>Asteraceae</i>)	Gotouba (wobé)	Feuille	Décoction	Pentane : 6(Nigerian CQ-S) Pentane : 4(FcM29 CQ-R)	Menan <i>et al.</i> , 2006
26	<i>Ficus exasperata</i> (<i>Moraceae</i>)	Trogbègna (Malinké)	Ecorce, tige	Macération, Pétrissage	ND	ND
27	<i>Funtumia elastica</i> * (<i>Apocynaceae</i>)	M'pé (Akyé)	Tige, écorce	Macération	Ethanol: 3.6(FcB1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2010;
28	<i>Guiera senegalensis</i> ** (<i>Combretaceae</i>)	Koungbè (Malinké)	Tige, feuille	Décoction, infusion	Eau: 0.79 (FcB1)	Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1996
29	<i>Harungana Madagascariensis</i> * (<i>Hypericaceae</i>)	Modja-waka (Baoulé); Songalani (Malinké)	Feuille, tige, racine	Décoction, macération, pétrissage	Ethanol 90% :>5 (K1) Eau :3.6 (K1), Eau:43.70 (W2),	Kamanzi <i>et al.</i> , 2004 Lenta <i>et al.</i> , 2007 Muthaura <i>et al.</i> ,2007a
30	<i>Hunteria eburnea</i> * (<i>Apocynaceae</i>)	Démoïn (Abey)	Tige, écorce	Décoction	Ethanol: 2.2(FcB1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2010
31	<i>Jatropha curcas</i> * (<i>Euphorbiaceae</i>)	M'popo (Agni) Bagani-brou (Malinké)	feuille	Décoction	CH ₂ Cl ₂ :>50 µg/ml (W2) Méthanol:>50 µg/ml (W2) Méthanol:H ₂ O(1:1)>50µg/ml (W2) Hexane : 3.08.(K1) ; 11.13 (NF54) Ethyl acetate:2.39 (K1); 5.06 (NF54) Méthanol:11.53 (K1); 31.09 (NF54)	Kaou <i>et al.</i> , 2008 Abiodun <i>et al.</i> , 2011
32	<i>Lippia multiflora</i> * (<i>Verbeneceae</i>)	Ganela (Malinké)	Tige, feuille	Décoction, infusion	Eau : 1.1(F32) Eau: 2.3(F32) Eau: 1.6(FcB1) Eau: 2.2(FcB1)	Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1996
33	<i>Mangifera indica</i> (<i>Anarcadiaceae</i>)	Manoyiri (Gouro)	Feuille, tige, racine	Décoction, pétrissage	Ethanol: >50(K1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2005
34	<i>Mikania cordata</i> (<i>Asteraceae</i>)	Kôlôbouan (Gouro)	feuille	Décoction, instillation	ND	ND
35	<i>Mitragyna inermis</i> * (<i>Rubiaceae</i>)	Djoun (Malinké)	Tige, racine	Décoction	Chloroforme:4.3(W2) Chloroforme:4.8(3D7)	Traore-Keita <i>et al.</i> , 2000
36	<i>Momordica charantia</i> (<i>Cucurbitaceae</i>)	N'dayaman (Baoulé)	Feuille	Décoction, macération, pétrissage	Ethanol:23(Nigerian CQ-S) Ethanol:16(FcM29 CQ-R)	Menan <i>et al.</i> , 2006

37	<i>Morinda morindoides*</i> (<i>Rubiaceae</i>)	.?	Feuille	Décoction	Ethanol:9.8(FcB1) Ethanol:3.5(K1) Acetate d'ethyle:6.12(F32); 4.88(FCB1);6.12(K1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2010; Zirihi <i>et al.</i> , 2005; Kamanzi <i>et al.</i> , 2004 Kipré <i>et al.</i> , 2009
38	<i>Nauclea diderrichii</i> (<i>Rubiaceae</i>)	Attié: Badi	Tige, feuille	Décoction	Eau: 312.14 (FcM29-Cameroon) Eau:368.81 (FcB1-Columbia) Eau: >500 (Nigerian)	Mustofa <i>et al.</i> , 2000
39	<i>Nauclea latifolia**</i> (<i>Rubiaceae</i>)	Trèlè (Baoulé); Bati (Malinké)	Ecorce, feuille, racine	Décoction, macération, pétrissage, infusion	Pentane :80 (Nigerian CQ-S) Pentane :15(FcM29 CQ-R) Eau:0.6 (FcB1) Eau:0.7 (Nigerian) Ethanol: 7.3 (FcB1)	Menan <i>et al.</i> , 2006 ; Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1998 Zirihi <i>et al.</i> , 2010;
40	<i>Newbouldia laevis</i> (<i>Bignoniaceae</i>)	To'Nzué (Baoulé); Môgôgbèboulou (Malinké)	Feuille	Décoction	ND	ND
41	<i>Ocimum gratissimum*</i> (<i>Lamiaceae</i>)	Aoulomagnèrin (Baoulé)	Feuille	Décoction (Bain vapeur; Purge)	CH ₂ Cl ₂ : >50(W2) Méthanol:>50(W2) Méthanol/eau(1:1)>50(W2) Hexane:2.45 (K1); 2.72 (NF54) Ethyl acetate:1.8 (K1);3.6 (NF54) Methanol:22.52(K1);29.67(NF54) Pentane:80 (Nigerian CQ-S)	Kaou <i>et al.</i> , 2008 Abiodun <i>et al.</i> , 2011
42	<i>Olox subscorpioidea</i> (<i>Olacaceae</i>)	Wahanyiri (Gouro)	Feuille, tige	Décoction	Pentane:80 (FcM29 CQ-R) Acetate d'ethyle:32.47(F32); 28.04(FCB1); 28.14 (K1)	Menan <i>et al.</i> , 2006 Kipré <i>et al.</i> ,2009
43	<i>Passiflora foetida</i> (<i>Passifloraceae</i>)	Vohôhâyiri (Gouro) Pkôti-kpoti (Akyé)	Feuille, tige	Décoction	ND	ND
44	<i>Paulina pinnata</i> (<i>Sapindaceae</i>)	Tro'ndi (Baoulé); Croussama (Malinké)	Feuille, tige	Décoction	Méthanol:>20(FCB1) Chlorure de méthylène: 18.5(FCB1) Alcaloïdes:14.1(FCB1)	Okpekon <i>et al.</i> , 2004
45	<i>Phyllanthus amarus*</i> (<i>Euphorbiaceae</i>)	Dinlakola (Malinké)	Rameau de feuilles	Décoction (Boisson)	Eau-Méthanol:3.2 (FCR-3) Méthanol:5.9(FCR-3)	Tran <i>et al.</i> (2003)
46	<i>Pothomorphe umbrellata*</i> (<i>Piperaceae</i>)	Konganda (Malinké)	Feuille	Décoction	Ethanol:3.74(K1)	Kamanzi <i>et al.</i> , 2004
47	<i>Rauvolfia* vomitoria</i> (<i>Apocynaceae</i>)	Marangara (Malinké)	Feuille	Décoction (Boisson)	Ethanol:2.5(FcB1)	Zirihi <i>et al.</i> , 2010
48	<i>Sida acuta**</i> (<i>Malvaceae</i>)	Tchègbanna-balié (Malinké)	Feuille	Décoction	Ethanol: 3.9 (FcM29) Eau: 0.92 (FcM29) Chloroforme:0.87(FcM29)	Banzouzi <i>et al.</i> , 2004 Karou <i>et al.</i> , 2003
49	<i>Spondias mombin</i> (<i>Anacardiaceae</i>)	Troma (Baoulé)	Feuille	Décoction	ND	ND
50	<i>Tectana grandis</i> (<i>Verbenaceae</i>)	yirila-vouka-vouka (Gouro)	Feuille tige racine	Décoction	ND	ND
51	<i>Terminalia glaucescens**</i> (<i>Combretaceae</i>)	Coma (Baoulé) Wôlô (Dioula)	Tige, feuille	Décoction	Pentane: 2.5(FcM29) Water: 2.34(FcM29) Water: 2.36(Nigerian) Méthanol:2 (Nigerian) Ethanol: 0.4 (Nigerian) Chlorure de methylene:1.8(FcB1)	Mustofa <i>et al.</i> , 2000 Okpekon <i>et al.</i> , 2004
52	<i>Trema orientalis*</i> (<i>Ulmaceae</i>)	Sodi-goula (Malinké); N'sien (Baoulé)	Feuille	Décoction	Hexane:4.159(K1);18.16 (NF54) Ethyl acetate:1.99(K1);2.29(NF54) Méthanol:6.79(K1);25.65(NF54)	Abiodun <i>et al.</i> , 2011
53	<i>Trichilia emetica*</i> (<i>Meliaceae</i>)	Soulafizan (Malinké)	Ecorce de racines	Décoction	Ethanol:3.91(K1)	Kamanzi <i>et al.</i> , 2004

54	<i>Trichilia monadelpha</i> (Meliaceae)	Fin (Akyé)	Ecorce de tige	Décoction	Ethanol:3.61(K1)	Kamanzi <i>et al.</i> , 2004;
55	<i>Vernonia amygdalina</i> (Astraceae)	Agbovi (Baoulé); Sokôssafina (Malinké)	Tige, feuille	Décoction	Dichloromethane:80(Dd2) Ethyl acetate:10(Dd2) Ether de petrole:200(Dd2) Ethanol:340(Dd2)	Madureira <i>et al.</i> , 2002
56	<i>Vernonia colorata</i> ** (Astraceae)	Blo Agbovi (Baoulé); Kongo Kôssafina (Malinké)	Tige, feuille	Décoction, pétrissage	Eau: 0.4(FcB1) Eau:9.38(F32) Ethanol:10(FcM29) CH ₂ Cl ₂ /Méhanol(1:1):14.1(D10)	Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1996 ; Addae- Kyereme <i>et al.</i> , 2001 Menan <i>et al.</i> 2006 Cailean <i>et al.</i> , 2004
57	<i>Ximenia americana</i> ** (Oleaceae)	Soclo (Baoulé)	Tige, feuille	Décoction	Eau:0.6(F32)	Benoit-Vical <i>et al.</i> , 1996
58	<i>Zanthoxylum gillettii</i> * (Rutaceae)	Gbonh (Akyé)	Ecorce de tige	Infusion	Ethanol:>5(K1) Ethanol 2.8(FcB1)	Kamanzi <i>et al.</i> ,2004 ; Zirihi <i>et al.</i> , 2009 ; Zirihi <i>et al.</i> , 2010

* : Plantes antipaludiques ayant une CI₅₀ inférieure à 5 µg/mL

** : Plantes antipaludiques ayant une CI₅₀ inférieure à 1 µg/mL

ND : Non déterminé

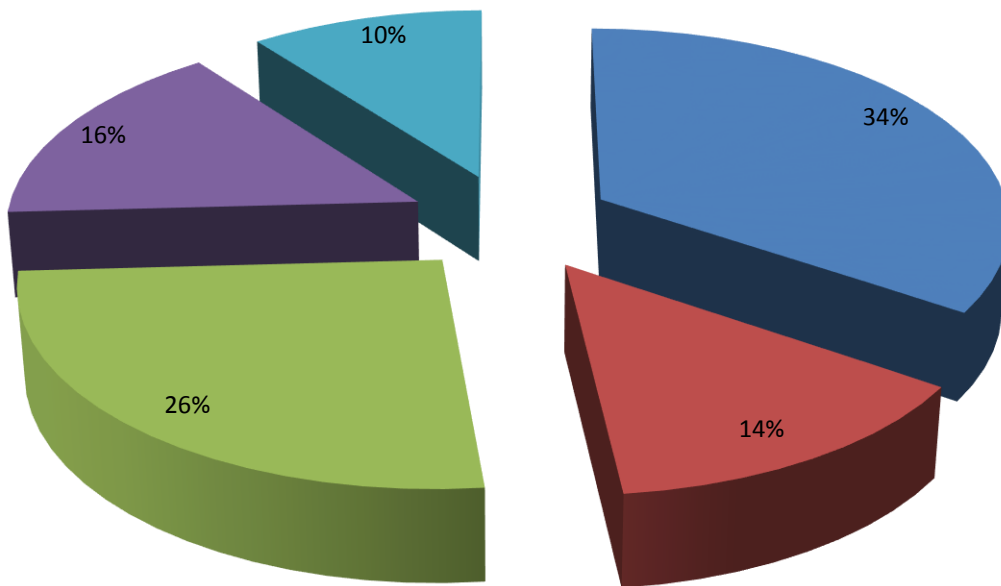


Figure 21: Répartition des plantes utilisées contre le paludisme en Côte d'Ivoire en fonction de leur Activité

- Plantes à CI₅₀ supérieures à 5 µg/mL
- Plantes à CI₅₀ comprises entre 1 et 5 µg/mL
- Plantes inactives
- Plantes à CI₅₀ inférieures à 1 µg/mL
- Plantes non étudiées

Tableau II: Plantes sélectionnées pour pour les études

Espèce	Famille	Nom local	Partie testée
<i>Diospyros monbuttensis</i>	Ebenaceae	Gnamien-baka (Baoulé) Mianômouroukalan (Malinké)	Feuille
<i>Dialium dinklagei</i>	Caesalpiniaceae	N'séhia (Ebrié)	Feuille
<i>Newbouldia laevis</i>	Bignoniaceae	Mogogbèboulou (Dioula) Tohounzué (Baoulé)	Feuille
<i>Cnestis ferruginea</i>	Connaraceae	Kèrèkèssè (Baoulé)	Feuille
<i>Trema orientalis</i>	Ulmaceae	Sodi goula (Dioula) N'sien (Baoulé)	Feuille

III-2-Resultats des études phytochimiques et activité antioxydante

III-2-1-Rendements des extractions

Après évaporation, les extraits organiques obtenus sont de couleur verte avec un aspect plus ou moins visqueux alors que les extraits aqueux donnent une poudre marron d'aspect amorphe.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, du contenu de chaque espèce en métabolites secondaires, de la nature et la polarité du solvant utilisé dans l'extraction.

Des cinq extractions brutes, la décoction a produit rendement le plus élevé (17 à 20 %) tandis que celui de l'hexane est le plus faible (1 à 1,6 %) (Figure 22).

Les rendements obtenus avec les partitions liquide-liquide sont représentés par la Figure 23.

Seuls les extraits étherés de *Cnestis ferruginea* et acetatique de *Newbouldia laevis* ont donné des rendements très faibles respectivement 2,66 % et 5,2 %. Les rendements les plus élevés sont ceux des fractions F₁ de *Newbouldia laevis*, F₄ de *Cnestis ferruginea* et F₂ de *Dialium dinklagei* respectivement 52 %, 36,9 % et 33,2 %.

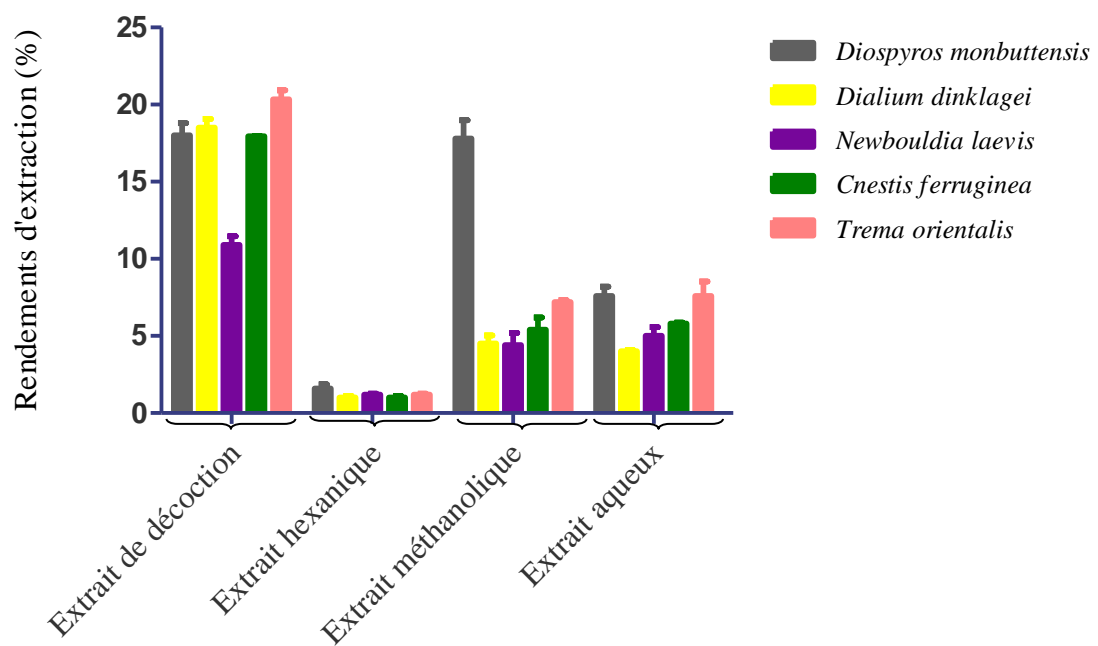


Figure 22: Rendements des différents extraits bruts des plantes étudiées

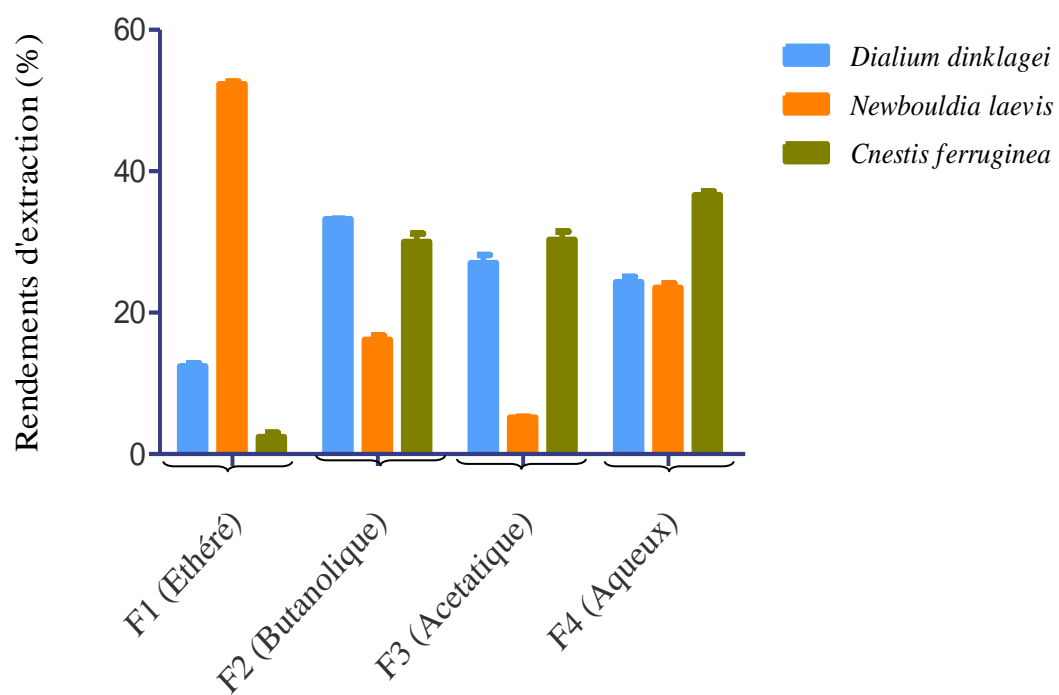


Figure 23: Rendements des différentes fractions après partition liquide-liquide

III-2-2-Résultats des tests du criblage phytochimique

Le criblage phytochimique génère une première estimation préliminaires sur les constituants chimiques des extraits.

Le résultat de ce criblage phytochimique des extraits bruts et les partitions actives est résumé dans les Tableaux III et IV. Ils révèlent la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires. Les résultats varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. De façon générale, les différents extraits sont pauvres en stéroïdes et glycosides cardiotoniques mais riches en alcaloïdes, en flavonoïdes, en tannins et en polyphénols.

Tableau III: Résultats du screening phytochimique des extraits bruts des plantes étudiées

Substances naturelles		Groupes chimiques												
Plantes	Extraits	Steroides	Sterols et polyterpènes	Polyphenols	Flavonoïdes	Anthocyanes	Lucoanthocyanes	Tannins galliques	Tannins catéchiques	Quinones	Alcaloïdes	Coumarines	Glycosides cardiotoniques	Saponosides
<i>Diospyros monbuttensis</i>	Dec	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
	Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	Met	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aq	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Dialium dinklagei</i>	Dec	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hex	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	Met	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	Aq	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Newbouldia laevis</i>	Dec	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	Hex	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	Met	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	Aq	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Cnestis ferruginea</i>	Dec	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
	Hex	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	Met	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	Aq	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Trema orientalis</i>	Dec	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
	Hex	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	Met	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	Aq	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

Présence : + ;

Absence : -

Dec : Décoction ; Hex : Hexanique ; Met : Méthanolique ; Aq : Aqueux

Tableau IV : Résultats du screening phytochimique des décoctions de *Dialium dinklagei* et *Cnestis ferruginea* et l'extrait méthanolique de *Newboudia laevis*

Substances naturelles		Groupes chimiques												
Plantes	Partitions	Steroides	Sterols et polyterpènes	Polyphenols	Flavonoïdes	Anthocyanes	Lucoanthocyanes	Tanins galliques	Tanins catéchiques	Quinones	Alcaloïdes	Coumarines	Glycosides cardiotoniques	Saponosides
<i>Dialium dinklagei</i>	F3 (Acetatique)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Newboudia laevis</i>	F3 (Acetatique)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Cnestis ferruginea</i>	F2 (Butanolique)	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

Présence : + ;

Absence : -

III-2-3-Teneurs en polyphénols des plantes testées

III-2-3-1-Teneurs en phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits de plantes sont déterminées à partir de la droite d'étalonnage de l'acide gallique ($Y = 0,01810X + 0,07179$; $R^2 = 0,9911$). Les teneurs en phénols totaux sont rapportées en mg équivalent acide gallique/g d'extrait (mg EAG/g) de plante. Les résultats montrent que la décoction de *Trema orientalis* et l'extrait méthanolique de *Dialium dinklagei* sont les plus riches en phénols tandis que *Newbouldia laevis* a montré les valeurs les plus faibles quel que soit le solvant utilisé. Ces teneurs varient de $81,92 \pm 4,67$ mg EAG/g à $240,73 \pm 47,31$ mg EAG/g (Figure 24). La différence entre les teneurs en phénols en fonction de la plante et du solvant utilisé est hautement significative ($P < 0,0001$).

III-2-3-2-Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits des plantes sont déterminées à partir de la droite d'étalonnage de la quercétine ($Y = 0,02834X + 0,01368$; $R^2 = 0,9986$). Ces résultats montrent que les décoctions de *Diospyros monbuttensis* et *Trema orientalis* sont les plus riches en flavonoïdes tandis que *Dialium dinklagei* a les teneurs les plus faibles quel que soit le solvant utilisé. Statistiquement, la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de la plante et du solvant utilisé est très significative ($P < 0,0001$). Ces teneurs varient de 6,78 mg EQ/g à 62,18 mg EQ/g (Figure 25).

III-2-3-3-Dosage des tannins

Les tannins des différents extraits de plantes sont déterminés à partir de la droite d'étalonnage de l'acide tannique ($Y = 0,2167X - 0,004417$; $R^2 = 0,9761$). Ils montrent que *Dialium dinklagei* est plus riche en tannins quel que soit le type de solvant utilisé. Les teneurs les plus faibles sont obtenues avec les extraits de décoction de *Diospyros monbuttensis* et *Trema orientalis*. Ces teneurs varient de $45,43 \pm 0,70$ mg EAT/g à $146,4 \pm 5,46$ mg EAT/g (Figure 26). Statistiquement la différence entre les teneurs en tannins en fonction de la plante et du solvant utilisé est hautement significative ($P < 0,0001$).

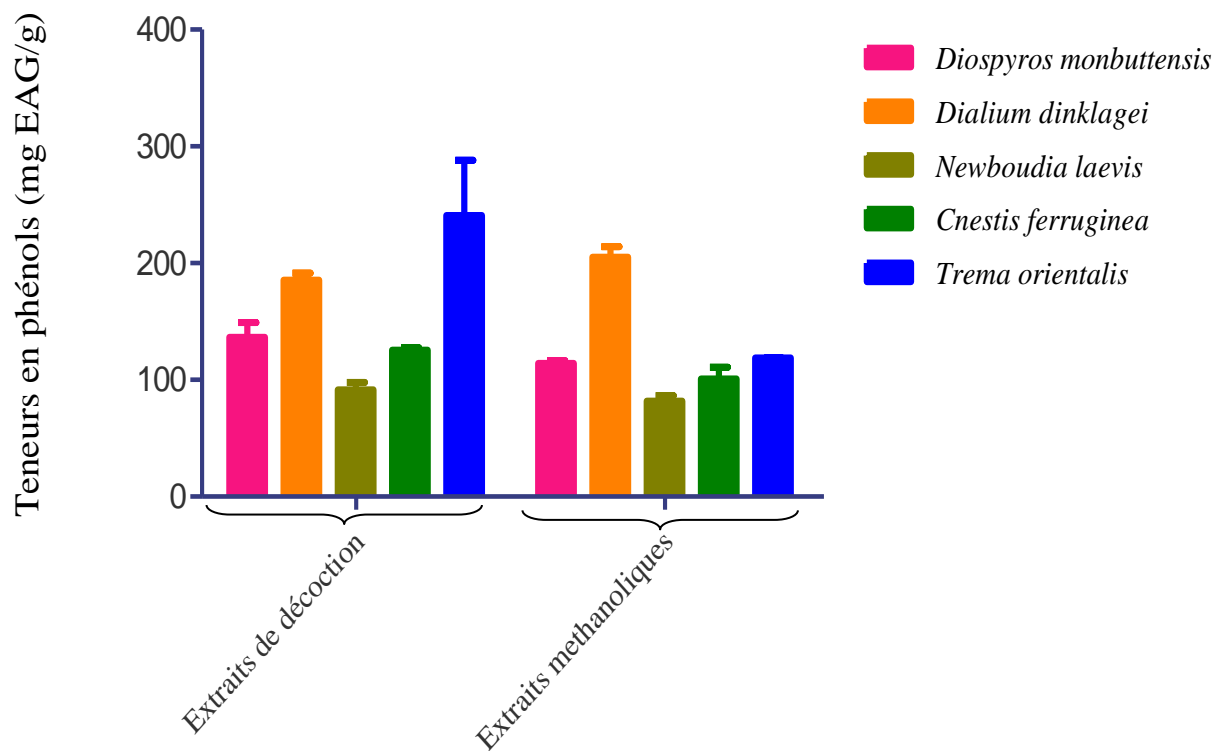


Figure 24: Teneurs en phénols des différents extraits de plantes étudiées

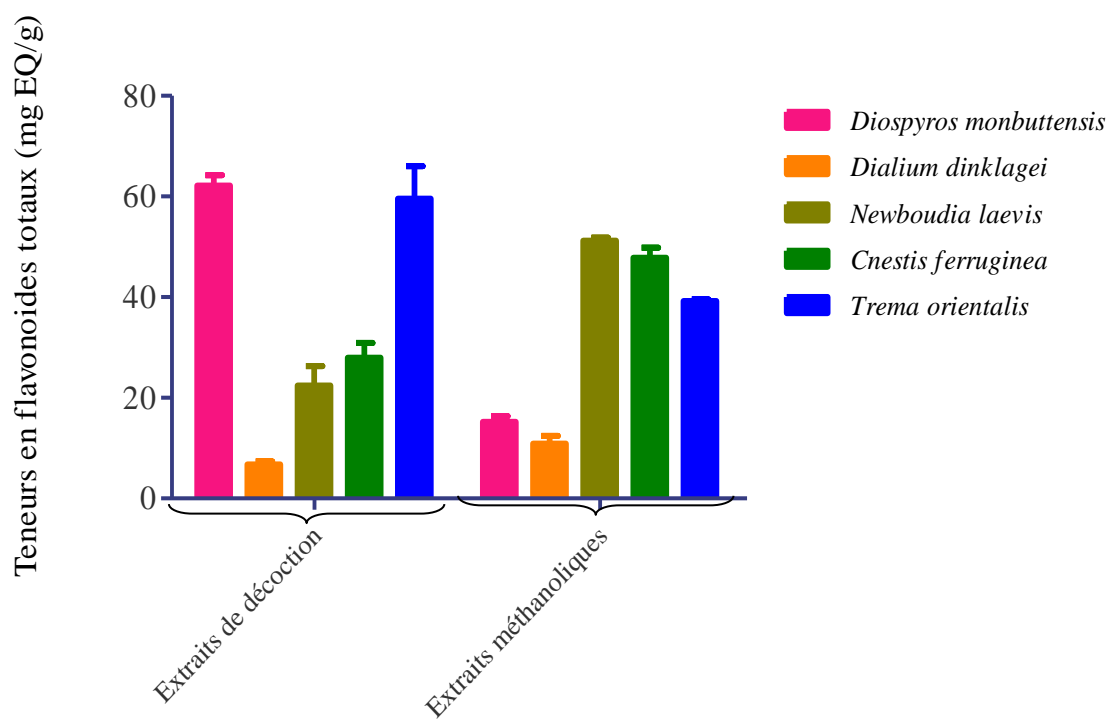


Figure 25 : Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de plantes étudiées

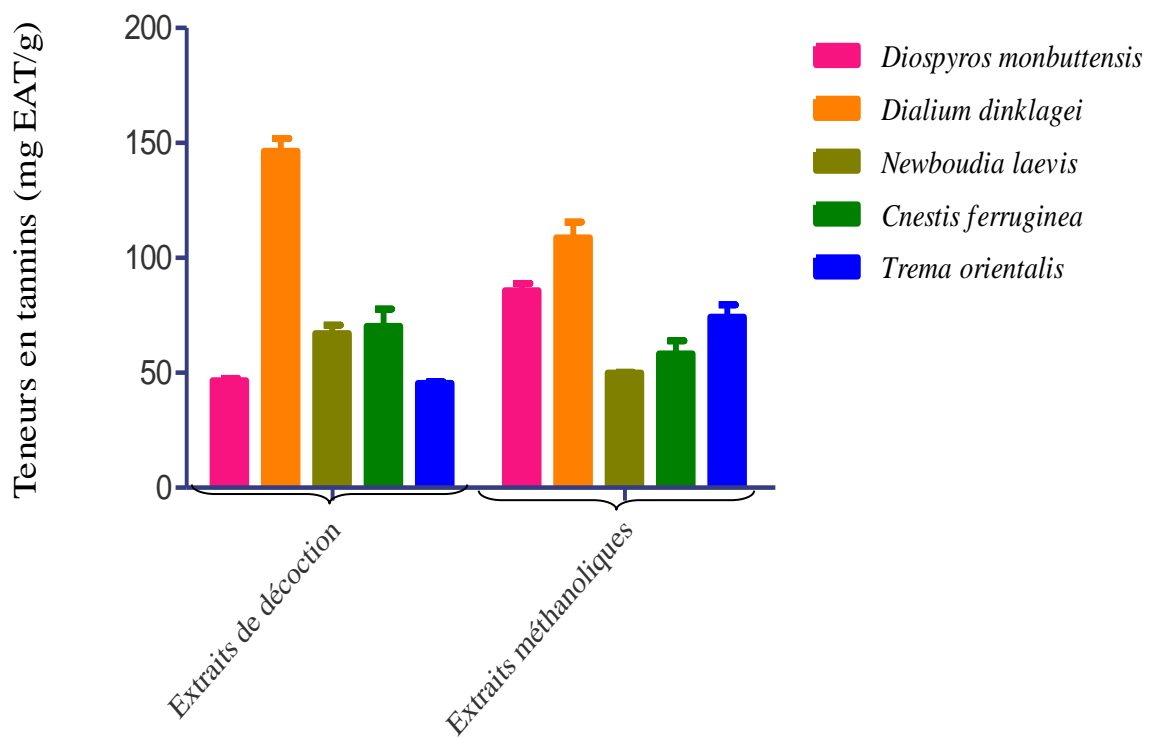


Figure 26 : Teneurs en tannins des différents extraits de plantes étudiées

III-2-4-Activités antioxydantes

III-2-4-1-Pouvoir chélateur

En présence d'agents chélateurs, la formation du complexe Fe^{2+} -Ferrozine est perturbée. Ceci entraîne à une diminution de la couleur rouge qui est suivie par spectrophotométrie.

Les résultats de la Figure 27 montrent que les extraits exercent un effet chélateur dépendant de la concentration. Les différences entre les extraits de décoction, méthanolique et l'EDTA sont statistiquement significatives ($P < 0,05$). Le Tableau V résume les concentrations inhibitrices 50 % (CI_{50}). La valeur de CI_{50} obtenue avec l'EDTA est très faible ($4,35 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$), reflétant un effet chélateur élevé. Les effets chélateurs les plus élevés obtenus avec les plantes sont ceux des extraits de décoction de *Newbouldia laevis* et méthanoliques de *Cnestis ferruginea* respectivement $7,28 \mu\text{g/mL}$ et $7,93 \mu\text{g/mL}$. Le plus faible pouvoir chélateur est obtenu avec l'extrait de décoction de *Cnestis ferruginea* ($45,25 \mu\text{g/mL}$).

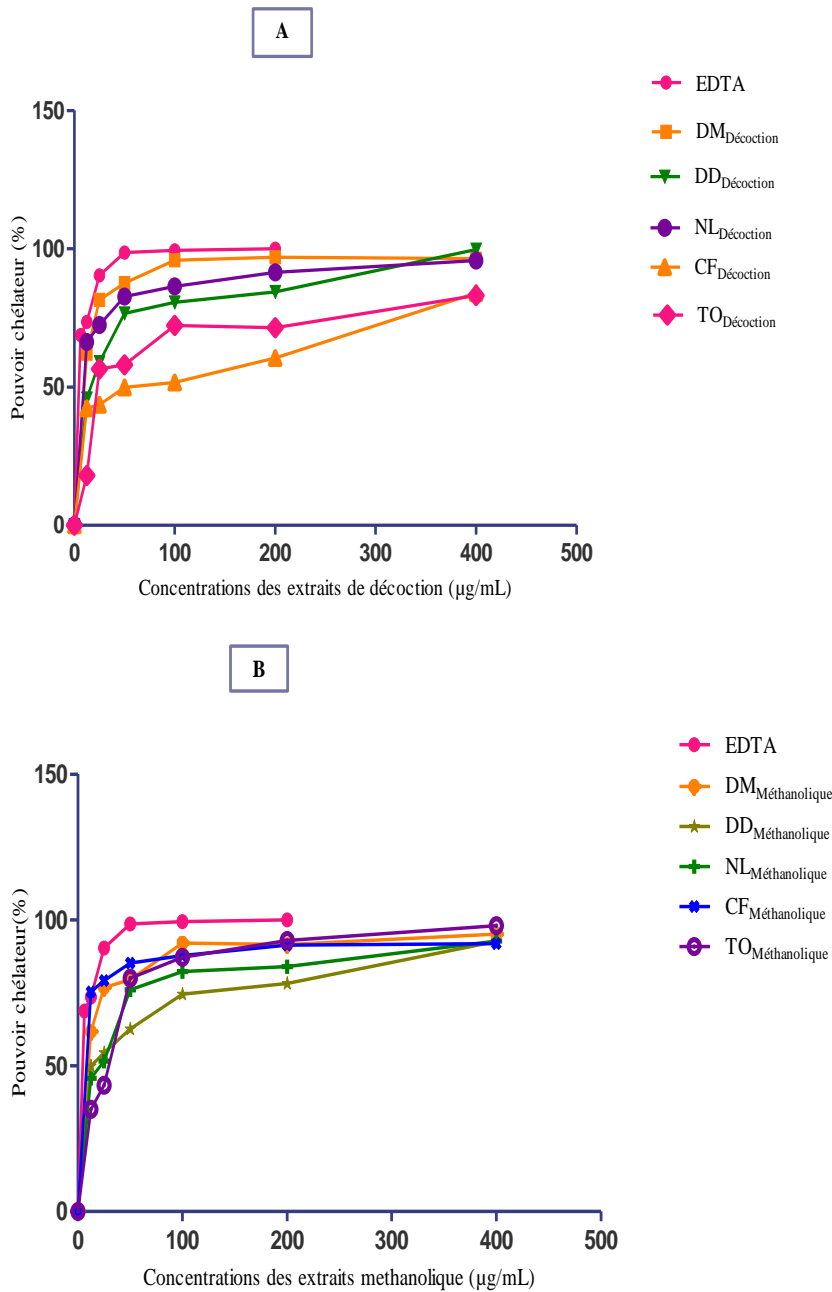


Figure 27: Evolution du pouvoir chélateur des extraits de plantes étudiées en fonction leur concentrations

A: Pouvoir chélateur des extraits de décoction
B: Pouvoir chelateur des extraits méthanoliques

DM_{Décoction} : Décoction de *Diospyros monbuttensis*
 DD_{Décoction} : Décoction de *Dialium dinklagei*
 NL_{Décoction} : Décoction de *Newbouldia laevis*
 CF_{Décoction} : Décoction de *Cnestis ferruginea*
 TO_{Décoction} : Décoction de *Trema orientalis*
 DM_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Diospyros monbuttensis*
 DD_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Dialium dinklagei*
 NL_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Newbouldia laevis*
 CF_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Cnestis ferruginea*
 TO_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Trema orientalis*

Tableau V: Pouvoir chélateur (CI₅₀) des extraits (µg/mL) des extraits méthanoliques et de décoctions des plantes étudiées

	Extrait de décoction	Extrait méthanolique
<i>Diospyros monbuttensis</i>	9,41 ± 0,31	11,10 ± 0,10
<i>Dialium dinklagei</i>	14,75 ± 0,25	13,45 ± 0,25
<i>Newbouldia laevis</i>	7,28 ± 0,21	17,85 ± 0,15
<i>Cnestis ferruginea</i>	45,25 ± 0,25	7,93 ± 0,01
<i>Trema orientalis</i>	24,55 ± 0,25	8,45 ± 0,05
EDTA (Standard)	4,35 ± 0,15	

III-2-4-2-Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Dans notre travail nous avons opté pour tester les extraits méthanolique et de décoction de chaque plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait (Figure 28). Les résultats ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

Les résultats figurent dans le Tableau VI. Ces résultats sont également exprimés par le paramètre $EC_{0.5}$ qui correspond à la concentration qui induit une absorbance de 0,5. L'extrait de décoction de *Trema orientalis* montre le pouvoir réducteur le plus élevé avec une $EC_{0.5}$ de 24,3 $\mu\text{g/mL}$ proche de celui de la vitamine C (20,75 $\mu\text{g/mL}$).

Le plus faible pouvoir réducteur est obtenu avec l'extrait méthanolique de *Cnestis ferruginea* (173 $\mu\text{g/mL}$).

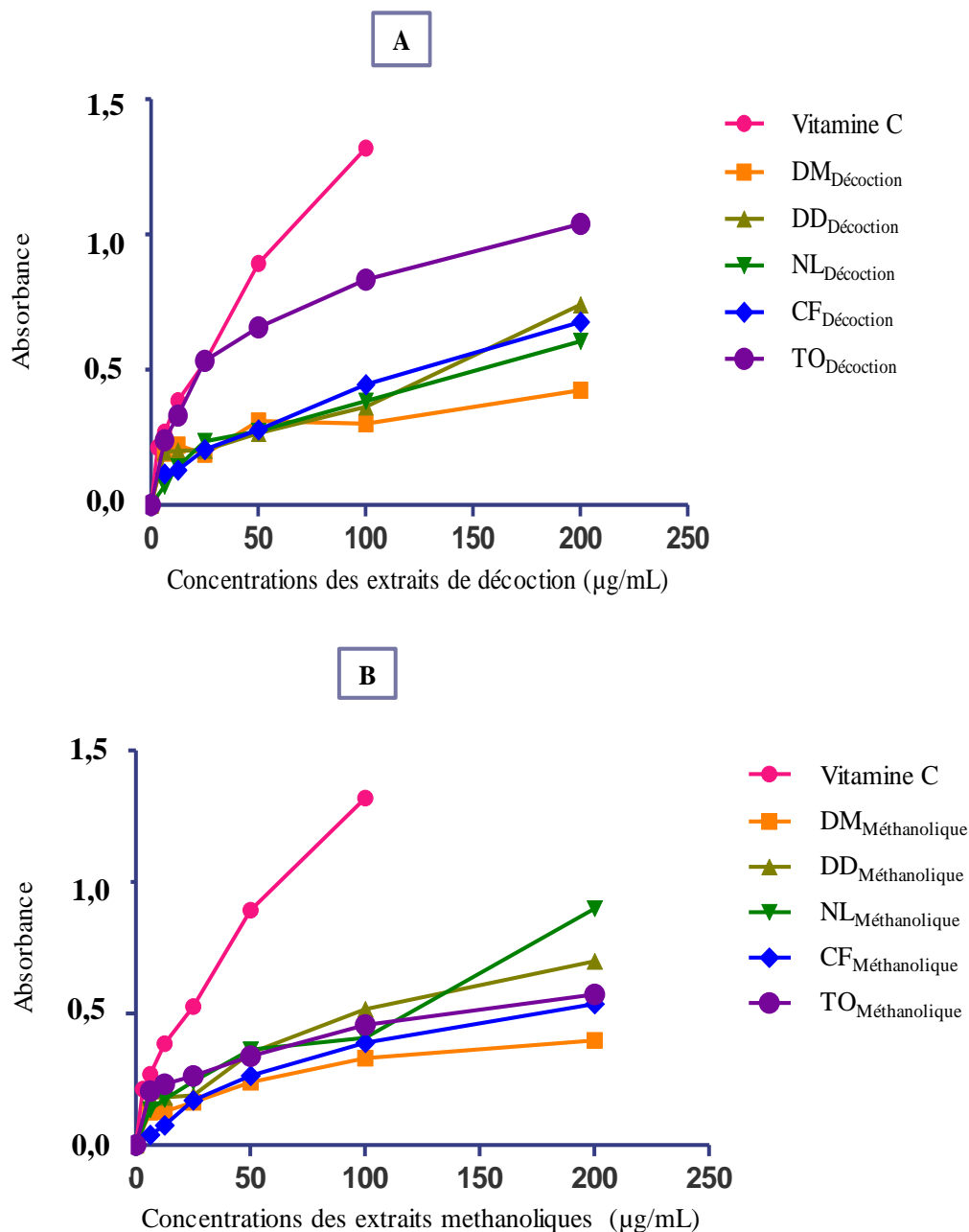


Figure 28 : Evolution du pouvoir réducteur des extraits de plantes étudiées en fonction leur concentrations

A: Pouvoir reducteur des extraits de décoction
 B: Pouvoir reducteur des extraits méthanoliques

DM_{Décoction} : Décoction de *Diospyros monbuttensis*
 DD_{Décoction} : Décoction de *Dialium dinklagei*
 NL_{Décoction} : Décoction de *Newbouldia laevis*
 CF_{Décoction} : Décoction de *Cnestis ferruginea*
 TO_{Décoction} : Décoction de *Trema orientalis*
 DM_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Diospyros monbuttensis*
 DD_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Dialium dinklagei*
 NL_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Newbouldia laevis*
 CF_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Cnestis ferruginea*
 TO_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Trema orientalis*

Tableau VI : Pouvoir réducteur (EC_{0,5}) des extraits (µg/mL) des extraits méthanoliques et de décoctions des plantes étudiées

	Extrait de décoction	Extrait méthanolique
<i>Diospyros monbuttensis</i>	>200	>200
<i>Dialium dinklagei</i>	133,5 ± 2,50	97,35 ± 1,35
<i>Newbouldia laevis</i>	148,0 ± 1,00	115,9 ± 0,10
<i>Cnestis ferruginea</i>	121,5 ± 0,50	173,5 ± 1,50
<i>Trema orientalis</i>	24,30 ± 0,80	133,0 ± 1,00
Vitamine C (Standard)	20,25 ± 0,75	

III-2-4-3-Pouvoir inhibiteur du radical DPPH

➤ Test quantitatif

L'activité antioxydante exercée sur le radical libre DPPH par les extraits bruts est dose-dépendante au niveau de tous les extraits démontrant ainsi qu'ils possèdent tous une activité antioxydante (Figure 29).

Les résultats de cette activité sont exprimés par le paramètre CI_{50} et figurent dans le Tableau VII. L'extrait possédant la valeur CI_{50} la plus basse, exerce l'activité anti-radicalaire la plus élevée. Selon le Tableau VII, tous les extraits sont dotés d'une activité antioxydante, qui varie d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre.

Les différences entre les extraits et molécule standard (Vitamine C) et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives ($P < 0,05$).

Newbouldia laevis apparaît comme la plante la plus active sur le radical DPPH avec une CI_{50} de 19 $\mu\text{g/mL}$ avec ses extraits méthanolique et de décoction. Quand à la molécule de référence (Vitamine C) elle affiche une CI_{50} de 3,71 $\mu\text{g/mL}$.

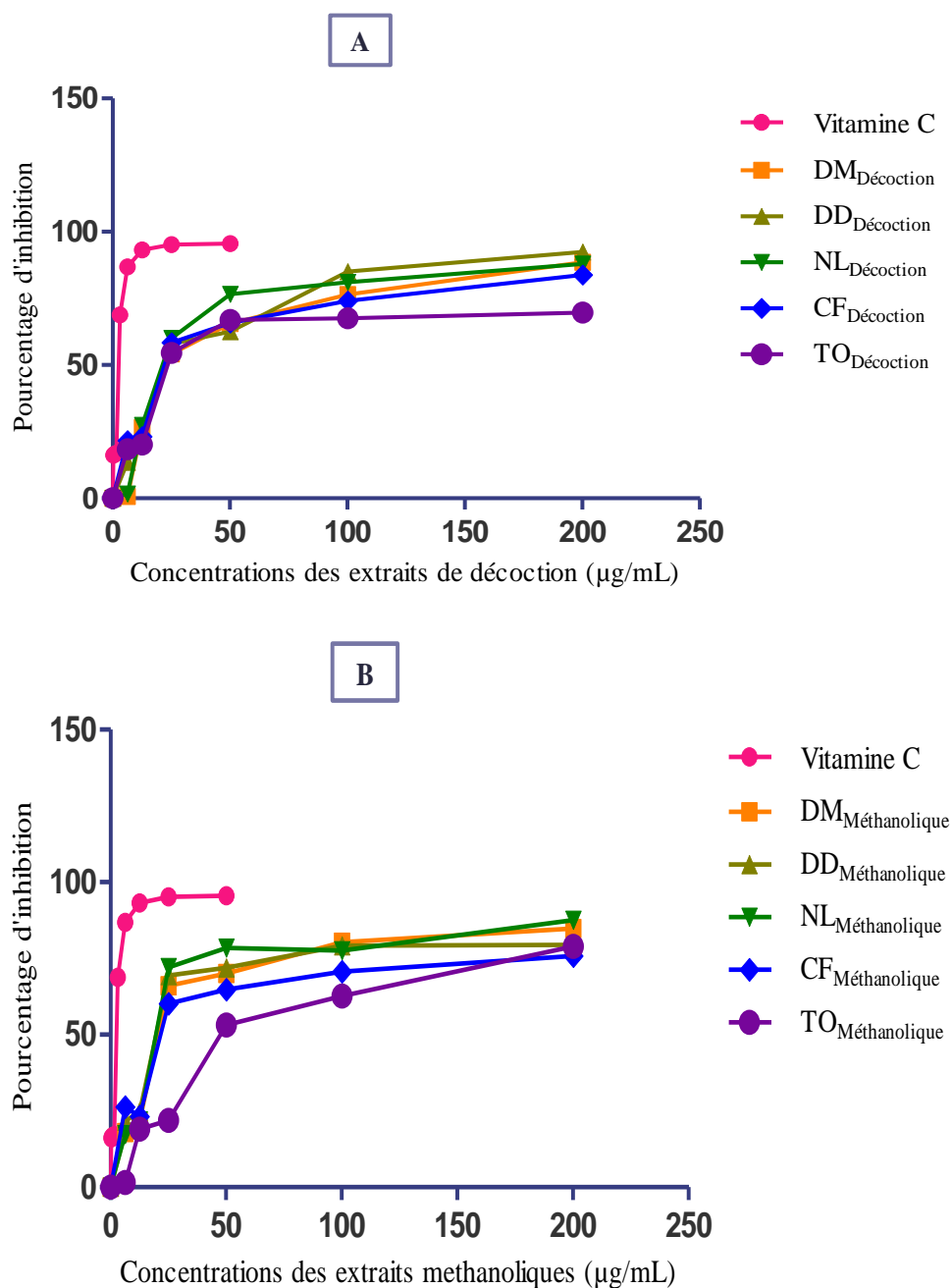


Figure 29: Evolution du pouvoir inhibiteur des extraits de plantes étudiées en fonction leur concentrations

A: Pourcentage d'inhibition des extraits de décoction

B: Pourcentage d'inhibition des extraits méthanoliques

DM_{Décoction} : Décoction de *Diospyros monbuttensis*

DD_{Décoction} : Décoction de *Dialium dinklagei*

NL_{Décoction} : Décoction de *Newbouldia laevis*

CF_{Décoction} : Décoction de *Cnestis ferruginea*

TO_{Décoction} : Décoction de *Trema orientalis*

DM_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Diospyros monbuttensis*

DD_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Dialium dinklagei*

NL_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Newbouldia laevis*

CF_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Cnestis ferruginea*

TO_{Méthanolique} : Extrait méthanolique de *Trema orientalis*

Tableau VII: Pouvoir inhibiteur (CI₅₀) des extraits (µg/mL) des extraits méthanoliques et de décoctions des plantes étudiées

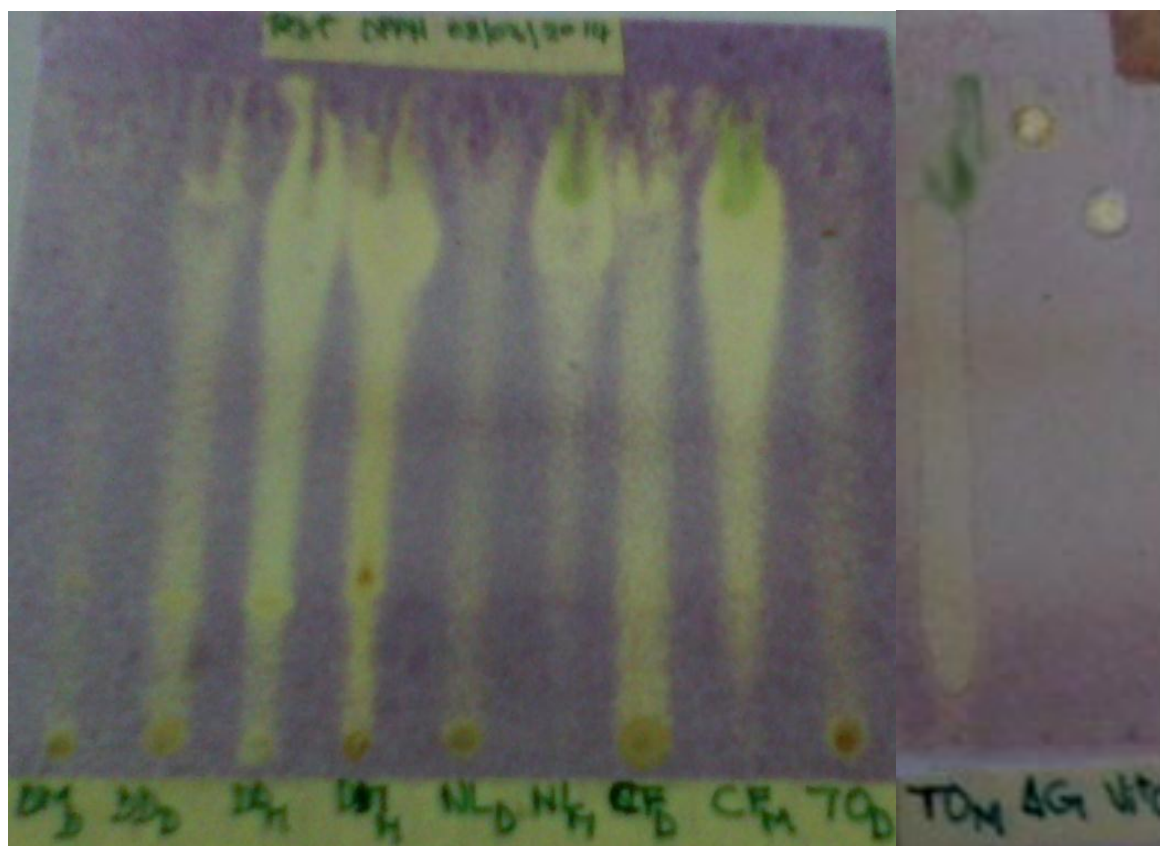
	Extrait de décoction	Extrait méthanolique
<i>Diospyros monbuttensis</i>	22,25 ± 0,25	20,40 ± 0,40
<i>Dialium dinklagei</i>	21,85 ± 0,15	20,30 ± 0,30
<i>Newbouldia laevis</i>	19,50 ± 0,50	19,85 ± 0,15
<i>Cnestis ferruginea</i>	21,55 ± 0,15	20,65 ± 0,15
<i>Trema orientalis</i>	22,75 ± 0,25	45,80 ± 0,90
Vitamine C (Standard)		3,71 ± 0,38

➤ **Test qualitatif: Test de DPPH sur CCM**

Les extraits migrés sur une plaque de silicagel avec comme système de solvant butanol - acide acétique - eau (60 /15 /25) ont été révélés au DPPH.

Tous les extraits bruts et les fractions issues des partitions que nous avons testés se sont montrés actifs avec le DPPH en donnant une tache jaune sur fond pourpre (Figure 30 et 31).

Test de DPPH 08/03/2014



DM_{Dec} DM_M DD_{Dec} DD_M NL_{Dec} NL_M CF_{Dec} CF_M TO_{Dec} TO_M AG Vit C

Figure 30 : Tache jaune sur fond violet indiquant l'activité anti radicalaire des extraits Bruts des plantes étudiées

DM : *Diospyros monbuttensis*

DD : *Dialium dinklagei*

NL : *Newbouldia laevis*

CF : *Cnestis ferruginea*

TO : *Trema orientalis*

Dec : Extrait de décoction

M : Extrait methanolique

AG : Acide gallique

Vit C : Vitamine C

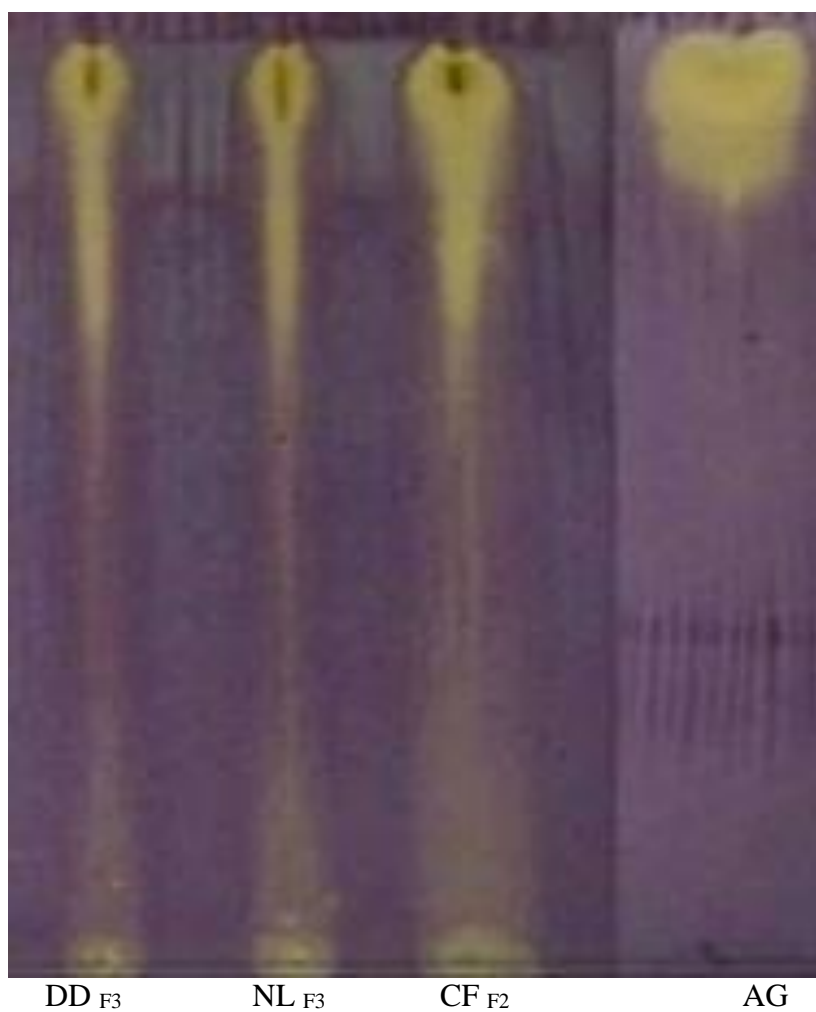


Figure 31 : Tache jaune sur fond violet indiquant l'activité anti radicalaire des partitions
DD_{F3}, NL_{F3}, CF_{F2} et AG

DD_{F3} : Extrait F₃ (acetatique) de *Dialium dinklagei*
NL_{F3} : Extrait F₃ (acetatique) de *Newbouldia laevis*
CF_{F2} : Extrait F₂ (butanolique) de *Cnestis ferruginea*
AG : Acide gallique

III-2-5-Tests biologiques

III-2-5-1-Tests d'activité antipaludique

➤ Extraits bruts

Les isolats et la souche de référence 3D7 et Dd2 de *Plasmodium falciparum* ont été testés en premier lieu sur les extraits bruts. Le Tableau VIII présente les valeurs des CI_{50} des extraits bruts après analyse des données (ANNEXE III). Parmi les 20 extraits issus des 5 espèces de plantes, 11 sont dépourvus d'une activité antiplasmodiale, 9 démontrent une activité antiplasmodiale sur le cycle érythrocytaire du *Plasmodium falciparum*. Et parmi ces neuf extraits, 4 ont une activité antipaludique prometteuse ($CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$).

➤ Partition liquide-liquide

Les extraits bruts possédant une activité prometteuse ($CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$) ont subi des partitions liquide-liquide pour améliorer leur activité. Ces activités ont été évaluées sur des isolats de *Plasmodium falciparum* et la souche de référence Dd2. Le Tableau IX présente les valeurs des CI_{50} des extraits obtenus après partition.

La partition liquide-liquide a permis d'améliorer sensiblement l'activité antiplasmodiale obtenue avec les extraits bruts d'environ $10 \mu\text{g/mL}$ à l'ordre de $1 \mu\text{g/mL}$.

Les extraits F₃ de *Dialium dinklagei*, F₃ de *Newbouldia laevis*, et F₂ de *Cnestis ferruginea* ont donné les meilleurs résultats respectivement $1,22 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$, $6,11 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ et $4,37 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$.

Tableau VIII: Résultats des tests antiplasmodiaux des extraits bruts des plantes étudiées

Plantes	Extraits	Rendement d'extraction (%)	Souches testées /CI ₅₀ (µg/mL)					
			Isolats cliniques			Souches de référence		
			W536	W539	W552	ANK02	3D7	Dd2
<i>Diospyros monbuttensis</i>	Déc	18	35,43±6,11	39,32±4,53	47,57±2,59	41,23±2,63	38,26±3,33	43,56±5,32
	Hex	1,6	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	17,8	29,21±1,78	23,67±4,35	27,89±3,61	30,78±2,22	23,51±3,26	25,41±4,76
	Aq	7,6	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Dialium dinklagei</i>	Déc	18,5	13,19±3,17	13,74±4,12	12,8 ±2.4	12,9 ±3.01	14,35±0,79	13,82 ±2.7
	Hex	1	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	4,5	17,66±2,65	15,76±5,63	19,15±3,27	15,29±3,76	14,97±2,59	15,11±2,26
	Aq	4	18,34±3,01	15,43±2,24	17,33±4,21	21,67±3,29	19,54±1,58	17,47±1,26
<i>Newbouldia laevis</i>	Déc	10,9	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Hex	1,2	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	4,4	11,51±0,43	11,45±0,36	12,85±0,74	10,21±3,22	13,35±1,46	10,79±2,15
	Aq	5	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Cnestis ferruginea</i>	Déc	17,95	12,85±2,29	13,1±3,19	11,96±1,62	13,94±3,23	11,78±2,21	11,85±1,43
	Hex	1	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	5,4	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Aq	5,8	13,68±2,76	13,74±2,72	12,35±1,44	13,56±3,1	12,15±1,91	12,35±4,21
<i>Trema orientalis</i>	Déc	20	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Hex	1,2	>50	>50	>50	>50	>50	>50
	Met	7,2	14,46±2,55	22,54±5,67	19,65±3,29	28,32±2,34	19,57±1,28	22,65±3,39
	Aq	7,6	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Chloroquine (nM)			33,01±0,92 (0,01 µg/mL)	42,71±1,32 (0,013 µg/mL)	37,31±3,24 (0,011 µg/mL)	35,38±4,92 (0,011 µg/mL)	51,07±2,23 (0,016 µg/mL)	116,71±5,11 (0,037 µg/mL)
Quinine (nM)			5,76±0,95 (0,0019 µg/mL)	23,87±1,12 (0,008 µg/mL)	44,37±2,15 (0,015 µg/mL)			
Artesunate (nM)			3,43±0,49 (0,0013 µg/mL)	2,22±0,16 (0,0008 µg/mL)	6,31±3,01 (0,0024 µg/mL)			

Dec : Décotion ; Hex : Hexanique ; Met : Méthanolique ; Aq : Aqueux

Tableau IX: Résultats des tests antiplasmodiaux des partitions des plantes étudiées

Plantes	Extraits	Rendement (%)	Isolats cliniques		Souches de référence
			W639	A149	Dd2
<i>Dialium dinklagei</i>	F1 Décoction	12,66	6,05±0,88	14,63±4,5	17,23±2,3
	F2 Décoction	33,2	12,47±1,06	11,68±2,39	12,61±1,39
	F3 Décoction	27	1,47±0,46	4,56±1,97	1,22±0,37
	F4 Décoction	24,33	5,71±0,79	11,88±1,06	10,38±3,06
<i>Newbouldia laevis</i>	F1 Méthanolique	52	9,63±2,21	9,39±2,83	13,29±2,71
	F2 Méthanolique	16,5	9,26±1,74	22,5±1	19,36± 3,05
	F3 Méthanolique	5,2	6,11±1,3	12,62±1	6,32±1,7
	F4 Méthanolique	23,8	8±0,9	7,32±1,18	17,51±2,31
<i>Cnestis ferruginea</i>	F1 Décoction	2,66	Non testé		
	F2 Décoction	30	5,51±0,94	7,07±1,11	4,37±0,77
	F3 Décoction	30,33	5,76±1,06	7,41±1,21	8,35±2,12
	F4 Décoction	36,9	5,83±2,67	6,76±1,13	6,62±2,02
Chloroquine			26,49±2,33 nM (0,008 µg/mL)	52,49±3,82 nM (0,016 µg/mL)	129±7,32 nM (0,041 µg/mL)
Artesunate			1,59±0,46 nM (0,0006 µg/mL)	3,16± 0,38 nM (0,0012 µg/mL)	1,36± 0,56 nM (0,0005 µg/mL)

F₁ : Fraction étherée

F₂ : Fraction butanolique

F₃ : Fraction acétatique

F₄ : Fraction aqueuse

III-2-5-2-Tests de combinaison

Lors de ce test, un isobogramme précis de l'association des extraits F₃ de *Dialium dinklagei* et F₂ de *Cnestis ferruginea* a été tracé.

On observe sur le nuage de points obtenu que tous les points sont bien en deçà de la diagonale représentant l'additivité (Figure 32).

Les extraits F₃ de *Dialium dinklagei* et F₂ de *Cnestis ferruginea*, permet de réduire considérablement la CI₅₀ des deux extraits sur la souche Dd2. La combinaison a permis d'obtenir un effet synergique fort et significatif.

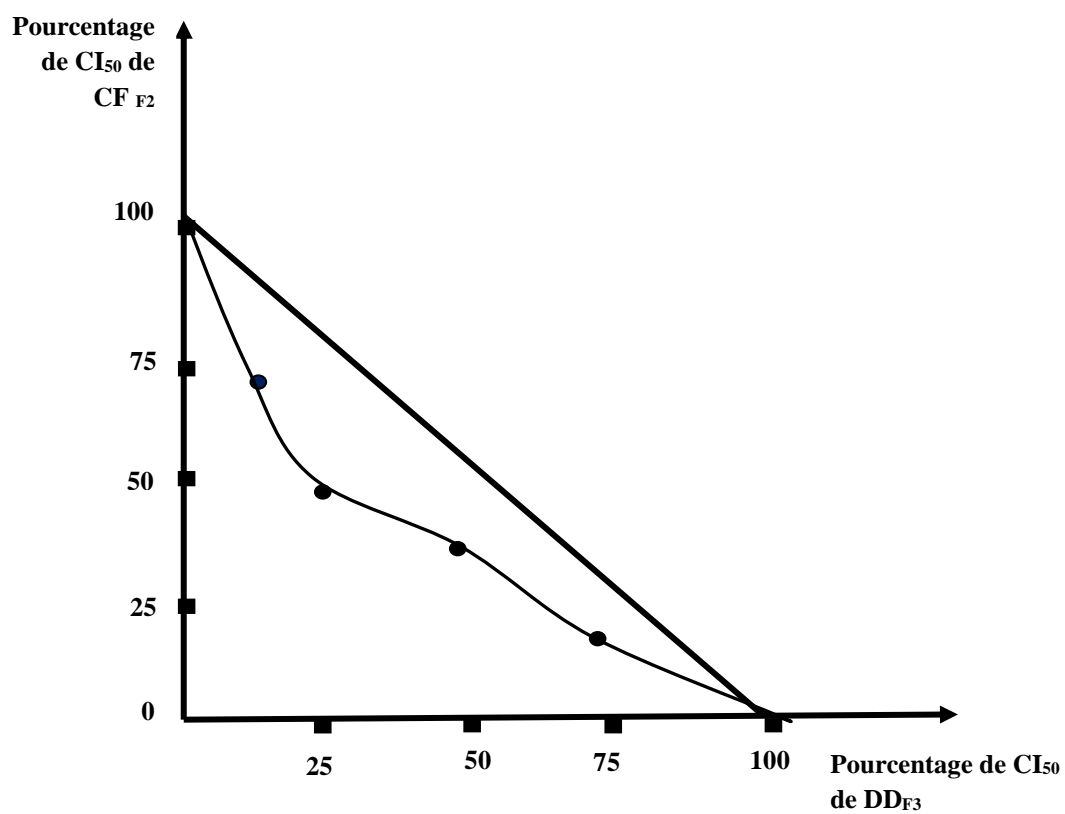


Figure 32: Isobologramme de la combinaison entre les fractions F₃ de *Dialium dinklagei* et F₂ de *Cnestis ferruginea*.

DD_{F3} : Fraction F₃ de *Dialium dinklagei*

NL_{F2} : Fraction F₂ de *Newbouldia laevis*

III-2-5-2-Tests d'activité hémolytique *in vitro*

Les tests d'hémolyse ont été réalisés afin de vérifier l'absence de faux positifs lors des tests antiplasmodiques *in vitro* qui se réalisent avec des érythrocytes humains (Figure 33).

Les résultats obtenus (Tableau X) montrent une activité hémolytique inférieure à 1 % dans la plupart des cas.

L'activité hémolytique la plus élevée est celle obtenue de la concentration de 200 µg/mL de la décoction de *Dialium dinklagei*, cependant elle ne dépasse guère 1,4 %. Nous pouvons dès lors conclure que les résultats obtenus lors des tests antiplasmodiaux ne sont pas influencés par cette faible action hémolytique. Car un pouvoir hémolytique se définit si le pourcentage d'hémolyse est supérieur à 5 %.

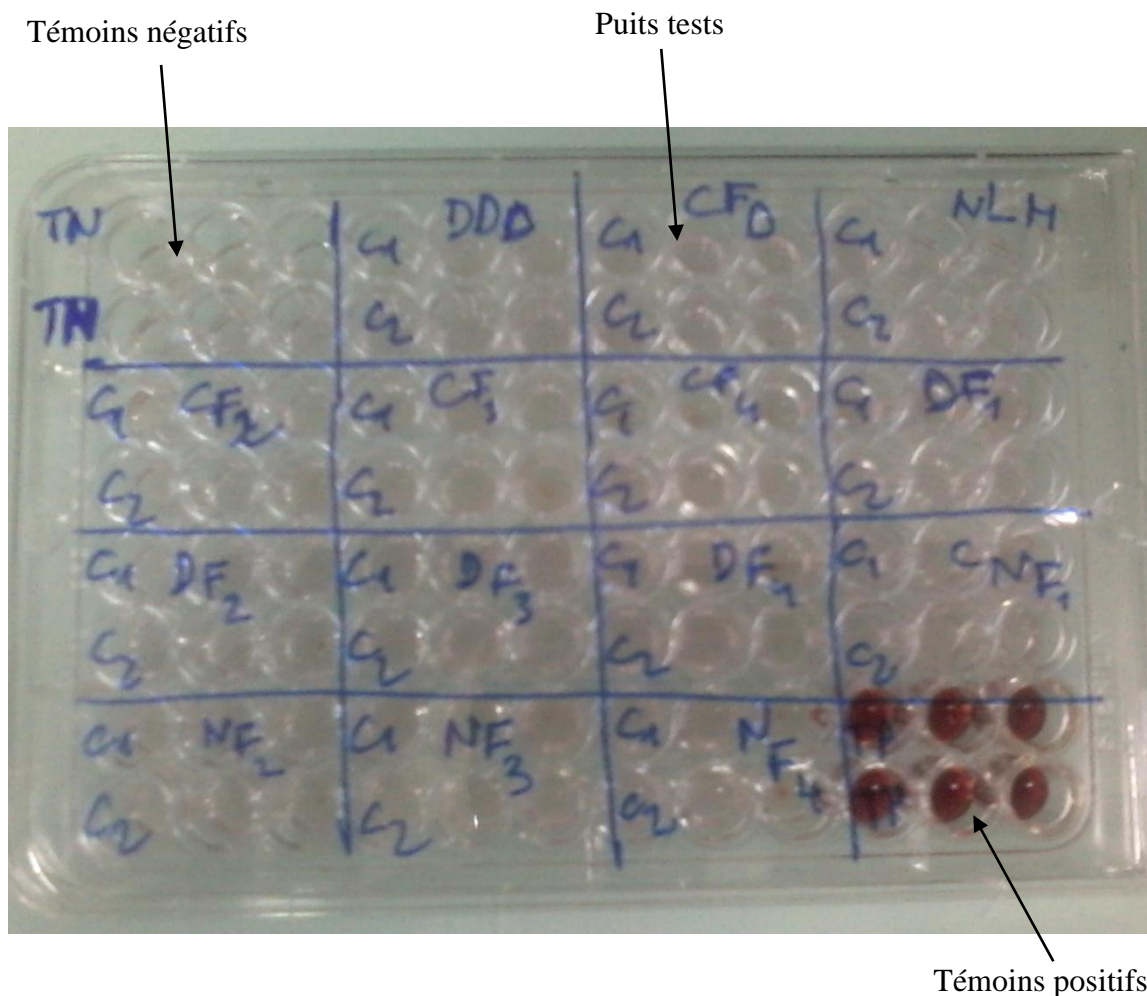


Figure 33 : Image montrant l'absence d'hémolyse des fractions contrairement aux témoins positifs (Triton X-100) où la coloration de l'hémoglobine est visible dans les puits

TN : Témoin négatifs

TP : Témoin positifs

DD : *Dialium dinklagei*

NL : *Newbouldia laevis*

CF : *Cnestis ferruginea*

F₁ : Fraction étherée

F₂ : Fraction butanolique

F₃ : Fraction acétatique

F₄ : Fraction aqueuse

Tableau X: Résultats des tests d'activités hémolytiques des extraits de plantes

Plantes	Extrait	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Activité hémolytique (%)
<i>Dialium dinklagei</i>		200	1,36
	DD Décoction	100	0,90
		200	1,07
	F1 Décoction	100	0,80
		200	0,85
	F2 Décoction	100	0,79
		200	0,96
	F3 Décoction	100	0,92
		200	0,61
	F4 Décoction	100	0,57
<i>Newbouldia laevis</i>		200	1,04
	NL Méthanolique	100	0,97
		200	0,85
	F1 Méthanolique	100	0,70
		200	1,09
	F2 Méthanolique	100	0,77
		200	1,04
	F3 Méthanolique	100	0,95
		200	0,82
	F4 Méthanolique	100	0,63
<i>Cnestis ferruginea</i>		200	0,97
	CF Décoction	100	0,68
		200	1,05
	F2 Décoction	100	0,39
		200	0,65
	F3 Décoction	100	0,46
		200	0,79
	F4 Décoction	100	0,65
Témoin négatif (PBS)	-	-	0%
Témoin positif (Triton X-100 20%)	-	-	100%

IV-DISCUSSION

La sélection des plantes sur la base de données ethnobotaniques augmente le pourcentage de chance d'aboutir à un extrait beaucoup plus actif. Notre revue littéraire a répertorié un total de 58 espèces de plantes appartenant à 53 genres et 30 familles. L'analyse des résultats a montré que 74,14 % des plantes (43 sur 58 plantes) répertoriées ont une efficacité *in vitro* sur des souches de laboratoire ; 48,29 % plantes (28 sur 58 plantes) ont présenté une très bonne activité *in vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum* de laboratoire avec une CI₅₀ d'au moins un de leurs extraits bruts testés inférieure à 5 µg/mL. Cependant, 15,51 % des plantes (09 sur 58 plantes) n'ont fait l'objet d'aucune étude antiplasmodiale *in vitro*, et pour 10,34 % (06 sur 58 plantes) des plantes sélectionnées, les études n'ont pas montré d'efficacité antipaludique *in vitro*.

Plusieurs raisons peuvent être expliquer l'absence d'activité: les méthodes traditionnelles ne sont pas reproduites au laboratoire, la dégradation possible du ou des principes actifs au cours de l'extraction, l'efficacité dépendante des associations de plantes, pas d'action directe sur le parasite (Soh & Benoit-Vical, 2007 ; Eze *et al.*, 2013). La famille la plus représentée est celle des Asteraceae (7 espèces), et viennent ensuite les Caesalpiniaceae, Meliaceae, Rubiaceae, Combretaceae, Apocynaceae (4 espèces chacune) puis la famille des Euphorbiaceae (3 espèces). Nos résultats sont conformes à ceux de Muthaura *et al.*, 2007b qui ont montré que, les Rubiaceae, Fabaceae, Asteraceae, Apocynaceae et Rutacées renferment les principales espèces de plantes antipaludiques. D'autres travaux similaires ont prouvé que les Rubiaceae renfermaient le plus grand nombre de plantes antipaludiques Iwu (1994). Huit plantes ont montré des activités antiplasmodiales très élevées avec des CI₅₀ inférieures à 1µg/mL. Le mode de préparation le plus utilisé était la décoction de la matière végétale fraîche, sèche en poudre ou non ; ce même resultat a été obtenu par Inngjerdigen *et al.*, (2004), Bah *et al.*, (2006) et Rodrigues (2007).

La disparition progressive de certaines espèces de plantes d'intérêt médicinal, réduit le potentiel végétal, source des médicaments des tradipraticiens et justifie la nécessité d'aménagement de jardins botaniques. Mais force est de constater que, la plupart des tradipraticiens exerçant individuellement ou en association n'ont pas les moyens nécessaires pour la création de tels jardins.

Les investigations ont permis de sélectionner *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* et *Trema orientalis* utilisées par la pharmacopée traditionnelle ivoirienne et très peu étudiées pour leur activité antipaludique.

Parmi les 5 extractions brutes, la décoction a produit le plus grand rendement (20 %), et l'hexane, le plus petit (1 %). Le très faible rendement obtenu avec l'hexane montre que les plantes étudiées contiennent très peu de composés non polaires. Ce résultat est semblable à celui obtenu par Bekro *et al.* (2007) qui ont obtenus (0,75 %) avec *Caesalpinia benthamiana* (Baill.). Dans

l'ensemble, les rendements des partitions sont élevés. Seuls les extraits F₃ (acétate d'éthyle) de *Newbouldia laevis* et F₁ (diethyl ether) de *Cnestis ferruginea* ont donné des rendements inférieurs à 10 %. Le rendement faible obtenu avec l'extrait F₁ de *Cnestis ferruginea* indique que l'extrait de cette plante contient très peu de composés solubles dans le diethyl ether dans la mesure où cet extrait est un extrait aqueux donc contenant peu de composés apolaires.

Les résultats du tri phytochimique réalisé sur les extraits de plantes à visée antipaludique varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. Elles ne contiennent pas de stéroïdes mais sont riches en polyphénols et en alcaloïdes. Les autres composés chimiques sont présents ou absents selon la plante ou l'extrait testé pour l'analyse phytochimique. De façon générale, ces plantes sont riches en métabolites secondaires. Ces résultats sont semblables à ceux de **Bouquet et Debray (1974)** qui ont montré la présence de stérols, de saponosides, de tannins et de quinones dans *Newbouldia laevis* et *Diospyros monbuttensis*. Très peu de travaux ont été réalisés sur certaines plantes comme *Dialium dinklagei* (*Caesalpiniaceae*) et *Diospyros monbuttensis* Gürke (*Ebenaceae*).

L'indication thérapeutique antipaludique pourrait être liée à la présence des alcaloïdes quand on sait que la majorité des molécules antipaludiques sont de cette famille chimique. Par ailleurs diverses études ont démontré que les polyphénols ont un potentiel antioxydant. Cette activité antioxydante est due à leur capacité à piéger les radicaux libres et à chélater des ions métalliques (**Tseng, 1991**). On attribue aux terpénoïdes et tannins des activités analgésiques et anti-inflammatoires. En dehors de cela, les tannins contribuent à la cicatrisation des plaies (**Okwu et Josiah, 2006**).

La phytochimie quantitative a révélé des taux importants et variables en polyphénols, flavonoïdes et tannins. La quantification a été effectuée aux travers des méthodes colorimétriques. Ces techniques ont montré que les 5 plantes médicinales renferment de fortes teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins; elles affichent donc la forte présomption que ces plantes peuvent servir de sources d'antioxydants naturels.

De façon générale, l'analyse du contenu en phénols totaux des 5 plantes indique que les décoctés sont plus riches en composés que les extraits méthanoliques. L'augmentation de la température favoriserait d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites. D'autres parts, elle détruit certaines substances fragiles (**Jokić et al., 2010**).

Pour les flavonoïdes et les tannins, le solvant d'extraction ne semble pas avoir une influence sur leur teneur toutefois, *Dialium dinklagei* ayant donné des taux élevés en phénols et des taux très faibles en flavonoïdes possède des taux élevés en tannins.

Cette différence pourrait être liée aux espèces des plantes étudiées qui sont différentes. Les tannins sont généralement définis comme composés polyphénoliques naturels de haut poids moléculaire pouvant former des complexes avec les protéines. Les tannins sont une source importante de protéines chez les animaux et leurs effets sur les animaux sont variables (**Yang et al., 1992**). Ainsi, ces composés offrent une protection contre les maladies cardio-vasculaires, les maladies immune/auto-immunes, les dysfonctionnements cérébraux comme la maladie de Parkinson, et la maladie d'Alzheimer (**Han et al., 2007**).

L'utilisation médicinale traditionnelle de ces plantes est bien justifiée car, il est maintenant reconnu que les composés phénoliques ont un intérêt thérapeutique important: lutte contre l'athérosclérose, action anticancérigène, source majeure d'antioxydants naturels permettant de lutter contre le vieillissement cellulaire (**Hagerman et al., 1998; Kumar et al., 2006**). De plus, l'étude tri phytochimique a révélé qu'en plus des phénols, des flavonoïdes et des tanins, ces plantes contiennent aussi des polyterpènes, des saponines et des alcaloïdes qui contribueraient à leurs diverses activités thérapeutiques.

L'ensemble des résultats du screening phytochimique et le contenu polyphénolique expliqueraient en partie, et ce de façon rationnelle, l'engouement des tradithérapeutes pour ces plantes comme antipaludiques. Les effets thérapeutiques sont induits par divers composés chimiques (alcaloïdes, flavonoïdes, polyphénols, polyterpènes, saponosides, stérols et tannins catéchiques) qui constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique traditionnelle des plantes étudiées. Les études *in vivo*, *in vitro* et la détermination de la structure des molécules actives permettront d'approfondir l'étude de l'activité antipaludique de ces plantes.

Comme l'indique les résultats, le pouvoir chélateur des ions ferreux et le pouvoir réducteur des extraits sont dose-dépendantes. Les différents extraits ont révélé des pouvoirs chélateurs avec des CI_{50} élevées. Les plus élevés obtenus avec les plantes sont ceux des extraits de décoction de *Newbouldia laevis* et méthanoliques de *Cnestis ferruginea* respectivement 7,28 $\mu\text{g/mL}$ et 7,93 $\mu\text{g/mL}$. Le fort pouvoir réducteur a été obtenu avec l'extrait de décoction de *Trema orientalis* (24,30 \pm 0,80 $\mu\text{g/mL}$). Celui-ci est proche de celui de la vitamine C (20,25 \pm 0,75 $\mu\text{g/mL}$) utilisé comme molécule de référence ($p > 0,05$).

La méthode de piégeage des radicaux DPPH est une procédure standard appliquée pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire. Cette méthode est un outil simple, rapide et sensible pour étudier l'activité anti-oxydante d'un composé particulier ou d'extraits de plantes (**Koleva et al., 2002**). Les différents extraits ont montré une activité dose dépendante de piégeage des radicaux DPPH. La plus forte activité antiradicalaire est obtenue avec la molécule de référence (vitamine C) dont la CI_{50} est 3,71 \pm 0,38 $\mu\text{g/mL}$. Cette valeur est proche de celle trouvée par **Somanjana et al.**

(2013), avec de la vitamine C qui est de $4.3 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. La différence entre la vitamine C et les autres est importante. Mais les activités antiradicalaires des extraits sont également élevées.

En général, ces résultats ne sont pas significativement différents ($p > 0,05$) l'un de l'autre. Les différences observées pourraient être dues aux espèces végétales qui sont différentes ou en raison de différentes conditions environnementales (Perveen *et al.*, 2012). Dans certains cas, les extraits avec une forte activité anti-radicalaire sont riches en flavonoïdes ou en composés phénoliques. L'effet antiradicalaire des extraits pourrait être liés à la capacité de donneur d'hydrogène des polyphénols (Kossah *et al.*, 2010).

Le test antioxydant que nous avons réalisé sur plaques de CCM a donné des tâches jaune sur fond violet indiquant l'activité anti radicalaire pour nos différents extraits. Tous les extraits soumis à ce test ont positivement réagi. L'activité antioxydante de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence des substances polyphénoliques: les phénols, les flavonoïdes et les tannins (Bruneton, 1993). En effet, ces substances antioxydantes naturelles rencontrées chez les végétaux, rentrent dans l'arsenal thérapeutique en ce qui concerne la lutte contre l'athérosclérose, la polyarthrite chronique, l'asthme et les cancers.

L'activité antioxydante des extraits pourrait être d'un apport important pour réussir le traitement contre le paludisme. En effet les neutrophiles activés par les parasites déclenchent une destruction des cellules endothéliales qui peut être prévenue par l'apport d'antioxydants et les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques *in vitro* (Hemmer *et al.*, 2005). Les parasites du paludisme entraîneraient un stress oxydatif chez la victime par la lyse massive des globules rouges. Ainsi, Onigbinde *et al.* (2005) ont montré que la combinaison (chloroquine – acide ascorbique) réduirait de façon significative le stress oxydatif provoqué par *P. berghei* chez les souris par rapport à la chloroquine utilisée seule. Les antioxydants pourraient atténuer les dommages sur les cellules endothéliales dus à l'activation leucocytaire provoquée par les parasites (Pincemail *et al.*, 1999).

Actuellement plusieurs travaux de recherche sont en cours pour élucider le rôle des antioxydants dans les traitements antipaludiques.

L'étude de l'activité anti-plasmodiale d'une plante requiert de nombreux outils d'analyse. Dans le cas de cette étude, l'efficacité d'une plante est démontrée par l'activité *in vitro* de l'un de ses extraits contre *P. falciparum*. Certainement, de nombreuses plantes ne répondent pas positivement à ce type de test mais possèdent tout de même une activité contre le paludisme. Car elles peuvent soigner la symptomatologie de la maladie ou sont potentialisées par d'autres drogues. Cependant la reproductibilité, la simplicité et l'objectivité des tests *in vitro* permettent une sélection rationnelle des plantes potentiellement anti-paludiques. L'évaluation de l'activité antiplasmodiale de nos extraits a été faite sur les souches de référence 3D7 chloroquinosensible avec une valeur de CI_{50}

moyenne de la chloroquine de 27 nM et Dd2 (MRA-156) chloroquinorésistante avec une valeur de CI_{50} moyenne de la chloroquine de 114 nM et des souches cliniques de *Plasmodium falciparum*.

La détermination de l'activité antipaludique sur des souches de référence de *P. falciparum* pose aussi le problème de la validité des tests *in vitro*. En effet, ces différentes souches utilisées sont adaptées à la culture en laboratoire et pourraient ne plus correspondre à la réalité du terrain. C'est pourquoi, il nous est apparu intéressant d'évaluer l'activité des extraits sur des isolats de patients impaludés en zone d'endémie.

Les différentes plantes ont été actives sur les souches plasmodiales. Dans l'optique de sélectionner les extraits de très bonne activité, la concentration maximale utilisée pour nos tests étaient de 50 $\mu\text{g/mL}$. Dans ces conditions, nos tests n'ont pas permis de déterminer les CI_{50} supérieures à 50 $\mu\text{g/mL}$. Les meilleurs résultats des extraits bruts ont été obtenus avec *Dialium dinklagei* (extrait de décoction $CI_{50} = 12,8 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$); *Newbouldia laevis* (extrait méthanolique $CI_{50} = 10,21 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$) et *Cnestis ferruginea* (extrait de décoction $CI_{50} = 11,78 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$). Ces activités inférieures à 15 $\mu\text{g/mL}$ sont prometteurs selon (**Bero et al., 2009; Bero et Quetin-Leclercq, 2011 ; Jansen et al., 2012**).

Les meilleurs résultats obtenus avec *Diospyros monbuttensis* ($CI_{50} = 23,51 \pm 3,26 \mu\text{g/mL}$) et *Trema orientalis* ($CI_{50} = 14,46 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$) ont été obtenus avec les extraits méthanoliques. Ces résultats sont proches de ceux de **Olasehinde et al., (2012)** qui ont obtenu une CI_{50} de 32 $\mu\text{g/mL}$ avec l'extrait méthanolique de *Diospyros monbuttensis*.

La chloroquine, l'artesunate et la quinine utilisées comme molécules de référence nous ont donné des CI_{50} qui varient entre $33,01 \pm 0,9 \text{ nM}$ ($0,010 \mu\text{g/mL}$) et $51,07 \pm 2,2 \text{ nM}$ ($0,016 \mu\text{g/mL}$) pour la chloroquine, entre $2,22 \pm 0,16 \text{ nM}$ ($0,0008 \mu\text{g/mL}$) et $6,31 \pm 3,01 \text{ nM}$ ($0,0024 \mu\text{g/mL}$) pour l'artesunate et entre $5,76 \pm 0,95 \text{ nM}$ ($0,0019 \mu\text{g/mL}$) et $44,37 \pm 2,15 \text{ nM}$ ($0,0151 \mu\text{g/mL}$) pour la quinine sur les différentes souches testées. Ces résultats des molécules de référence sont proches de ceux habituellement retrouvés dans la littérature. On note d'ailleurs une sensibilité des isolats à la chloroquine, ce qui pourrait s'expliquer par le retrait de cette molécule du marché national depuis quelques d'années.

La partition liquide-liquide est une technique de recherche qui s'est avérée indispensable pour l'amélioration de l'activité antiplasmodiale. En effet, les tests biologiques ont non seulement permis la sélection d'espèces végétales biologiquement actives, mais aussi d'orienter la purification des extraits antiplasmodiales. La partition nous a permis ainsi d'améliorer sensiblement l'activité antiplasmodiale obtenue avec les extraits bruts d'environ 13 $\mu\text{g/mL}$ à l'ordre de 1 $\mu\text{g/mL}$. Les extraits F_3 de *Dialium dinklagei*, F_3 de *Newbouldia laevis*, et F_2 de *Cnestis ferruginea* ont donné les meilleurs résultats respectivement $1,22 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$, $6,11 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ et $4,37 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$.

L'activité de l'extrait F₃ de *Dialium dinklagei* est d'ailleurs plus élevée que celle obtenue avec l'extrait éthanolique d'*Artemisia annua* (CI₅₀ = 3.9 µg/mL) plante à partir de laquelle est isolée l'artémisinine (O'Neill *et al.*, 1985; Phillipson & Wright, 1991 ; Jorge *et al.*, 2010). *Artemisia Annua* contient un véritable cocktail de molécules de flavonoïdes (Chiung-Sheue *et al.*, 1992) qui se trouvent dans les feuilles, mais également et peut-être à concentration plus importante dans les tiges de la plante (Woerdenbag *et al.*, 1991). Les différents composants ont un effet synergique comme le confirme certaines études récentes qui montrent que l'efficacité de la tisane est trois fois plus importante que ne le serait la même quantité d'artémisinine prise isolément (De Donno *et al.*, 2012 ; Elfawal *et al.*, 2012).

Il nous semble évident que les plantes de la pharmacopée traditionnelle africaine peuvent apporter une contribution importante à la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques efficaces et accessibles. Par ailleurs, nous devrions nous interroger davantage sur l'intérêt de purifier un principe actif plutôt que d'utiliser la plante elle-même ou son extrait total, ce d'autant plus que, très souvent, les plantes renferment plusieurs principes actifs et constituent ainsi des combinaisons thérapeutiques naturelles, qui pourraient exercer une action synergique et empêcher le développement de résistance chez *Plasmodium falciparum*.

Nos extraits F₃ (acétate d'éthyle) de *Dialium dinklagei* et F₂ (butanol) de *Cnestis ferruginea* sont de bons candidats pour la formulation d'un médicament traditionnel amélioré (MTA) à l'image du Malarial® qui est un MTA disponible contre le paludisme constitué d'un mélange de poudre de *Cassia occidentalis* (Caesalpinaceae), de *Lippia chevalieri* (Verbenaceae) et de *Spilantes oleracea* (Asteraceae). Ces fractions ont l'avantage non seulement d'être de puissants antipaludiques selon l'échelle de classification de Bero *et al.*, 2009; Bero et Quetin-Leclercq, 2011 ; Jansen *et al.*, 2012 (CI₅₀ < 5 µg/mL) mais aussi de très bons antioxydants.

De plus on observe un effet additif entre les extraits F₃ de *Dialium dinklagei* et F₂ de *Cnestis ferruginea*. La combinaison de ces extraits a permis de réduire considérablement la CI₅₀ des deux extraits sur la souche Dd2.

Cette combinaison a permis d'obtenir un effet synergique fort et significatif. Cet effet particulièrement intéressant est recherché, dans les associations que recommande l'OMS.

Les tests d'hémolyse ont été réalisés afin de vérifier l'absence de faux positifs lors des tests antiplasmodiaux *in vitro*. La littérature montre que le test d'activité hémolytique n'est pas très souvent présenté dans les criblages antiplasmodiaux alors que le protocole est simple et rapide. S'il est inclus dans le protocole des tests antiplasmodiaux, il pourrait permettre la détection de résultats «faux positifs». En effet, si l'échantillon engendre une hémolyse, le parasite ne peut se développer correctement et donc l'effet antipaludique mesuré ne reflèterait pas l'action de l'échantillon sur le *Plasmodium*. Un pouvoir hémolytique se définit si le pourcentage d'hémolyse est supérieur à 5 %.

Les résultats montrent une activité hémolytique inférieure à 1 % dans la plupart des cas. L'activité hémolytique la plus élevée est celle de la concentration 200 µg/mL de la décoction de *Dialium dinklagei*, cependant elle ne dépasse guère 1,4 %. Nous pouvons dès lors conclure que les résultats obtenus lors des tests antiplasmodiaux ne sont pas influencés par cette faible action hémolytique (Jensen *et al.*, 2012).

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Le présent travail avait pour but l'identification de plantes traditionnelles antipaludiques ivoiriennes, la détermination de leur teneur en polyphénols totaux ainsi que leur activité antioxydante correspondante. Ainsi ce travail consistait à:

Les objectifs spécifiques qui en découlent sont les suivants:

- ✓ répertorier et sélectionner à partir d'une enquête ethnobotanique suivie d'une revue littéraire les plantes utilisées en Côte d'Ivoire contre le paludisme;
- ✓ faire le criblage phytochimique et antioxydante des plantes sélectionnées;
- ✓ déterminer l'activité antiplasmodiale des plantes sélectionnées et évaluer l'activité hémolytique des extraits d'intérêt.

A l'issue de cette étude, il apparaît que la médecine traditionnelle ivoirienne est très riche et possède un potentiel thérapeutique énorme. Les résultats de l'étude donne une crédibilité à l'utilisation de nombreuses espèces actives dans le traitement traditionnel du paludisme. Ainsi, 74.14 % des plantes (43 sur 58 plantes) répertoriées ont une efficacité *in vitro* sur souches de laboratoire. Certaines plantes comme *Combretum micranthum* (Combretaceae), *Enantia polycarpa* (Annonaceae), *Guiera senegalensis* (Combretaceae), *Nauclea latifolia* (Rubiaceae), *Sida acuta* (Malvaceae), *Terminalia glaucescens* (Combretaceae), *Vernonia colorata* (Astraceae), *Ximenia americana* (Oleaceae) ont montré des activités antiplasmodiales très intéressants avec des CI_{50} inférieures à 1 $\mu\text{g/mL}$. La disparition progressive de certaines espèces de plantes d'intérêt médicinal réduit le potentiel végétal, source des médicaments des tradipraticiens et justifie la nécessité d'aménagement de jardins botaniques. Mais malheureusement, la plupart des tradipraticiens exerçant individuellement ou en association n'ont pas les ressources nécessaires pour la création de tels jardins. Il est donc important de soutenir la conservation et l'exploitation durable de ces espèces aux vertus thérapeutiques très souvent menacées par la destruction de la flore sauvage.

L'ensemble des résultats du screening phytochimique expliquerait en partie, et ce de façon rationnelle, l'engouement des tradithérapeutes pour ces plantes comme antipaludiques. Les effets thérapeutiques sont justifiés par la présence de divers composés chimiques (alcaloïde, flavonoïdes, polyphénols, polyterpènes, saponosides, stérols et tannins catéchiques) qui constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique traditionnelle des plantes étudiées.

Une abondance en polyphénol totaux et une bonne activité antioxydante des différents extraits de plante ont été notées. Ces plantes ivoiriennes pourraient donc être considérées comme des sources d'antioxydants naturels à des fins médicinales.

Les tests antipaludiaux réalisés ont révélé que 9 extraits sur 20 ont une activité antipaludique dont 4 ont des CI_{50} inférieures à 15 $\mu\text{g/mL}$.

La partition liquide-liquide a permis d'améliorer l'activité pour atteindre $1,22 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$, $6,11 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ et $4,37 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$ respectivement pour l'extrait F_3 de *Dialium dinklagei*, F_3 de

Newbouldia laevis et F₂ de *Cnestis ferruginea*. L'activité de l'extrait F₃ de *Dialium dinklagei* est d'ailleurs plus élevée que celle obtenue avec l'extrait éthanolique d'*Artemisia annua* (CI₅₀ = 3.9 µg/mL) plante à partir de laquelle est isolée l'artémisinine (molécule de référence utilisée contre le paludisme aujourd'hui).

Une sensibilité des isolats cliniques à la chloroquine a été notée.

Par ailleurs les tests d'activité hémolytique des extraits n'ont pas révélé d'activité hémolytique qui pourrait interférer avec l'activité antipaludique.

Cette démarche expérimentale a permis de valider l'usage de la pharmacopée traditionnelle ivoirienne dans le traitement du paludisme. Ce travail pourrait marquer un point de départ vers la mise au point de médicaments indiqués dans le traitement du paludisme, après approfondissement de certains aspects de la présente étude et la réalisation d'essai clinique.

Ainsi, la suite de ce travail consistera à évaluer la toxicité des extraits ayant montré de très bonne activité antiplasmodiale et antioxydante afin de proposer la formulation d'un médicament traditionnel amélioré. La dernière étape consistera à poursuivre l'identification de molécules antipaludiques à partir des extraits actifs, d'explorer de nouvelles cibles sur le parasite et la compréhension de leur mécanisme d'action antiparasitaire.

D'autre part, il serait important d'étudier la réversibilité de la chloroquinorésistance par l'étude d'un grand nombre d'isolats.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abiodun O., Gbotosho G., Ajaiyeoba E., Happi T., Falade M., Wittlin S., Sowunmi A., Brun R., Oduola A. (2011). *In vitro* antiplasmodial activity and toxicity assessment of some plants from Nigerian ethnomedicine. *Pharmaceutical Biology*, 49:9-14.

Addae-Kyereme J., Croft S.L., Kendrick H., Wright C.W. (2001). Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 99-103.

Adil R., Sumit K.V., Shahid M., Haris M.K., Ashraf M.M., Abbas A.M., Shujatullah F. (2013). Lipid Peroxidation In Cerebral Malaria And Role Of Antioxidants. *Journal of Pharmacy*, 3:15-18.

Adjanohoun E.J., Ake Assi L. (1972). Plantes pharmaceutiques de Côte d'Ivoire; Abidjan, Ivory Coast. *Jstor plant science* 4, 240p.

Akala H.M., Eyase F.L., Cheruiyot A.R., Omondi A.A., Ogutu B.R., Waters N.C., Johnson J.D., Polhemus M.E., Schnabel D.C., Walsh D.S. (2011). Anti-malarial drug sensitivity profile of western Kenya *plasmodium falciparum* field isolates determined by a SYBR green I *in vitro* assay, and molecular analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85:34-41.

Akpotuzor J.O., Udoh A.E, Etukudo M.H. (2012). Total Antioxidant Status and other Antioxidant Agent Levels in Children with *P. falciparum* Infection in Calabar, Nigeria. *International Journal of Biomedical Laboratory Science*, 1:35-39.

Akunyili D.N. (2000). Anticonvulsant Activity of the Ethanolic extract of *Newbouldia leavis*. 2nd NAAP. Scientific conference, 155-158.

Ancolio C., Azas N., Mahiou V., Di Giorgio C., Keita A., Timon-David P., Balansard G. (2002). Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. *Phytotherapie Research.*, 16:646-649.

Anon (2008). Hopes and fears for malaria. *Bull World Health Organization*, 86: 91-92.

Arbonnier M. (2004). Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones. CIRAD, Margraf Publishers GMBH MNHN, Côte d'Ivoire,194p.

Arbonnier M. (2009). Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, 3eEd., QUAE / MNHN, 504p.

- Aschfalk A., Steingass H., Müller W., Drochner W. (2000).** Acceptance and digestibility of some selected browse feeds with varying tannin content as supplements in sheep nutrition. in West Africa. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 47:523–524.
- Bah S., Diallo D., Dembele S., Paulsen B.S. (2006).** Ethnopharmacological survey of plants used for the treatment of schistosomiasis in Niono District, Mali. *Journal of Ethnopharmacology*, 105:387–399.
- Bainbridge Z., Tomlins K. and Westby A. (1996).** Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of Food Science and Agriculture*, 29: 77-79.
- Banzouzi J.T., Prado R., Menan H., Valentin A., Roumestan C., Mallie M., Pelissier Y., Blache Y. (2004).** Studies on medicinal plants of Ivory Coast: investigation of *Sida acuta* for *in vitro* antiplasmodial activities and identification of an active constituent. *Phytomedicine*, 11: 338–341.
- Basco L.K. (2007).** Field application of *in vitro* assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. WHO, 2007. *Library Cataloguing-in-Publication Data*.
- Beaune D., Bretagnolle F., Bollache L., Hohmann G., Surbeck M., Bourson C., Fruth B. (2013).** The Bonobo–*Dialium* Positive Interactions: Seed Dispersal Mutualism. *American Journal of Primatology*, 75:394-403.
- Becker B. (1993).** Vers la fonction physiologique de l'AU. *Free Radical Biology and Medicine*, 14:615-31.
- Becker K., Tilley L., Vennerstrom J.L., Roberts D., Rogerson S., Ginsburg H. (2004).** Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, 34:163-189.
- Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., Ehilé E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*, 4: 217-225.
- Benoit F., Valentin A., Pelissier Y., Diafouka F., Marion C., Kone-Bamba D., Kone M., Mallie M., Yapo A., Bastide J.M. (1996).** *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54:67–71.

- Benoit-Vical F., Valentin A., Cournac V., Pelissier Y., Mallie M., Bastide J.M. (1998).** In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 61:173–178.
- Berlette B.S., Stadtman E.R. (1997).** Protein oxidation in aging disease and oxidative stress. *The journal of biological chemistry*, 272:20313-20316.
- Bero J., Frederich M., Quetin-Leclercq J. (2009).** Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61:1401-1433.
- Bero J., Quetin-Leclercq J. (2011).** Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria. *Planta Medica*, 77:631–640.
- Betti J.L. (1998).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales de la réserve de faune du Dja : les plantes indiquées en thérapie traditionnelle comme anthelminthiques. *Nature et Faune*, 14:32-48.
- Bhat P.G., Surolia N. (2001).** In vitro anti-malarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:304-308.
- Bidie A.P., Ndjoko K., Attioua K.B., Zirihi G.N., N'guessan J.D., Djaman A.J., Kurt H. (2010).** Bio-guided Isolation of Antioxidant Compounds from *Chrysophyllum perpulchrum*, a Plant Used in the Ivory Coast Pharmacopeia. *Molecules*, 15:6386-6398.
- Bidie A.P., N'guessan B.B., Yapo F.A., N'guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8:1-11.
- Blanc B., Weniger B., Nicolas J.P. (2008).** Réflexions autour de la culture d'*Artemisia annua* et de la production d'artémisinine. *Ethnopharmacologia*, 41:82-87.
- Bloland P., Ringwald P., Snow R.W. (2004).** Evaluation et surveillance de l'efficacité des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué. Genève: OMS, 67p
- Bloor S.J. (2001).** Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods in Enzymology*, 335:3–14.
- Bolou G.E.K, Attioua B., N'guessan A.C., Coulibaly A., N'guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* Planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80:772-790.

Bouquet A., Debray M. (1974). Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire, *Imprimerie Louis Jean*, Paris (France), 232p.

Bray P.G., Martin R.E., Tilley L., Ward S.A., Kirk K., Fidock D.A. (2005). Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Molecular Microbiology*, 56:323-333.

Bray P.G., Mungthin M., Ridley R.G., Ward S.A. (1998). Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Molecular Pharmacology*, 54:170-190.

Breman J.G., Alilio M.S., Mils A. (2004). The intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71:1-15.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 915p.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition Lavoisier, 1288p.

Cailean C., Vinesh J.M., Neil R.C., Olwen M.G., Pamisha P., Motlalepula G.M., Niresh B., Peter J.S., Peter I.F. (2004). *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92:177-191.

Carter V., Nacer A.M., Underhill A., Sinden R.E., Hurd H. (2007). Minimum requirements for ookinete to oocyst transformation in *plasmodium*. *International Journal of Parasitology*, 37:1221-1232.

Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10:178-182.

Chiung-Sheue C.L.K., Yang S.L., Roberts M.F., Elford B.C., Phillipson J.D. (1992). Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*, 11:637-40.

Clarke S.E., Rowley J., Bagh C., Walraven G. E., Lindsay S.W. (2003). Home treatment of malaria in children rural Gambia is uncommon. *Tropical Medicine and International Health*, 8: 884-894.

Cox F.E.G. (1991). Systematics of parasitic protozoa. In: Kreier JP, In: Baker JR (Eds.). Parasitic Protozoa, 2nd Edition, Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, 55-80pp.

- Cox-Singh J., Singh B. (2008).** Knowlesis malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends parasitology*, 24:406-410.
- D'Alessandro U., Hastings I.M. (2000).** The rise and spread of drug resistant malaria. *Parasitology Today*, 16:340-347.
- Dalziel J.M. (1937).** The Useful Plants of West Tropical Africa. The Crown Agents for the Colonies, London, 612p.
- Dalziel J.M. (1973).** *Ebenaceae*, In: The useful plants of wet tropical Africa. *Crown agents of Overseas Government*, London, 1007p.
- Debacker M.J. (2000).** Paludisme: Historique, mythes, croyances et idées reçues. These de doctorat en medecine à Creteil (Paris Xii), 83p.
- De Donno A., Grassia T., Idolo A., Guido M., Papadia P., Caccioppola A., Villanova L., Merendino A., Bagordoa F., Francesco P.F. (2012).** First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106:696–700.
- Delmas-Beauvieux M.C., Peuchant E., Dumon M.F., Receveur M.C., Le Bras M., Clerc M. (1995).** Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clinical biochemistry*, 28:163-169.
- Desjardins R.E., Canfield C.J., Haynes J.D., Chulay J.D. (1979).** Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16: 710-718.
- Diaby B., Kroa E., Niare A., Coulibaly D., Traore Y., Giani S., Coulibaly A., Niare B., Guindo A., Keita M.T., Sylla A.O., Sanogo R., Doumbo O.K. (2011).** Connaissances, attitudes et pratiques des tradipraticiens de la santé de la ville d'Abidjan sur le paludisme. *Mali médical*, Tome XXVI, N°3, P1-12.
- Dijoux-Franca M.G., NOUNGOUÉ Tchamo D., Cherel B., Cussac M., Tsamo E., Mariotte A.M. (2001).** New dihydrophenanthrene and phenyldihydroisocoumarin constituents of *Trema orientalis*. *Journal of Natural Product*, 64:832-835.
- Dimo T., Ngueguim F.T., Kamtchouing P., Dongo E., Tan P.V. (2006).** Glucose lowering efficacy of the aqueous stem bark extract of *Trema orientalis* (Linn) Blume in normal and streptozotocin diabetic rats. *Pharmazie*, 61:233-236.

- Djaman A.J. (2003).** Évaluation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à différents antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine, quinine) et profil génétique des isolats correspondants. Thèse de doctorat en parasitologie de l'université Paris-XII, 136p.
- Djibo A., Souna-Adamou A., Brah Bouzou S. (2000).** Blackwater fever in adults with sickle cell anemia. Two fatal cases. *Medecine Tropicale*, 60:156-168.
- Djossou F., Receveier M.C, Peichan E., Monlunie E.; Clerc M., Longy-Boursier M., Le Bras M. (1996).** Stress oxydant et paludisme : A propos de Stress de 24 observations de paludisme à *Plasmodium falciparum*. *Bulletin de la. Société de Pathologie Exotique*, 89:17-23.
- Dondorp A., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A.P., Tarning J., Lwin K.M., Ariey F., Hanpithakpong W., Lee S.J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S.S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N.P., Lindegardh N., Socheat D., White N.J. (2009).** Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, 361:455-467.
- Dos Santos J.R., Fleurentin J. (1990).** L'ethnopharmacologie : une approche pluridisciplinaire. Actes du 1er colloque européen d'ethnopharmacologie. Metz 22-25 mars 1990, 26-39pp.
- Dujardin-Beaumetz M.M., Egasse E. (1889).** Les plantes médicinales indigènes et exotiques – Leurs usages thérapeutiques, pharmaceutiques et industriels. Ed. Octave Doin, Paris, France, 845p.
- Elfawal M.A., Towler M.J., Reich N.G., Golenbock D., Weathers P.J., Rich S.M. (2012).** Dried Whole Plant *Artemisia annua* as an Antimalarial Therapy. *Plos One*, 7:1-7.
- Enitome E.B., Sanni U., Zuleikha A.M.N. (2010).** In vitro determination of the mechanism of the uterine stimulatory effect of *Newbouldia laevis*. *Pharmaceutical Biology*; 48: 808–815.
- Erel O., Kocyigit A., Avci S., Aktepe N., Bulut V. (1997).** Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical biochemistry*, 30:631-639.
- Etou O.A.W. (2004).** Evaluation des effets cardiaques de trois plantes médicinales congolaises: *Boerhaavia diffusa* Linn, *Trema guineensis* Schum. & Thonn, *Lippia multiflora* Moldenke, sur le coeur de Crapaud. Mémoire de DEA, Brazzaville, 47p.
- Eze U.A., Bello S.O., Etuk E.U., Ameh G.L., Ugwah O.M., Ugwah-Oguejiofor C.J. (2013).** Phytochemical and preliminary toxicology studies of aqueous leave extract of *Leucas martinicensis* in wistar rats. *International Journal of. Medicine and Plants Research*, 2:166-169.

- Ferreira J.F.S., Luthria D.L., Sasaki T., Heyerick A. (2010).** Flavonoids from *Artemisia annua* as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15:3135-3170.
- Fidock D.A., Eastman R. T., Ward S.A., Meshnick S.R. (2008).** Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends parasitology*, 24: 537-44.
- Fleurentin J. (2012).** L'ethnopharmacologie au service de la thérapeutique : sources et méthodes, *Hegel*, 2:12-18.
- Fleuriet A. (1982).** Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance, de la maturation et de la réaction aux blessures du fruit de la tomate " cerise " (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*), Thèse d'Etat, Université des sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, 269p.
- Fleurentin J., Pelt J.M., Mazars G. (2002).** Des sources du savoir aux médicaments du futur. Société française d'ethnopharmacologie, Institut européen d'écologie, Société européenne d'ethnopharmacologie. IRD Editions, 468p.
- Foote S.J., Kyle D.E., Martin R.K., Oduola A.M.J., Forsyth K., Kemp D.J., Cowman A.F. (1990).** Several alleles of the multidrug- resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 345:255-258.
- Galinski M.R., Barnwell J.W. (2009).** Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitology*, 25:200-204.
- Garait B., Couturier K., Servais S., Letexier D., Perrin D., Batandier C., Ronanet J.L., Sibille B., Rey B., Leverve X., Favier R. (2005).** Fat intake reverses. The beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production. *Free Radical Biology and medicine*, 39:1249-1261.
- Garcia L.S. (2010).** Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine.*, 30: 93-129.
- Garon D., Chosson E., Rioult J.P., Eldin de Pecoulas P., Brasseur P., Vérité P. (2007).** Poisoning by *Cnestis ferruginea* in Casamance (Senegal): An etiological approach. *Toxicon*, 50:189-195.
- Gill L.S. (1992).** Ethnomedical uses of plants in Nigeria. Benin, Nigeria: *Uniben Press*, 77p.
- Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolique*, 11:115-200 .

- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. (1998).** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Clinical Microbiology Reviews*, 46:1887-1892.
- Halliwell B. (1994).** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 253-265.
- Halliwell B. et Gutteridge J.M.C. (2007).** Radicaux libres en biologie et en médecine. Oxford university press, Oxford, UK, 851p
- Han X., Shen T., Lou H. (2007).** Dietary Polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Science*, 950-988.
- Hans C.A., Steven D.B., Rick M.F. (2009).** Antioxidant therapy: Reducing malaria severity? *Crit Care Medecine*, 37:758-760.
- Hemmer C.J., Lehr H.A., Westphol K., Unverrich M., Kratzius M.,Reisinger E.C. (2005).** Plasmodium falciparum Malaria: réduction of endothélial cell apoptosis *in vitro*. *Infection Immunity*, 73:1764-1770.
- Huang L., Dai T, Xuan Y, Tegos G. P., Hamblin M. R. (2011).** Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:3432-3438.
- Inngjerdingen, K., Nergard, C.S., Diallo, D., Mounkoro, P.P., Paulsen, B.S. (2004).** An Ethnopharmacological survey of plants used for wounds healing in dogoland, Mali. *West Africa. Journal of Ethnopharmacology*, 92: 233-244.
- Ishola I.O., Akindele A.J., Adeyemi O.O. (2011).** Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC (Connaraceae) methanolic root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 135:55–62.
- Ishola I.O., Chatterjee M., Santoshkumar T., Tadigopulla N., Olufunmilayo O.A., Palit G., Shukla R. (2012).** Antidepressant and anxiolytic effects of amentoflavone isolated from *Cnestis ferruginea* in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103:322-331.
- Ishola I. O., Chaturvedi J. P., Rai S., Rajasekar N., Adeyemi O. O., Shukla R., Narender T. (2013).** Evaluation of amentoflavone isolated from *Cnestis ferruginea* Vahl exDC (Connaraceae) on production of inflammatory mediators in LPS stimulated rat astrocytomacelline (C6) and THP-1cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 146: 440-448.

Iwu M.M. (1994). African medicinal plants in the search for new drugs based on ethnobotanical leads", Prance, G.T.& Marsh, J. (Eds.), *Ethnobotany and the Search for New Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, Wiley, Chichester, 116-129pp.

Iwu M.M. (2000). *Handbook of African Medicinal Plants*. CRC Press, Inc. London 19p.

Izumiyama S., Omura M., Takasaki T., Ohmae H., Asahi H. (2009). *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Experimental Parasitology*, 121:144-150.

Jambou R., Legrand E., Niang M., Khim N., Lim P., Volney B., Ekala M. T., Bouchier C., Esterre P., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O. (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, 366:1960-63.

Jahan M.S., Rubaiyat A., Sabina R. (2007). Evaluation of cooking processes for *Trema orientalis* pulping. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 66:853-859.

Jansen F.H., Soomro, Shahid A. (2007). Chemical Instability Determines the Biological Action of the Artemisinins. *Current Medecine Chemistry*, 14:3243-3259.

Jansen O., Tits M., Angenot L., Nicolas J.P., De Mol P., Nikiema J.B., Frédéric M. (2012). Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound. *Malaria Journal*, 11:1-9.

Johnson D.J., Fidock D.A., Mungthin M., Lakshmanan V., Sidhu A.B., Bray P.G., Ward S.A. (2004). Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Molecular Cell*, 15: 867-877.

Johnson J.D., Dennull R.A., Gerena L., Lopez-Sanchez M., Roncal N.E., Waters N.C. (2007). Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:1926-1933.

Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A., Plan inić M., Tomas S., 2010

Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*, 28:206-212.

Jongkind C.C.H., Lemmens R.H.M.J. (1989). The Connaraceae: a taxonomic study with special emphasis on Africa. *Agric. University Wageningen Papers* 89, 1-403pp.

- Jongwutiwes S., Putaporntip C., Iwasaki T., Sata T., Kanbara H. (2004).** Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emergence Infectious Diseases*, 10: 2211-2213.
- Jorge F.S.F., Devanand L.L., Tomikazu S., Arne H. (2010).** Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*, 15:3135-3170.
- Joy D.A., Feng X., Mu J., Furuya T., Chotivanich K., Krettli A.U., Ho M., Wang A., White N.J., Suh E., Beerli P., Su X.Z. (2003).** Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 300:318-321.
- Kamanzi A. K., Schmid C., Brun R., Kone M.W., Traore D. (2004).** Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology*, 90:221-227.
- Kaou A.M., Mahiou-Leddé V., Hutter S., Aïnouddine S., Hassani S., Yahaya I., Azas N., Ollivier E. (2008).** Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 116:74-83.
- Karou D., Dicko M.H., Sanon S., Simpore J., Traore A.S. (2003).** Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. f. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 291–294.
- Kerharo J. et Bouquet A. (1950).** Plante medecinale et toxique de Côte d'Ivoire et Haute-Volta, mission d'étude de la pharmacopée indigène en AOF. *Edition Vigot frère*, Paris, 300p.
- Kerharo J., Adam J.G. (1974).** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, *Vigot frères*, Paris, 1007p
- Khandelwal V., Udawat H., Kumhar M.R., Goyal R.K. (2001).** Blackwater fever treated with artemether. *Journal of the Association of Physicians of India*, 49:1191-1192.
- Kipré G. R., Guédé-Guina F., Grellier P., Djaman A. J. (2009).** Activite antiplasmodiale de *Olax Subscorpioidea* Oliv. et *Morinda Morindoides* Bak. Milne-Redh deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. *Médecine d'Afrique Noire*, 56:580-584
- Kirira P.G., Rukunga G.M., Wanyonyi A.W., Muregi F.M., Gathirwa J.W., Muthaura C.N., Omar S.A., Tolo F., Mungai G.M., Ndiege I.O. (2006).** Anti-plasmodial activity and toxicity of extracts of plants used in traditional malaria therapy in Meru and Kilifi Districts of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 106:403-407.

- Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., De Groot A., Evstatieva L.N. (2002).** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- Kossah R., Nsabimana C., Zhang H., Chen W. (2010).** Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, 4:146-153.
- Kuete V., Eyong K.O., Folefoc G.N., Beng V.P., Hussain H., Krohn K., Nkengfack A.E. (2007).** Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie*, 62:552-556.
- Kumar G.S., Nayaka H., Dharmesh S.M. & Salimath P.V. (2006).** Free and bound phenolic antioxidant in amla (*Emblic officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 446-452
- Lamb T.J., Brown D.E., Potocnik A.J., Langhorne J. (2006).** Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8:1-22.
- Laurencin M., Amor M., Fleury Y., Baudy-Floc'h M.I. (2012).** De Novo Cyclic Pseudopeptides Containing Aza- β -amino Acids Exhibiting Antimicrobial Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 10885-10895.
- Le Bras J. (1999).** Mechanism and dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 92: 236-241.
- Le K, Chiu F. and Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353-363.
- Le Nagard H, Vincent C, Mentre F, Le Bras J. (2011).** Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 104:10-8.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stoker P., Durand P., Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La presse médicale*, 30:1076-1081.
- Lenta B.N., Ngouela S., Boyom F.F., Tantangmo F., FeuyaTchouya G.R., Tsamo E.J., Rosenthal P.J., Connolly J.D. (2007).** Antiplasmodial activity of some constituents of the root

bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55:464-467.

Letouzey R. (1968). “Flore du Cameroun. Spermaphytes. Ulmaceae”. Muséum National d’histoire naturelle, Paris 5è, 48-55pp.

Levine N.D. (1988). Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *Journal of Protozoology*, 35:518-520.

Lewis W.H., Manony P.F.E. (1977). Medical Botany: Plants Affecting Man’s Health. John Wiley and Sons. New York, USA, 240p.

Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F., Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102:771-776.

Luersen K., Walter R.D., Muller S., (2000): *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *The Biochemical journal*, 2:545-552.

MacKinnon S., Durst T., Arnason J.T., Angerhofer C., Pezzuto J., Sanchez- Vindas P.E., Poveda L.J., Gbeassor M. (1997). Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. *Journal of Natural Products*, 60: 336–341.

Madureira M.C., Martins A.P., Gomes M., Paiva J., Cunha A.P., Rosario V. (2002). Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tome and Principe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 81:23-29.

Makler M.T., Ries J.M., Williams J.A., Bancroft J.E., Piper R.C., Gibbins B.L., Hinrichs D.J. (1993). Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:739-741.

Malan C, Notten A. (2005). *Trema orientalis*, South African National Biodiversity Institute Kirstenbosch National Botanical Garden, Avril 2005.

Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77:147-161.

Mathews S.T., Selvam R. (1991). Effect of radical treatment on erythrocyte lipid peroxidation in *Plasmodium vivax*-infected malaria patients. *Biochemistry international*, 25:211-220.

- Mayor A.G., Gomez Olive X., Aponte J.J., Casimiro S., Mabunda S., Dgedge M., Barreto A., Alonso P.L. (2001).** Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr1*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *Journal of Infectious Diseases*, 183:1413-1416.
- Mbatchi S.F., Mbatchi B., Banzouzi J.T., Bansimba T., NsondeNtandou G.F., Ouamba A., Berry J.M., Benoit-Vical F. (2006).** *In vitro* antiplasmodial activity of 18 plants used in Congo Brazzaville traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:168-174.
- Meister A., Anderson M.E. (1983).** Glutathion. *Annual Review of Biochemistry*, 52:711-760.
- Menan H., Banzouzi J.T., Hocquette A., Pelissier Y., Blache Y., Kone M., Mallie M., Assi L.A., Valentin A. (2006).** Antiplasmodial activity and cytotoxicity of plants used in West African traditional medicine for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 105:131-136.
- Menard R. (2005).** Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature*, 43:113-114.
- Mendis K., Sina B. J., Marchesini P., Carter R. (2001).** The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64: 97-106.
- Miyata T., Harakuni T., Sugawa H., Sattabongkot J., Kato A., Tachibana M., Torii M., Tsuboi T., Arakawa T. (2011).** Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. *Vaccine*, 29: 2720-2726.
- Mustofa, Valentin A., Benoit-Vical F., Pélissier Y., Koné-Bamba D., Mallié M. (2000).** Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 73:145-151.
- Muthaura C.N., Rukunga G.M., Chhabra S.C., Omar S.A., Guantai A.N., Gathirwa J.W., Tolo F.M., Mwitari P.G., Keter L.K., Kirira P.G., Kimani C.W., Mungai G.M., Njagi E.N.M. (2007a).** Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 112:545-555.
- Muthaura C.N., Rukunga G.M., Chhabra S.C., Mungai G.M., Njagi E.N. (2007b).** Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 114:377-386.
- N'Guessan J. D., Bidié A. P., Lenta B. N., Weniger B., André P., Guédé-Guina F. (2007).** *In vitro* assays for bioactivity-guided isolation of antisalmonella and antioxidant compounds in *Thonningia sanguinea* flowers. *African Journal of Biotechnology*, 6:1685-1689.

Nemlin J. Et Brunel J. E (1995). Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3e année). Université Nationale de Côte-d'Ivoire. Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie. Laboratoire de Phytologie, 47 p.

Nguyen-Pouplin J. (2007). Plantes antipaludiques du Vietnam étude ethnopharmacologique et chimique. Thèse de doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, 197p.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM, (2008). Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England Journal of Medicine*, 359:2619-2620.

Nozais J.P. (1988). Le paludisme dans le monde méditerranéen. Historique et répartition actuelle. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiale*, 81: 854-60.

Nshaiura N., Kristensen M., Ssali F., Whyte S. (2002). Appropriate treatment of malaria? Use of antimalarials drugs for children's fever in district medical units, drug shops and homes in eastern Uganda. *Tropical.Medecine and International Health*, 7:309-316.

Nzila-Mounda A., Mberu E.K., Sibley C.H., Plowe C.V., Winstanley P.A., Watkins W.M. (1998). Kenyan Plasmodiumfalciparum field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity in vitro and pointmutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42:164-169.

Okafor J., Ham R. (1999). Identification, utilisation et conservation des plantes médicinales dans le sud-est du Nigeria. *Thèmes de la biodiversité africaine*, 3: 1-8.

Okpekon T., Yolou S., Gleye C., Roblot F., Loiseau P., Bories C., Grellier P., Frappier F., Laurens A., Hocquemiller R. (2004). Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 90:91–97.

Okwu D.E., Josiah C. (2006). Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5:357-361.

Olasehinde G, Olusola O., Obashola F., Singh R., Adesola A. (2012). *In-vitro* studies on the sensitivity pattern of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs and local herbal extracts. *Malaria Journal*, 11(Suppl 1):P72.

Olugbade T.A., Oluwadiya J.O., Yisak W.A. (1982). Chemical constituents of *Cnestis ferruginea* DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 6:365-367.

OMS (1973). Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. Série de rapports techniques, n°529, Genève, 1973, 128p.

OMS (1994). Stratégies d'utilisation des antipaludiques : besoins de données, traitement du paludisme non compliqué et prise en charge pendant la grossesse, 72p.

OMS (1996). Evaluation de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques pour le traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué dans les régions à transmission élevée, 33p.

OMS (2002) Surveillance de la résistance aux antipaludiques, rapport d'une consultation de l'OMS, Genève, Suisse, 35p.

OMS (2003). The quality of antimalarials: a study in selected african countries, Genève: OMS, 54p.

OMS, UNICEF (2005). World Malaria Report 2005. Ed. World Health Organization and UNICEF, 326 p.

OMS (2011). Rapport sur le paludisme dans le monde ; résumé et points essentiels, p1-2.

OMS (2012). World Malaria Report 2012.

OMS (2013). World Malaria Report 2013.

O'Neill M.J., Bray D.H., Boardmann P., Phillipson J.D., Warhurst D.C. (1985). Plants as sources of antimalarial drugs, Part 1. In vitro test method for the evaluation of of crude extract of plants, *Planta medica*, 51:394-398.

Onigbinde A.O., Iyawe H.O.T., Aina O.O. (2005). Effect of Chloroquine and Ascorbic Acid Interaction on the Oxidative Stress Status of *Plasmodium berghei* Infested Mice. *International Journal of Pharmacology*, 2:1-4.

Orwa C., Mutua A., Kindt R. , Jamnadass R., Anthony S. (2009) «*Trema orientalis*», Agroforestry Database: a tree reference and selection guide, version 4.0, World Agroforestry Centre,.

Perry L.M. (1980). Medicinal plants of East and South East Asia: attributed properties and uses. MIT Press Ed., South East Asia, 632p.

Perveen F., Zaib S., Irshad S., Hassan M. (2012). Antioxidant and DNA protection activities of the hill toon, *Cedrela serrata* (Royle) leaves extract and its fractions, *Journal of Natural Products*. 5:207-213.

- Phillipson J.D., Wright C.W. (1991).** Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *Journal of Ethnopharmacology*, 32:155-165.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defense. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16:233-239.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999).** Cancerologie : Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : Importance en matière de prévention, *Medi Sphère*, N°95, 4p.
- Pisutthanan N., Liawruangrath S., Bremner J. B. and Liawruangrath B. (2005).** Chemical Constituents and Biological Activities of *Chromolaena odorata*. *Chiang Mai Journal of Science*, 32:139-148.
- Portet B. (2007).** Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 221p.
- Postma N.S., Mommers E.C., Eling W.M., Zuidema J. (1996).** Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharmacy World and Sciences*, 18:121-129.
- Pradines B. et Parzy D. (2002).** In vitro reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* with Dihydroethanoanthracene derivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66:661-666.
- Pradines B., Dormoia J., Briolanta S., Bogreua H., Rogiera C. (2010).** La résistance aux antipaludiques, *Revue Francophone des Laboratoires*, 422:51-61.
- Reynolds M.G., Roos D.S. (1998).** A biochemical and genetic model for parasite resistance to antifolates - *Toxoplasma gondii* provides insights into pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biology and Chemistry*, 273:3461-3469.
- Rodrigues, E., (2007).** Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology*, 111:295-302.
- Rolfe D.F., Brand M.D. (1997).** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews*, 77:731-758.
- Rosenthal P. (2001).** Antimalarial Chemotherapy: mechanisms of resistance, action and new direction in drug discovery. Totowa, New Jersey: Editions Humana Press, 400 p.

- Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumou C., Bougoudogo F. (2006).** Activite antibacterienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisees dans le traitement des infections urinaires et la cystite au mali. *Mali Médical*, Tome XXI N° 1.
- Schwarzer E., Kuhn H., Valente E., Arese P. (2003).** Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood*, 101:722-728.
- Scott M.P. (2007).** Developmental genomics of the most dangerous animal. *PNAS*, 104:11865-11866.
- Senesse S. (1995).** Polymorphisme pollinique du genre tropical *Dialium* L. (Caesalpinioideae, Legumineuse) implications biogéographiques et évolutives en Afrique. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 84:347-364.
- Singh B., Sung L.K., Matusop A., Radharkrishnan A., Shamsul S.S.G., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D. (2004).** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, 363:1017-1024.
- Smilkstein M., Sriwilaijaroen N., Kelly J.X., Wilairat P., Riscoe M. (2004).** Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:1803-1806.
- Soh P. N., Benoit-Vical F. (2007).** Are West African plants a source of future antimalarial drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 114:130-140.
- Somanjana K., Snigdha P., Ananya C., Debal R., Anirban R., Krishnendu A., (2013).** Evaluation of antioxidative activity of ethanolic extract from *Russula delica*: An *in vitro* study. *Journal of Chemistry and Pharmaceutical Research*, 5:100-107.
- Somsak V., Srichairatanakool S., Yuthavong Y., Kamchonwongpaisan S., Uthaipibull C. (2012).** Flow cytometric enumeration of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells stained with SYBR Green I. *Acta Tropica*, 122:113-118.
- Soro D., Kone M. W., Kamanzi K. (2010).** Evaluation des Activités Antimicrobiennes et Anti-Radicaux Libres de Quelques Taxons Bioactifs de Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 40:307-317.
- Steyaert, R.-L. (1952).** *Cassieae*, In Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi, *Brussels*, 3:531-544.

- Ta T.H., Hisam S., Lanza M., Jiram A.I., Ismail N., Rubio J.M. (2014).** First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*, *Malaria Journal*, 13:1-7.
- Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarikurkcu C., Ozturk M. and Ulubelen A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103:816-822.
- Tra-Bi F. H. (1997).** Utilisation des plantes par l'homme, dans les forets classées du Haut-Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3ème Cycle, Université de Cocody, Abidjan, 215 p.
- Trager W., Jensen J. B. (1976).** Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675.
- Tran Q.L., Tezuka Y., Ueda J., Nguyen N. T., Maruyama Y., Begum K., Kim H.S., Wataya Y., Tran Q.K., Kadota S. (2003).** *In vitro* antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 86:249-252.
- Traore-Keita F., Gasquet M., Di Giorgio C., Ollivier E., Delmas F., Keita A., Doumbo O., Balansard G., Timon-David P. (2000).** Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. *Phytotherapy Research*, 14:45-47.
- Triglia T., Menting J.G., Wilson C., Cowman A.F. (1997).** Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America*, 94:13944-13949.
- Triglia T., Wang P., Sims P.F. Hyde J.E., Cowman A.F. (1998).** Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *Embo Journal*, 17: 3807-3815.
- Tseng A. (1991).** Chemoprevention of tumors in MTV-H ras transgenic mice with coumarins. *American Association for Cancer Research*, 32:2257.
- Tucker S. C. (1998).** Floral ontogeny in legume genera *Petalostylis*, *Labichea*, and *Dialium* (Caesalpinioideae: Cassieae), a series in floral reduction. *American Journal of Botany*, 85:184–208.
- UNICEF (2007).** Le paludisme & les enfants : Rapport d'activité sur la couverture des interventions, Genève, 69p.

- Usman H. and Osuji J. C. U. (2007).** Phytochemical and *in vitro* antimicrobial assay of the leaf extract of *Newbouldia laevis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative*, 4:476-480.
- Valdés A.F.C., Martínez J.M., Lizama R.S., Gaitén Y.G., Rodríguez D.A., Payrol J.A. (2010).** *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected Cuban medicinal plants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52:197-201.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M. and Telser J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.
- Vaucel M., Feron Y. (1968).** Introduction dans la langue française du mot "paludisme". *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales*, 61:585-596.
- Vonthron-Senecheau C., Weniger B., Ouattara M., Bi F.T., Kamenan A., Lobstein A., Brun R., Anton R. (2003).** *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:221–225.
- Wagner H., Ulrich-Merzenich G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Journal of Natural Remedies*, 9:121-141.
- Wellems T.E., Plowe C.V. (2001).** Chloroquine-resistant malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 184:770-776.
- White F. (1957).** *Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles*, 27:515-531.
- Woerdenbag H.J., Pras N., Bos R., Visser J.F., Hendriks H., Malingré T.M. (1991).** Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 2: 215–219.
- Wongsrichanalai C., Meshnick S.R. (2008).** Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emergence Infectious Diseases*, 14:716-719.
- Yang C.M.J., Russell J.B. (1992).** Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3954-3958.
- Yemoa A.L., Gbenou J.D., Johnson R.C., Djego J.G.4, Zinsou C., Moudachirou M., Quetin-Leclercq J., Bigot A., Portaels F. (2008).** Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin *Ethnopharmacologia*, 42:48-55.

Yildirim A., Mavi A., Kara A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 411-420.

Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y. (2000). Freed radicals in chemistry, Biology and Medicine Edition Oica international, London, 580p.

Yilmaz Y., 2006. Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17:64-71.

Zihiri N.G., N'Guessan K., Etien T.D., Grellier P. (2010). Ethnopharmacological study of plants used to treat malaria in traditional medicine, by Bete populations of Issia (Côte d'Ivoire). *Journal Pharmacology Science and Research*, 2:216-227.

Zirihi G. N., N'guessan K., Etien D.T., Seri Kouassi B. P. (2009). Evaluation in vitro of antiplasmodial activity of ethanolic extracts of *Funtumia elastica*, *Rauvolfia vomitoria* and *Zanthoxylum gillettii* on *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 5:406-413.

Zirihi G.N., Kra A.K.M., Guede-Guina F. (2003). Évaluation de l'activité antifongique *Microglossa Pirifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. *Revue de Médecine et Pharmacie Africaine*, 17:11-18.

Zirihi G.N., Mambu L., Guede-Guina F., Bodo B., Grellier P. (2005). In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 98:281-285.

Annexe I: Fiche d'enquête

FICHE N°

DATE DE L'ENQUETE :

I-Identification du tradithérapeute

Nom (facultatif) :

Téléphone (facultatif) :

Nationalité (facultatif) :

Ethnie :

Localité :

II-Questions

1) Soignez-vous le paludisme? OUI NON

2) Si oui, quelle(s) plante(s) utilisé(es) vous pour soigner le paludisme ?

Nom vernaculaire :

Nom scientifique :

Partie utilisée :

Mode de préparation :

Mode d'administration :

Durée du traitement :

3) Cette plante est-elle associée à d'autres plantes? OUI NON

4) Si oui lesquelles

.....

.....

.....

5) Votre traitement a-t-il des effets indésirables? OUI NON

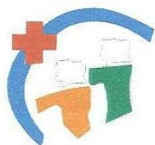
6) Si oui lesquels?

.....

.....

.....

Annexe II : Autorisation du comité national d'éthique et de la recherche



MINISTERE DE LA SANTE
ET DE LA LUTTE CONTRE LE SIDA
BP V 4 ABIDJAN

COMITE NATIONAL D'ETHIQUE
ET DE LA RECHERCHE (CNER)
LE PRESIDENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION-DISCIPLINE-TRAVAIL

Abidjan, le 7 janvier 2013

N° 03-2013/MSLS/CNER-P

A
Mr TUO Karim
Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Abidjan

Objet : Autorisation de mise en œuvre du projet de recherche intitulé « Phytochimie et activité antipaludique de *Diospyros monbutensis* (Ebenaceae) et *Abrus precatorius* Linn (Fabaceae), plantes médicinales traditionnellement utilisées en Côte d'Ivoire contre le paludisme grave et étude de leur tolérance »

Monsieur,

Nous accusons réception de votre lettre du 15 décembre 2012 dans laquelle vous nous demandez d'autoriser la mise en œuvre du protocole de recherche de votre thèse.

Le Comité National d'Ethique et de Recherche a examiné votre demande d'autorisation de mise en œuvre du projet de recherche de thèse de doctorat cité en objet en comité restreint le 24 décembre 2012.

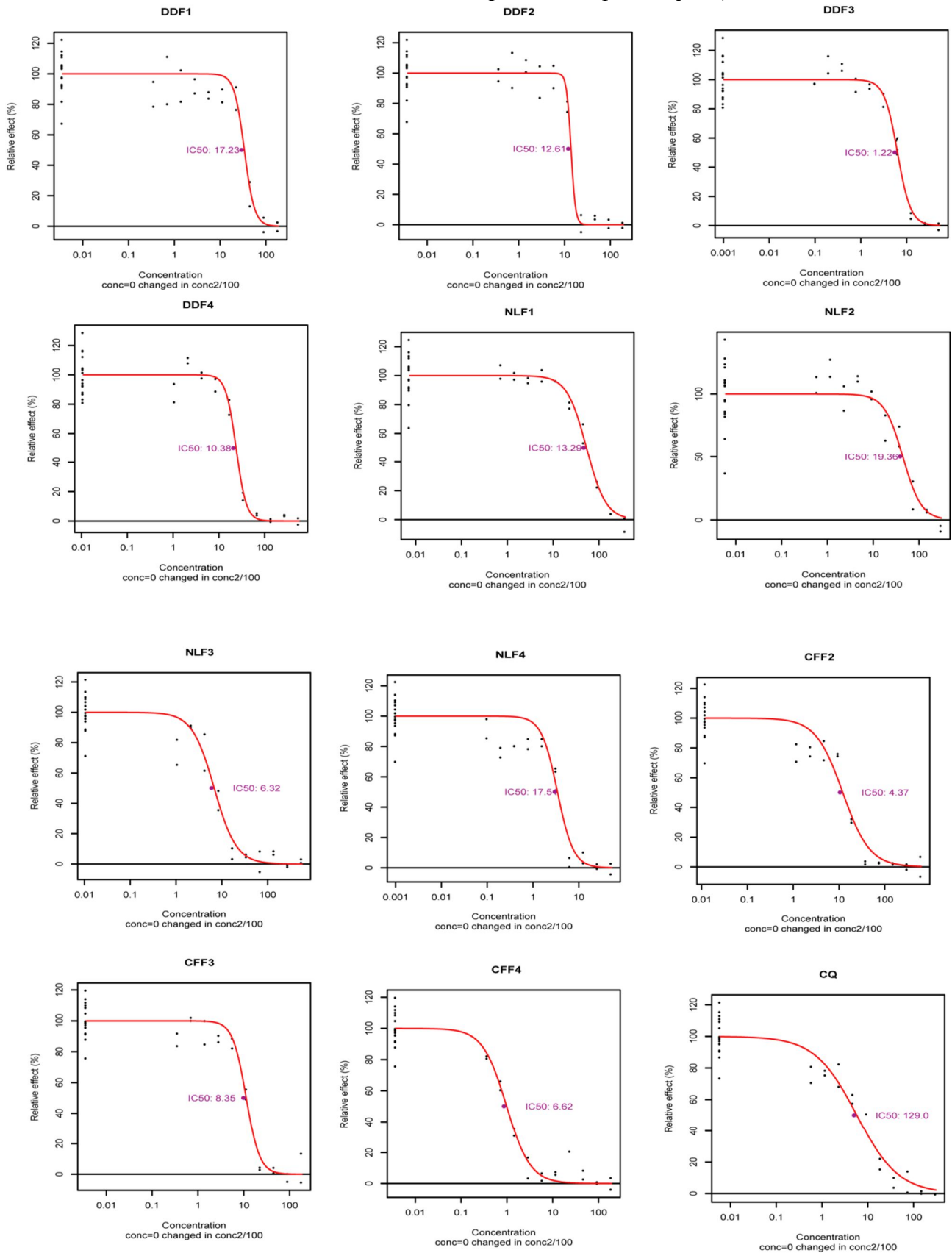
Sous cette perspective, il a émis un avis favorable à l'utilisation de ce protocole. Par conséquent j'en autorise la mise en œuvre dans sa forme soumise au Comité National d'Ethique.

Par ailleurs je vous saurai gré de bien vouloir transmettre au CNER une copie du rapport de cette étude.

En vous souhaitant une bonne réception, je vous prie de recevoir, mes meilleures salutations.

Dr Louis Penali

Annexe III: Exemple de régression non-linéaire obtenue après analyse des données (Ici la souche Dd2 avec les extraits issus des partitions liquide-liquide)



PUBLICATIONS TIREES DE LA THESE

PUBLICATION 1



Phytochemical Screening and Polyphenolic Contents of *Dialium dinklagei* and *Diospyros monbuttensis*, Two Ivorian Medicinal Plants Used to Treat Malaria

**Tuo Karim^{1,2}, Béourou Sylvain^{2*}, Touré André Offianan², Ouattara Karamoko¹,
Silué Kigbafori Dieudonné³, Tano Konan Dominique², Adagba Marius⁴,
Koffi David^{1,2}, Yao Serge Stephane^{1,2}, Djaman Allico Joseph⁵
and Coulibaly Adama¹**

¹Pharmacodynamics Biochemical Laboratory, U.F.R. Biosciences, Felix Houphouet Boigny University, Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Department of Parasitology-Mycology, Malariology Unit, Institut Pasteur in Côte d'Ivoire, 01 Bp 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

³Department of Environment and Health, Swiss Center for Scientific Research in Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

⁴Department Virus Epidemic, Institut Pasteur in Côte d'Ivoire, 01 Bp 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

⁵Department of Medical Biochemistry and fundamental, Toxicology Unit, Institut Pasteur in Côte d'Ivoire, 01 Bp 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author TK designed the study and wrote the protocol. Authors BS and TAO supervised the laboratory protocols and corrected the manuscript.

Authors OK, SKD and TKD corrected the manuscript. Authors YSS, AM and KD performed the statistical analysis and also wrote part of the manuscript. Authors DAJ and CA supervised the study.

All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/JAMPS/2015/13779

Editor(s):

(1) Faiyaz Shakeel, Department of Pharmaceutics, King Saud University, Saudi Arabia.

(2) Dongdong Wang, Department of Pharmacognosy, West China College of Pharmacy, Sichuan University, China.

Reviewers:

(1) Alli Lukman Adewale, Medical Biochemistry, College of Health Sciences, University of Abuja, Nigeria.

(2) Norma Almaraz Abarca, Instituto Politécnico Nacional, México.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=888&id=36&aid=7803>

Original Research Article

Received 3rd September 2014

Accepted 17th November 2014

Published 16th January 2015

ABSTRACT

Introduction: Malaria is a deadly parasitic infection in its severe form. It is caused by an endoparasite protozoan transmitted by a mosquito vector. Despite considerable efforts to eradicate it, this endemic disease remains a public health problem because of its high frequency, severity and the consequences it generates. Furthermore, the existing treatments are increasingly ineffective; it is therefore urgent to find new anti-malarial drugs.

Objective: From the phytochemical screening and the determination of the polyphenolic content of *Dialium dinklagei* and *Diospyros monbuttensis* used in traditional medicine in Côte d'Ivoire to treat malaria, we identified families of chemical compounds that can guide us towards pharmacological studies. These studies allow us to identify new molecules which could be a possible alternative antimalarial reference used today because of their effectiveness in treating malaria.

Materials and Methods: From *Dialium dinklagei* and *Diospyros monbuttensis*, we obtained extracts decoction and hexane extracts, methanolic and aqueous extraction after three solvents of increasing polarity (n-hexane, methanol, water), respectively. The crude extracts obtained were tested for chemical identification of groups that may be the basis of the expected therapeutic effects. Moreover, the decoction and methanol extracts were used to determine the polyphenolic compounds.

Results: The results vary from one plant species to another and from one sample to another. Abundant presence of alkaloids in all samples and an absence of steroids in other extract except decoction extract of *Diospyros monbuttensis* were observed. Therefore, the other chemical groups are present in all plants in varying proportions but depending on the mode of extraction. A higher content of phenols and tannins in *Dialium dinklagei* over *Diospyros monbuttensis* was observed. However, the content of flavonoids of *Dialium dinklagei* is relatively lower compared to that observed in *Diospyros monbuttensis*.

Conclusion: The overall results of the phytochemical screening and polyphenolic content would partly explain the traditional healers' infatuation to these plants as antimalarials.

Keywords: Malaria; natural substances; chemical groups; *Dialium dinklagei*; *Diospyros monbuttensis*.

1. INTRODUCTION

The high population growth, the growing impoverishment and the lack of medical facilities are the major problems faced by the most of African populations [1]. Owing to this situation, they do not always have access to imported pharmaceuticals. According to Sandhya et al. [2] and Séguéna et al. [3], 80% of the world population relies on traditional medicine for their primary health care that requires the use of plant extract. Indeed, the use of traditional medicine is justified by the treatment of many infections against which the plants are used as effective as drugs imported by Africa [3-5]. Secondary metabolites present in these plants are not new to the medical properties that are attributed to them. The search for these secondary metabolites could be the first step towards the determination of active ingredients [6,7]. That is the reason why we have undertaken the phytochemical study of plants used in the Ivorian traditional medicine against malaria. In this context, *Diospyros monbuttensis* Gürk (Ebenaceae) and *Dialium dinklagei* (Caesalpinaceae) widely used by traditional

healers but little studied for their antimalarial activity have been selected.

Diospyros monbuttensis leaves have been reported to possess antibacterial and antimalarial properties [8-10]. The antimicrobial activities of the plant leaves extract was due to the presence of tannins [11,12]. Other constituents that have been reported include saponins, anthraquinones, cardiac glycosides and alkaloids [8]. *Dialium dinklagei* is a tree of Caesalpinaceae family with trunk cylindrical right. The sheets made up have an acid taste, the flowers are of color yellow and the bark is very thick [13]. Not previously reported from Ivory Coast. This species is distributed in West and Central Africa and has been reported from Angola, Cameroon, D.R. Congo, Gabon, Ghana, Guinea, Ivory Coast, Liberia, Nigeria and Sierra Leone [14].

The aim of this work was to investigate the correlation between the active ingredients present in these medicinal plants and their therapeutic effects, namely their use as antimalarial medicines.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

The plant material consisted of leaves of *Diospyros monbuttensis* and *Dialium dinklagei*. These are two plant species, which have been little studied for their antiplasmodial activity, especially *Dialium dinklagei*. The leaves of *Diospyros monbuttensis* were collected in the month of January 2013 from Talahini-Sokoura in the Department of Sandegué (North-eastern Côte d'Ivoire). Those of *Dialium dinklagei* were collected in March 2013 in the District of Abidjan. Plants were adult and the harvest time was chosen the morning. Plants species were identified by Professor Ake-Assi from the "Centre National de Floristique", University of Felix-Houphouet-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire. They were then dried in sunlight for one week at room temperature before being reduced to a fine powder by using mechanical grinder type IKAMAG. From the powder obtained after spraying the leaves, various crude extracts were prepared.

2.2 Preparation of Crude Extracts

First, from the fine powder obtained, decoctions of each plant were made to be as close as possible to the form of traditional use. Then we made three successive extractions with solvents of increasing polarity, according to the protocol of B kro et al. [15], Zirihy et al. [16] and Beourou et al. [17]. In the following order, we used three solvents of increasing polarity: hexane, methanol and water.

2.3 Decoction

The decoction was obtained by dissolving 20g of fine dry powder in 1L of distilled water. The whole was homogenized and boiled for 30minutes. The preparation was first wrung out in a square of white cloth, and then filtered successively twice on an absorbent cotton and once on a Whatman filter paper 3 mm. Filtrate 1 was thus obtained. The same operation was repeated with the residue by adding 1 liter of distilled water to obtain the filtrate 2. These two filtrates were gathered and evaporated in "Venticel" oven at 55 C. This series of operations led to the extract of decoction.

2.4 Extraction with Hexane

A sample (50 g) of fine dry powder were dissolved in 150 mL of hexane. The whole was vigorously agitated in a blender for 10minutes. The preparation was first wrung out in a square of white cloth, and then filtered successively with an absorbent cotton and filter paper. The first hexane filtrate was thus obtained (hexane filtrate 1). For filtrate 2, the same operation was repeated by addition of 150 mL of hexane on the residue found. This activity was repeated for filtrate 3. These three filtrates were then gathered and evaporated in the "Venticel" oven at 55 C. This operation led to a hexane extract.

2.5 Extraction with Methanol

After extraction with hexane, the residual powder was dried and then extracted with 150 mL of methanol. After 10 minutes of homogenization by stirring in a blender the extract was filtered through a piece of gauze for obtaining the methanolic filtrate 1. The same operation was repeated twice more to obtain the methanolic filtrates 2 and 3. All three filtrates were then pooled and evaporated in an oven "Venticel" at 55 C. This series of operations led to an extract called methanol extract.

2.6 Preparation of the Aqueous Extract

The same operations were repeated on the residual dry powder coming from the ethanolic extraction but using 150 mL of distilled water. We obtained the aqueous extract.

For the following tests, the aqueous and decoction extracts are dissolved in distilled water while the other extracts are dissolved in DMSO.

2.7 Phytochemical Screening

Phytochemical analysis was performed on the basis of tests for coloring characteristics to highlight the major chemical groups. It focused on decoction extracts, hexane, methanol and aqueous extracts of the studied plants. Various chemical groups were identified by reference to the methods described by Nemlin and Brunel [18], B kro et al. [15] and Bruneton [19].

The results have been classified according to: Highly positive: +++; Fairly positive: ++; weakly positive: +; Negative test: -

2.7.1 Saponins (Foam index)

Samples (0.1 g of dry extract) were dissolved in 10 mL of distilled water. The samples were shaken vigorously up and down for 30-45 seconds and then left for 15 minutes. The height of the foam was measured. Persistent foam for more than 1 cm high indicated the presence of saponins.

2.7.2 Steroids: Salkowski test

Five drops of concentrated H₂SO₄ were added to 1 mL of extract, the apparition of a red color indicated the presence of steroids.

2.7.3 Sterols and polyterpenes

Extracts (0.1 g) were dissolved in 1 mL of hot acetic anhydride in a capsule. The resulted solutions were poured and added with 0.5 mL H₂SO₄. A violet coloration that turned in blue, and then in green revealed the presence of sterols and triterpenes.

2.7.4 Alkaloids

Two drops of Bouchard's reagent (reagent of iodine-iodide) were added to 1 mL of each extract. A red-brown precipitate indicated a positive reaction.

2.7.5 Polyphenols

A drop of alcoholic solution of 2% ferric chloride was added to 2 mL of extracts. A blue-blackish to green darkish coloration indicated a positive reaction.

2.7.6 Anthocyanins

Five milliliters of 10% H₂SO₄ was added to 5 mL of 5% extract, and then a base (five drops of 25% NH₄OH) was added. If the coloration is accentuated by acidification and then change into blue-purple in a basic environment, anthocyanins were present.

2.7.7 Leucoanthocyanins

One milliliter of extract was added to 5 mL of hydrochloric alcohol. The preparation was heated in the water-bath for 15 minutes. A cherry red or purplish coloration meant the presence of leucoanthocyanins.

2.7.8 Flavonoid

In a tube containing 3 mL of extract, a few drops of 10% NaOH were added. Appearance of yellow-orange color indicated the presence of flavonoids.

2.7.9 Quinones

An aliquot (0.1 g) of extract was dissolved in 5 mL of diluted HCl (1/5) and heated in a boiling water bath for 30 minutes, and then extracted with 20 mL of CHCl₃ after cooling. To the organic phase was added 0.5 mL of 50% NH₄OH diluted solution. The positivity of the reaction was indicated by a red to violet color.

2.7.10 Cardiotonic glycosides

This reaction is exothermic. It takes place in a glacial environment. To 2 mL of aqueous solution of extract were added 1 mL of glacial acetic acid and then 1 mL of concentrated sulfuric acid. Adding few drops of 2% FeCl₃ gave a green-bluish coloration, which is specific to cardiotonic glycosides.

2.7.11 Coumarins

To 5 mL of extract, 2 mL of hot water were added, and then the solution was shared between two test tubes. In the content, we added 0.5 mL of 25% NH₄OH. Under the UV light (366 nm), an intense fluorescence indicated the presence of coumarins.

2.7.12 Tannins

Two milliliters of water and few drops of 1% ferric chloride were added to 1 mL of extract. The appearance of a blue, blue-black or black coloration indicated the presence of gallic tannins, the green or dark green coloration showed the presence of catechic tannins.

2.8 Determination of Polyphenols

The polyphenol contents were determined for the foliar decoction and methanol extracts of *Diospyros monbuttensis* and *Dialium dinklagei*.

2.9 Determination of Total Phenols

The total phenolic content of plant extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method [20,21]. To 0.5 mL of each plant extract of concentration 100 mg/mL were added 5 mL of

Folin-Ciocalteu reagent diluted 1/10 in distilled water and 4 mL of sodium carbonate (1M). The mixture was incubated at room temperature for 15 minutes. Then, the absorbance was registered at 765nm in a spectrophotometer against a blank. Gallic acid was used to construct a standard curve in order to calculate the phenol contents, which was prepared under the same conditions as above with a solvent mixture of methanol/water (50: 50, V/V) at concentrations ranging from 0 to 200 mg/mL. Experimentations were carried out in triplicate. The total phenolic contents of the extracts were expressed as gallic acid equivalents/g dry extract (mg GAE/g dry extract).

2.10 Determination of Total Flavonoids

The technique used to determine the contents of total flavonoids in the extracts was the colorimetric method of aluminum chloride [22,23]. And 0.5 mL (100 µg/mL) of each plant extract were taken, to which 1.5 mL of methanol, 0.1 mL of 10% aluminum chloride, 0.1 mL of potassium acetate (1 M) and 2.5 mL of distilled water were successively added. After incubation at room temperature for 30 minutes, the optical densities were measured in a spectrophotometer at 415 nm. A methanolic solution of quercetin in concentrations ranging from 0 to 100 µg/mL were used to construct a standard curve in order to calculate the flavonoid contents. Experimentations were carried out in triplicate. The contents of flavonoids were expressed as quercetin equivalents/g dry extract (mg QE/g dry extract).

2.11 Determination of Tannins

The tannin contents were calculated by using the modified vanillin method of Bainbridge et al. [24]. This method is based on the fact that the tannic acid (especially the flavan-3-ol) in the presence of the vanillin reagent (0.1 mg/mL) in an acid medium (sulfuric acid 70% (v/v)) gives a red color whose maximum absorption is 500 nm. The standard solution consists of tannic acid (0.1 mg/mL) prepared in 98% methanol. A range of standard was prepared with a series of 6 tubes where the first represents a blank. In the other 5 tubes are introduced respectively 0.2; 0, 4; 0.6; 0.8; 1 ml of standard solution and complete the volume of each tube with 1 ml of distilled water. The test tube contains 1 ml of extract. To each of them are added 5 ml of vanillin reagent. After 30 minutes of incubation in the dark, the absorbance

was read at 500 nm against a blank (without extract). The tannic acid (1 mg/ml) was used to construct a standard curve in order to calculate the tannin contents. Experimentations were carried out in triplicate. The results were expressed as mg of tannic acid equivalents/g dry extract (mgTAE/g dry extract)

2.12 Statistical Analysis

Graphical representations of data were performed using the Graph Pad Prism 5.0 software (Microsoft, USA). The test results were expressed as mean ± SD. Multiple comparisons and determination of significance level are made by the univariate ANOVA followed by Tukey test. The differences were considered statistically significant at the 0.05 level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Plant Selection and the Output of the Extraction

The investigations were carried out with ethnobotanical approaches among stakeholders of traditional medicine, especially herbal traders operating on the markets of the District of Abidjan. These investigations resulted in the selection of *Diospyros monbuttensis* and *Dialium dinklagei*, widely used by Ivorian traditional pharmacopoeia and very little studied for their antimalarial activity. These species were mainly collected on the basis of indications by literature and information received from healers.

Decoctions produced the highest output (20%), and hexane was the smallest (1%). These results suggest the use of the method of extraction decoction as indicated for the preparation of extracts from these plants base (Figure 1). The very low output obtained with hexane shows that the studied plants contain very little non-polar compounds. This result is similar to the one obtained by Bekro et al. [15] (0, 75%) with *Caesalpinia benthamiana* (Baill.).

3.2 Phytochemical Screening

The results of the phytochemical screening carried out on the extracts of plants referred to malaria are mentioned in the Table 1. Chemical composition variations were found among the different extracts and between the two plant species analyzed.

3.3 *Diospyros monbuttensis*

The leaves contain sterols, polyterpenes, polyphenols, flavonoids, alkaloids, saponins, leucoanthocyanins, tannins, quinones and coumarins. Anthocyanins, cardiac glycosides and steroids are present at very small quantities. These results are different from those of Anie et al. [9], who reported the absence of tannins in roots and stem bark. They were similar to those of Bouquet and Debray [25] which showed the presence of quinones, tannins, sterols and saponins in the leaves and differ from ours by the absence of flavonoids and alkaloids. Previous studies [8] reported the presence of saponins, anthraquinones, cardiac glycosides and alkaloids. According Bouquet and Debray [25], this plant is considered to be a good remedy for stiffness, stomach ache, edema and leprosy by Baoule and Agni ethnies of Côte d'Ivoire. The antimalarial therapeutic indication may be related to the presence of alkaloids because we know that the majority of antimalarial drugs belong to the same chemical family [26]. Various studies have shown that coumarins have a high antioxidant capacity. This antioxidant activity is due to their capacity to scavenging free radicals and chelating metal ions [27]. Analgesics and anti-inflammatories activities are attributed to tannins. Tannins also contribute to wounds healing [28].

3.4 *Dialium dinklagei*

The decoction of the leaves contains sterols, polyterpenes, polyphenols, flavonoids, alkaloids,

coumarins and saponins in large quantities. Anthocyanins, leucoanthocyanins, tannins, quinones and cardiac glycosides are present in small quantities. There was also an absence of steroids. These results were comparable to those of Akoué [13], who noted a large presence of flavonoids, alkaloids, tannins and polyphenols in the ethanol extract of the leaves. Very little research has been made on this plant, but our results confirm those of Bouquet and Debray [25] about the presence of tannin in the leaves of *D. dinklagei*. Sterols, saponins, alkaloids and polyterpenes help explain its traditional therapeutic uses. In addition to their industrial applications as surfactants, traditionally saponins are widely used as detergents, pesticides and molluscides and foam, and can also have advantages on health [29].

3.5 Polyphenol Content of *Diospyros monbuttensis* and *Dialium dinklagei*

The contents of total phenols in the plant extracts, determined from a calibration curve of gallic acid ($Y=0.01810X + 0.07179$; $R^2=0.9911$) showed that *Dialium dinklagei* is richer in phenols than *Diospyros monbuttensis*, whatever the type of solvent used. The highest content was obtained in the methanolic extract of *Dialium dinklagei*. These levels ranged from 114.1 mgGAE/g and 205.1 mgGAE/g (Table 2). The difference between the contents of the phenol based on the plant and solvent used is highly significant ($p < 0.0001$).

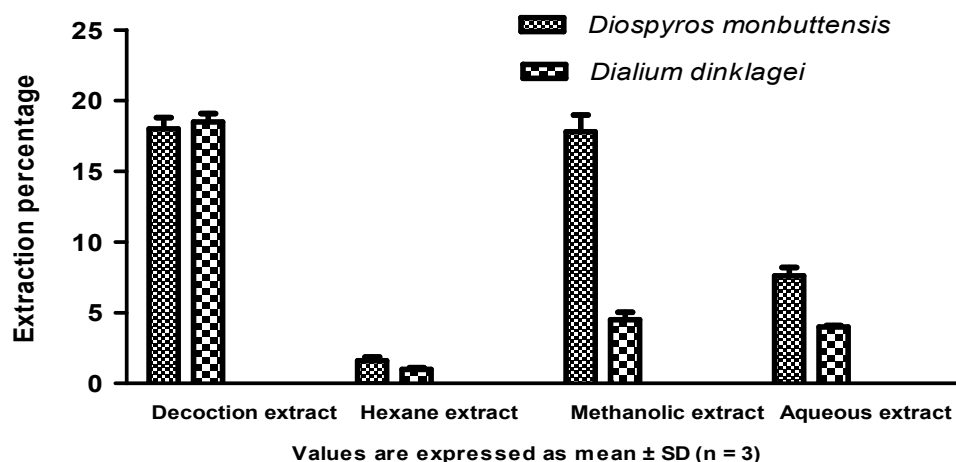


Figure 1. Yields of extracts (%)

Table 1. Results of the foliar phytochemical tests

Natural substances		Chemical groups												
Plantspecies	Extracts	Steroids	Sterols and polyterpenes	Polyphenols	Flavonoids	Anthocyanins	Leucoanthocyanins	Gallic tannins	Catechiq tannins	Quinones	Alcaloids	Coumarins	Cardiotonic Glycosides	Saponins
<i>Diospyros monbuttensis</i>	Dec	+	+	+++	+	-	+	+++	-	+++	+	++	-	+++
	Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-
	Met	-	+	+++	+	+	+++	+++	++	++	+	+	+	++
	Aq	-	+	+++	+	-	+	+	+	++	+	+	-	+++
<i>Dialium dinklagei</i>	Dec	-	+++	++	++	+	+	+	++	+	+++	++	+	+++
	Hex	-	++	-	-	-	-	-	+	-	+++	+	-	-
	Met	-	++	+	+++	++	+	+	-	-	+++	++	+	++
	Aq	-	-	+	+++	-	++	+	-	+	+++	+	-	+++

Strong positive: + + +; moderately positive: + +; Low positive: +; negative test: -
 Dec: Decoction extract; Hex: Hexane extract; Met: Methanolic extract; Aq: Aqueous extract

Table 2. Total phenols, flavonoids and tannins contents of extracts

	Phenol content (mgGAE/g dry extract)		Flavonoid content (mgQE/g dry extract)		Tannin content (mgTAE/g dry extract)	
	Decoction extract	Methanolic extract	Decoction extract	Methanolic extract	Decoction extract	Methanolic extract
<i>Diospyros monbuttensis</i>	136,54±12,63	114,10±2,43	62,18±2,03	15,25±1,13	46,50±1,00	85,70±3,25
<i>Dialium dinklagei</i>	185,59±5,89	205,07±9,09	6,780±0,61	10,90±1,52	146,4±5,46	108,7±6,85

Values are expressed as mean ± SD (n = 3)

The results of the flavonoid contents of the different extracts of both plants species analyzed, determined from a calibration curve of quercetin ($Y = 0.02834X + 0.01368$; $R^2 = 0.9986$) showed that *Diospyros monbuttensis* is richer in flavonoids than *Dialium dinklagei*. The differences between the amounts of flavonoids according to the plant species and the solvent used were significant ($p < 0.0001$). These amounts vary between 6.78 mgQE/g and 62.18 mgQE/g (Table 2). The highest amount was obtained in the decoction extract of *Diospyros monbuttensis* (62.18 mgQE/g).

Tannins from different plant extracts were determined from a calibration curve of tannic acid ($Y = 0.2167X - 0.004417$; $R^2 = 0.9761$). Whatever the type of solvent used, the results showed that *Dialium dinklagei* is richer in tannins than *Diospyros monbuttensis*; the highest amount was obtained in the decoction extract of *Dialium dinklagei*. These contents ranged from 46.50 mgTAE/g and 146.4 mgTAE/g (Table 2). Statistically, the difference between the contents of the phenols concerning the plant species analyzed and the type of solvent used were highly significant ($p < 0.0001$).

The analysis of variance (ANOVA) and the post-ANOVA test (Tukey's multiple comparison test) have shown that the means of different contents of phenol, tannins and flavonoids of the two plant species were significantly different. When compared to those obtained by Akoue et al. [13] (4.42 ± 0.45 mgGAE/g for the aqueous extract and 2.27 ± 0.0038 mgGAE/g ethanolic extract), the contents of phenol *Dialium dinklagei* for methanolic and aqueous extracts were very high. This difference could be due to the extraction solvent and the method used.

In general, the decoction gave the highest contents of phenols, flavonoids and tannins. On the hand, the increase in temperature favors the diffusion and solubility of substances extracted. On the other hand, it destroys certain fragile substances [30]. This increase of the contents of flavonoids in the decocted extract of *Diospyros monbuttensis* can be explained by the destruction by the heat of polyphenol oxidases (PPO) that lowers the polyphenol content; thus the breaking of the connection between polyphenols and other substances leading to the accessibility of these active principles may explain this abundance [31]. The flavonoid content of *Dialium dinklagei*, relatively low in relation with that of *Diospyros monbuttensis*,

which is high in total phenol, could be explained by the presence of other phenolic compounds such as coumarins. The tannin content in *Dialium dinklagei* was higher than that of *Diospyros monbuttensis*. This difference may be related to the species of the studied plants, which were different. Tannins are usually defined as natural polyphenolic compounds with high molecular weight, capable of forming complexes with proteins, their effects on animals are various [32]. Thus, these compounds provide protection against cardiovascular diseases, immune/autoimmune diseases, brain disorders such as Parkinson's disease, and Alzheimer's disease [33]. Traditional medicinal use of these plants is well justified because it is now recognized that phenolic compounds have a significant therapeutic interest: fight against atherosclerosis, anticarcinogenic actions, a major source of natural antioxidants to fight against cellular aging [34,35]. Furthermore the phytochemical sorting revealed that in addition to phenols, flavonoids and tannins, these plants also contain polyterpenes, saponins and alkaloids which contribute to their various therapeutic activities.

4. CONCLUSION

The overall results of the phytochemical screening and polyphenolic content partly and rationally explain the interest of traditional healers for these plants as antimalarial plants. The therapeutic effects can be induced by various chemicals (alkaloid, flavonoids, polyphenols, polyterpenes, saponins, sterols and catechic tannins) which form the scientific basis of traditional therapeutic use of the studied plants. The *in vivo* and *in vitro* studies and the determination of the structure of active molecules will deepen the study of the antimalarial activity of these plants.

CONSENT

Not applicable.

ETHICAL APPROVAL

The study been performed in accordance with the ethical requirements in force in Ivory Coast.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Professor Aké-Assi Laurent (Laboratory of Botany, Unité de Formation et de Recherche-Biosciences, University of Felix

Houphouet-Boigny/Abidjan, Côte d'Ivoire) for botanical identification of the plants.

We also thank Dr. ETTIEN Yapo for the English translation of the manuscript.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Diaby B, Kroa E, Niare A, Coulibaly D, Traore Y, Giani S, et al. Connaissances, attitudes et pratiques des tradipraticiens de la sante de la ville d'Abidjan sur le paludisme. Mali Med. 2011;Tome XXVI n°3, 8-12.
- Sandhya B, Thomas S, Isabel W, Shenbagarathai R. Ethnomedicinal plants used by the valaiyan community of Piranmalai hills (Reserved forest), Tamil Nadu, India – A pilot study. Compl and Alter Med. 2006;3:101-114.
- Séguéna F, Soro K, Soro D, N'guessan K. Savoir-faire de populations locales des taxons du jardin Botanique de Bingerville, Côte d'Ivoire. J Appl Biosci. 2013; 68:5374-5393.
- Kerharo J, Bouquet A. Plante medecinale et toxique de Côte d'Ivoire et Haute-Volta, mission d'étude de la pharmacopée indigène en AOF. Ed Vigot frère, Paris. 1950;300.
- Pousset. Plantes médicinales Africaine. Utilisation pratique. Deuxième Tome, ACCT, Paris. 1989;156.
- Anthony JP, Fyfe I, Smith H. Plant active components—a resource for antiparasitic agents? Trends in Parasitol. 2005;21:462-468.
- Toyang NJ, Verpoorte R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus Vernonia (Asteraceae). J of Ethnopharm. 2013;146:681–723.
- Kayode J, Omotoyinbo MA. Ethnobotanical utilization and conservation of chewing sticks plants species in Ekiti State, Nigeria. Res J. Botany. 2009;4:1-9.
- Anie CO, Matthew IA, Okeri HA. Antimicrobial activity of crude extracts of *Diospyros monbuttensis* (Fam: Ebenaceae) root and stem barks. Inter J of Biomedical Res. 2011;1:18-24.
- Olasehinde G, Olusola O, Obashola F, Singh R, Adesola A. *In-vitro* studies on the sensitivity pattern of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs and local herbal extracts. Mal J. 2012;11(Suppl 1):P72.
- Odelola HA, Okorosobo VI. Preliminary investigation of *in vitro* Antimicrobial Activity of two Nigerian *Diospyros* sp. (Ebenaceae). Afri J Med Sci. 1988; 17(4):167-170.
- Mallavadhani UV, Panda AK, Rao YR. Pharmacology and chemotaxonomy of Diospyros. Phytochem. 1998;49:901-51.
- Akoué GN, Obame LC, Ondo JP, Brama I, Mbading-Mbading W, Otogo N'ngang ES, et al. Ethnotherapy study, phytochemical and antiradical activities of *Agelaea pentagyna* (Lam) Baill and *Dialium dinklagei* Harms. Medicinal plants from Gabon. Inter J of Adv Res. 2013;1:246-255.
- Lock JM. Legumes of Africa: a Check-List. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom. 1989;619.
- Békro YA, Békro JAM, Boua BB, TRA BFH, Ehilé EE. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). Rev Sci Nat. 2007;4:217-225.
- Zirihi GN, Kra AKM, Guede-Guina F. Évaluation de l'activité antifongique *Microglossa Pirifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. Rev de Med et Ph Afr. 2003;17:11-18.
- Nemlin J, Brunel JE. Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3e année). Université Nationale de Côte-d'Ivoire. Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie. Laboratoire de Phytologie, 47 p ; 1995.
- Béourou S, Tuo K, Ouattara K, Touré AO, Meité S, Ako AAB, et al. Phytochemical screening of some medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire (West Africa). Intern J of Chem and Pharm Sc. 2014;2:919-925.
- Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition Lavoisier; 2009.
- Mcdonald S, Prenzler PD, Autolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive oil extracts. Food Chem. 2001;73:73-84.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of

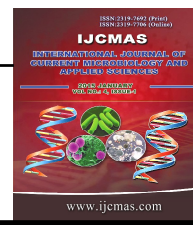
- different fractions of selected microalgae. Food Chem. 2007;102:771-776.
22. Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*. 1996;46:1086-1089.
 23. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10:178-182.
 24. Bainbridge Z, Tomlins K, Westby A. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J of F Sc and Agr*. 1996;29:77-79.
 25. Bouquet A, Debray M. *Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire, Imprimerie Louis Jean, Paris (France)*. 1974;232.
 26. Zirihi G N, N'guessan K, Etien DT, Seri KBP. Evaluation in vitro of antiplasmodial activity of ethanolic extracts of *Funtumia elastica*, *Rauvolfia vomitoria* and *Zanthoxylum gillettii* on *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *J of An & PI Sc*. 2009;5:406-413.
 27. Tseng A. Chemoprevention of tumors in MTV-H ras transgenic mice with coumarins. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1991;32:2257.
 28. Okwu DE, Josiah C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *Afr J Biotech*. 2006;5:357-361.
 29. Shi J, Arunasalam K, Yeung DY, Kakuda Mittal G, Jiang Y. Saponins from edible legumes: Chemistry, processing and health benefits. *J Med Food*. 2004;7:67-78.
 30. Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Plan inić M, Tomas S. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *J Food Sci*. 2010;28:206-212.
 31. Lutz M, Henri'quez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J of Food Compos Anal*. 2011;24:49-54.
 32. Yang CMJ, Russell JB. Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:3954-3958.
 33. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and their biological significance. *Inter J of Mol Sc*. 2007; 950-988.
 34. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem*. 1998;46:1887-1892.
 35. Kumar GS, Nayaka H, Dharmesh SM; Salimath PV. Free and bound phenolic antioxidant in amla (*Emblic officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). *J Food Compos Anal*. 2006;19:446-452.

© 2015 Tuo et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=888&id=36&aid=7803>

PUBLICATION 2



Original Research Article

Antioxidant activities and estimation of the phenols and flavonoids content in the extracts of medicinal plants used to treat malaria in Ivory Coast

Tuo, Karim^{1,2}, Béourou, Sylvain^{2,*}, Touré, A. Offianan², Ouattara, Karamako¹, Meité, Souleymane³, Ako, Ako Aristide B.¹, Yao, S. Stephane^{1,2}, Koffi, David^{1,2}, Coulibaly, Baba², Coulibaly, Adama¹ and Djaman, A. Joseph.^{1,3}

¹Pharmacodynamics biochemical laboratory, Biosciences U. F. R., University of Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, 22 PoBox 582 Abidjan 22, Ivory Coast

²Department of parasitology and mycology, malariology Unit, Pasteur Institute of Ivory Coast

³Pasteur Institute of Ivory Coast, Department of Fundamental and Medical Biochemistry, Toxicology Unit

*Corresponding author

ABSTRACT

Oxidative stress has been implicated in the pathology of many diseases such as inflammatory conditions, cancer, diabetes and the aging. This study was made to evaluate polyphenolic content and antioxidant activity, of several extract of plants. Antioxidant activity was estimated using *in vitro* models like 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging, chelating ability and reducing power methods. The flavonoids and total polyphenolic contents of the extract were also determined using standard methods. Two ways ANOVA was used for statistical analyses. Phytochemical analysis revealed the presence of polyphenols, leucoanthocyanins, saponins, and flavonoids. The total phenol varied from 91.49±6.32 to 240.7±47.31mgGAE/g in the extracts. Flavonoid contents were between 6.7±1.05 and 62.18±2.037mgQE/g. 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging effect of the extracts was determined spectrophotometrically. The highest radical scavenging effect was observed in *Newbouldia laevis* with IC₅₀ = 19.5µg/ml. The different extracts exhibited dose-dependent chelating abilities and reducing power. The abundance of polyphenolic compounds and antioxidant activities of the above Ivoirian medicinal plants could confirm their good therapeutic potential properties attributed by ethnotherapy.

Keywords

Antioxidant;
Antiradical;
Phyto-chemistry;
Phenols;
Flavonoids.

Introduction

Since ancient times, people explored the nature, particularly plants in search of new drugs. This has resulted in the use of large number of medicinal plants with curative properties to treat various diseases. Nearly

80% of the world's population relies on traditional medicines for primary health care, most of which involve the use of plant extracts (Sandhya *et al.*, 2006). Several chemical investigations have been

conducted to provide a scientific explanation for their use in traditional medicine (Cheong *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2014). Recently there has been an upsurge of interest in the therapeutic potentials of medicinal plants as antioxidants in reducing such free radical induced tissue injury. Oxidation process is one of the most important routes for producing free radicals in food, drugs and even living systems (Pourmorad *et al.*, 2006).

During *Plasmodium* infections in humans and experimental models (primates, mouse), a high oxidative stress is generated due to metabolism of compounds rich in iron (Schwarzer *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2009). Consequences of malaria are to decrease antioxidant enzymes and compounds such as catalase, Glutathione (GSH), Glutathione Peroxidase, superoxide dismutase (SOD), and an increased production of reactive oxygen species (ROS) (Selvam and Mathews, 1991; Delmas-Beauvieux *et al.*, 1995; Erel *et al.*, 1997; Luersen *et al.*, 2000).

Due to the depletion of the immune system natural antioxidants during malaria infection, consuming antioxidants as free radical scavengers may be necessary. In addition, it is quite interesting to note that plant have good antioxidant ability and are safer than the synthetic antioxidants (Halliwell, 1994; Kumpulainen and Salonen, 1999). The antioxidant activity can be attributed to various mechanisms like prevention of chain initiation, binding of transition metal ion catalysts, decomposition of peroxides, reductive capacity, and radical scavenging activity (Gayathri *et al.*, 2012).

The present study aims to quantitatively estimate total phenols, flavonoids and antioxidant potential in different extracts of plants used to treat malaria in order to find

antiplasmodial substances with good antioxidant activity. In this context, *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Trema orientalis* *Cnestis ferruginea* widely used by traditional healers but little studied for their antimalarial activity have been selected.

Diospyros monbuttensis leaves have been reported to possess antibacterial and antimalarial properties (Kayode and Omotoyinbo, 2009; Anie *et al.*, 2011; Olasehinde *et al.*, 2012;). The antimicrobial activities of the plant leaves extract was due to the presence of tannins (Odelola and Okorosobo, 1988; Mallavadhani *et al.*, 1998). Other constituents that have been reported include saponins, anthraquinones, cardiac glycosides and alkaloids (Kayode and Omotoyinbo, 2009).

Dialium dinklagei is a tree of Caesalpiniaceae family with trunk cylindrical right. The sheets made up have an acid taste, the flowers are of color yellows and the bark is very thick (Akoué *et al.*, 2013). Not previously reported from Ivory Coast. This species is distributed in West and Central Africa and has been reported from Angola, Cameroon, D.R. Congo, Gabon, Ghana, Guinea, Ivory Coast, Liberia, Nigeria and Sierra Leone (Lock, 1989).

The species *Newbouldia laevis* is native to tropical Africa and grows from Guinea Savannas to dense forests, on moist and well-drained soils. It inhabits the secondary forest extending from Senegal to Cameroon, Gabon, Democratic Republic of Congo, Angola (Arbonnier, 2004). *N. laevis* is widely used in African folk medicine for the treatment of several diseases such as an astringent in diarrhea and dysentery. It is also employed in the treatment against worms, malaria, sexually transmitted

disease, and in the reduction of dental caries (Iwu, 2000; Eyong *et al.*, 2005). Wide diversity of secondary metabolites has also been described depending on the part of the plant used. In root bark, the presence of naphthoquinones and anthraquinones has been reported (Eyong *et al.*, 2005; Eyong *et al.*, 2006) whereas in the leaves, the presence of flavonoids, tannins and terpenes has also been mentioned (Gafner *et al.*, 1997; Samy and Gopalakrishnakone, 2008). The occurrence of quaternary alkaloids has also been identified (Kerharo and Adam, 1974).

Cnestis ferruginea Vahl exDC (Connaraceae) is a shrub or climber of deciduous forest and secondary scrubland widely dispersed in West Africa and other tropical parts of Africa (Burkill, 1985). Different parts and preparations of *Cnestis ferruginea* have been reported to be used in traditional African medicine such as the management of conjunctivitis, bronchitis, tuberculosis, migraines, sinusitis, and oral infection (fruits); snakebite, dysentery, syphilis, gonorrhoea, malaria, cough, dysmenorrhoea, enema, ovarian troubles and aphrodisiac (roots); abortion, constipation, fever and pain (leaves) (Gill, 1992, Okafor and Ham, 1999). Studies have shown that aqueous root extract contained alkaloids, flavonoids, saponins, anthraquinones and tannins (Yakubu *et al.*, 2011; Ishola *et al.*, 2011). The fruits have been reported to have anti-microbial effects especially against gram-positive bacteria (Yakubu *et al.*, 2011), while the aqueous root extract has been reported to possess antistress and laxative activities (Ishola *et al.*, 2007; Yakubu *et al.*, 2011). Also, the methanolic root extract has been reported to possess analgesics and anti-inflammatory activity (Ishola *et al.*, 2011). The toxicological implications of the crude alkaloidal fraction from *C. ferruginea* root on the liver function

indices of male rats as well as the cytotoxic activity of the leaves have been reported (Garon *et al.*, 2007; Atere *et al.*, 2009).

Trema orientalis (Blume) Linn, a tropical tree, is reported to grow on poor soils and chromite overburdens and hence, might be used as an effective cover to prevent leaching of heavy metals from the minewaste dumps to the neighbouring environs (Samantaray, 1991). It is found from South Africa to Tropical Africa and in warm regions of Asia. The leaves and the bark are used to treat cough, sore throats, asthma, bronchitis, gonorrhoea, yellow fever, toothache, and as an antidote to general poisoning (Yanes, 2007). Some pharmacological research done on the plant has focused on, hypoglycemic activity, analgesic, anti-inflammatory activities, anti-plasmodial activity, diuretic activity, laxativity effect, anti-convulsant activity, anti-helminthic activity, anti-sickling effect, anti-oxidant, and anti-bacterial activity (Adinortey *et al.*, 2013). The leaves of *T. orientalis* contain tannins, saponins, flavanoids, triterpenoid (simiarenol, simiarenone, trematol). (Adinortey *et al.*, 2013) Octacosanoic acid, 1-octacosanyl acetate, simiarenone, simiarenol, episimiarenol, and a new triterpene alcohol, trematol has been isolated from stem bark. (Rastogi and Mehrotra, 1993).

Materials and Methods

Vegetal material and basis for selection:

Vegetal material is made up of leaves of *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* and *Trema orientalis* because, there are few data available on their antiplasmodial activity.

Popular pharmacopoeia methods (Betti,

1998) were used to create the list of plants used to cure malaria. This method consists of gathering data on the popular use of medicinal plants in a given area by direct, collective or individual talks with populations. The method used is based on that previously described by Fezan, et al. (2008). The questions asked to traditional healers were about their knowledge of malaria and the plants used in the preparation of antimalarial remedies, the method of preparation of the remedies, the used parts of the plants and details of administration. The investigations were conducted during November 2012 by ethnobotanical approaches near the actors of traditional medicine, especially markets herbal sellers of Abidjan area.

The leaves of *Diospyros monbuttensis* were collected during the month of January, 2013 from Talahini-Sokoura in Department of Sandegué (North-east Ivory Coast). Leaves of *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* and *Trema orientalis* were collected during March, 2013 in Abidjan area (South Ivory Coast). Species were identified by Professor Ake Assi of the "Centre National de Floristique", University of Felix Houphouet-Boigny, Abidjan, Ivory Coast. Material vegetal was air-dried during 7–10 days at room temperature at 25°C and powdered. From the powder obtained after spraying of leaves, different extracts have been prepared.

Chemicals: All chemicals used were of analytical grade. Methanol, aluminum chloride, potassium acetate, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferrous chloride, ferrozine, potassium ferricyanide, Folin-ciocalteu reagent, standards such as L-ascorbic acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), gallic acid, quercetin all from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA).

Preparation of crude extract: The decoction was obtained by dissolving 20g of fine dry powder in 1L of distilled water. The whole was homogenized and boiled for 30minutes. The preparation was first wrung out in a square of white cloth, and then filtered successively twice on an absorbent cotton and once on a Whatman filter paper 3mm. Filtrate 1 was thus obtained. The same operation was repeated with the residue by adding 1 liter of distilled water to obtain the filtrate 2. These two filtrates were gathered and evaporated in "Venticel" oven at 55°C. This series of operations led to the extract of decoction (Zirihi *et al.*, 2003; Bekro *et al.*, 2007).

Phytochemical screening: Chemical tests were carried out on the extracts for the qualitative determination of phytochemical constituents as described by Nemlin and Brunel (1995), B kro *et al.* (2007), Bruneton (2009).

Antioxidant activity

Total phenolic content: The total phenolic content of the extract was determined separately using the method of (McDonald *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). The calibration curve was prepared by mixing methanolic solution of gallic acid (1ml; 0-100 g/ml) with 5ml Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate (4ml, 1M). We measured absorbance at 765nm and drew the calibration curve. 1ml of extract (100 g/ml) was also mixed with the reagents above and after 15min, the absorbance was measured to determine plant total phenolic contents. Experimentations were carried out in triplicate. The total phenol values are expressed in terms of gallic acid equivalent (mg GAE/g of extract), which is a common reference compound.

Total flavonoids content: The total flavonoids content was analyzed by aluminum chloride method (Bahorun *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2002). Each plant extract (0.5ml of 1:100µg/ml) was mixed with 1.5mL methanol, 0.1mL of AlCl₃ (10%), 0.1mL of 1M potassium acetate and 2.8 mL of distilled water. The mixture was allowed to stand for 30min at room temperature (25°C) and absorbance was measured at 415nm with a double beam Perkin Elmer UV/Visible spectrophotometer (USA). The calibration curve was prepared by preparing quercetin solutions at concentrations ranging from 0 to 100µg/ml in methanol. Total flavonoids contents were expressed as mg of Quercetin equivalents (QE)/g of extract. Samples were analyzed in triplicates.

Reducing power assay: The reducing power was determined according to the method of Oyaizu, 1986 and Topçu *et al.*, 2007. Different concentrations of the extract (6.25–200µg/ml) in 1.0ml of deionised water were mixed with phosphate buffer (2.5ml, 0.2M, pH6.6) and potassium ferrocyanide (2.5ml, 1%). The mixture was incubated at 50°C for 20min. A portion of trichloroacetic acid (2.5mL, 10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000rpm for 10min. The upper layer of the solution (2.5ml) was mixed with distilled water (2.5ml) and FeCl₃ (0.5ml, 0.1%) and the absorbance was measured at 700nm and compared with control. Increased absorbance of the reaction mixture indicated an increased reducing power. Ascorbic acid was used as control, and all the tests were performed in triplicate. The sample concentration at which the absorbance is 0.5 (EC₅₀) was estimated by interpolation.

Chelating ability: Chelating ability of Fe²⁺ was determined according to the method of (Yildirim *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2007). Fe²⁺ was monitored by measuring the formation

of ferrous iron-ferrozine complex at 562 nm. Different concentration of extract (1ml) in 3.7ml of methanol was mixed with FeCl₂ (0.1ml, 2mM) and ferrozine (0.2ml, 5mM). The resulting mixture was shaken and left to stand for 10min at room temperature. EDTA was used as standard control. The absorbance of the resulting solution was measured at 562nm. The capability to chelate the ferrous iron was calculated using the following equation:

Chelating Effect (%) = [(A_o - A₁) / A_o] X 100; A_o was the absorbance of the control (containing all reagents except the test compound) and A₁, the absorbance in presence of sample of extract and standard.

Free radical scavenging activity: Hydrogen atom or electron donating abilities of the compounds were measured from the bleaching of the purple-coloured methanol solution of 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH). This spectrophotometric assay uses the stable free radical, DPPH as a reagent (Parejo *et al.*, 2000). Different concentrations of each extract were added, at an equal volume, to methanolic solution of DPPH (100µM). After 30 min at room temperature, the absorbance was recorded at 517 nm. Test was repeated for three times. Vitamin C was used as standard control. The DPPH radical scavenging effect was calculated as inhibition of percentage (I %) using the following formula:

I % = (A Blank - A Sample / A Blank); A blank is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound) and A sample is the absorbance of the test compound. The values of inhibition were calculated for various concentrations of the extract. IC₅₀ values denote the concentration of sample, which is required to scavenge 50% of DPPH free radicals.

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm S.E.M. of three determinants. Comparisons among the groups were tested by two-way ANOVA using Graph Pad Prism, Version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). *P* values <0.05 were considered significant.

Results and Discussion

Extractions yield: Through observations the best yield is obtained with *Trema orientalis* (20%) and similar to those obtained with *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Cnestis ferruginea* respectively with 18; 18.5 and 17.95%. The lowest is obtained with *Newbouldia laevis* (10.9%). The extraction yields did not differ significantly depending on the plant ($p=0.4060>0.05$).

Phytochemical screening: Qualitative analyzes was carried out in extracts of different plants. The results show that all extracts are rich in polyphenols, leucoanthocyanins, saponins, and flavonoids. Others compounds are present or absent according to the plant tested (Table 1).

Flavonoid and phenol contents of the extracts: Table 2 show the contents of total phenols that were measured by Folin-Ciocalteu reagent in terms of gallic acid equivalent (mgGAE/g), standard curve equation: $Y=0.01810 X + 0.07179$, $R^2=0,9911$. Total phenol varied from 91.49 ± 6.32 to 240.7 ± 47.31 mgGAE/g in the extract. *Trema orientalis* with total phenol contents (240.73 ± 47.31 mgGAE/g) had the highest amount in this study followed by *Diospyros monbuttensis* (185.59 ± 5.89 mgGAE/g), *Dialium dinklagei* (136.54 ± 12.63 mgGAE/g), *Cnestis ferruginea* (125.58 ± 2.01 mgGAE/g) then *Newbouldia laevis* (91.49 ± 6.32 mgGAE/g).

There was a statistically significant correlation between different values according the studied plant ($p=0,0172<0,05$).

Flavonoid contents of extracts in terms of quercetin equivalent (Standard curve equation: $Y= 0.02834X+ 0.01368$, $R^2= 0.9986$ were between 6.7 ± 1.05 and 62.18 ± 2.037 (Table 2). The flavonoid contents in extracts of *Diospyros monbuttensis* (62.18 ± 2.037 mgQE/gmgQE/g) and *Trema orientalis* (59.59 ± 6.424 mgQE/g) were higher than that in extracts of *Cnestis ferruginea* (27.95 ± 2.960 mgQE/g) and *Newbouldia laevis* (22.42 ± 3.85 mgQE/g). *Dialium dinklagei* showed the lowest flavonoids contents (6.7 ± 1.05 mgQE/g). There was a statistically significant correlation between different values ($p<0.0001$).

Antioxidant activity

Chelating ability of ferrous ions: The curves representing percentage chelating of plant extracts versus EDTA showed a strong slope which tend toward a plateau. As shown in Table 3, extract exhibited dose-dependent chelating abilities on ferrous ions. Different extracts revealed good chelating potencies of 50%. The concentrations of plant extracts and EDTA inducing 50% chelating are significantly different ($p <0.0001$).

Reducing power assay: In this assay, yellow colour of test solution changes to various shades of green and blue colour depending upon the reducing power of each antioxidant sample. At different concentrations, plants extract showed higher activities and less than the control. These differences were statistically significant ($p<0.05$). Table 3 shows reductive capabilities of plant extract compared to ascorbic acid. Extract power was increased with sample concentration.

DPPH radical scavenging activity: The different extracts showed dose dependent DPPH radical scavenging activity (Table 3). These results show amount of each extract needed for 50% inhibition (IC_{50}). IC_{50} of the standard compound (vitamin C) was $3,715 \pm 0,385 \mu\text{g/ml}$, which is the highest radical scavenging activity. The difference between vitamin C and the others is significant ($P < 0.0001$). But the radical scavenging activities of plant extracts are also important and decreased in the following order: *Newbouldia laevis* > *Cnestis ferruginea* > *Dialium dinklagei* > *Diospyros monbuttensis* and *Trema orientalis*. In general these results did not differ significantly ($P > 0.05$) from each other.

Extractions yield: Yield obtained with *Trema orientalis* (20%) is similar to those of *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Cnestis ferruginea* respectively with 18; 18.5 and 17.95%. The yields are high and indicate that the decoction is a good extraction method. These results are comparable to those obtained by Mahmoudi *et al.* (2013) with the decoction of flower of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Mohammedi and Atik (2011) with *Tamarix aphylla*. But, they are lower than those found by Ozsoy *et al.* (2008) with *Smilax excelsa* and superior to those of N'gaman, *et al.* (2009) with *Gmelina Arborea*.

Phytochemical screening: Phytochemical analysis is important in the evaluation of bioactive compounds from medicinal plants. Qualitative analyzes show that all the extracts are rich in polyphenols, leucoanthocyanins, saponins, and flavonoids. These results will be helpful to phytochemists and pharmacologists for identification of new active compounds from plants (Ankanna *et al.*, 2012). On the other side the others compounds are present

or absent according to the plant tested. The constituents present in these plants play a significant role in the identification of crude drug. Phytochemical screening is very important in identifying new sources of therapeutically and industrially compounds like alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, saponins, steroids, tannins, terpenoids etc (Akindele, 2007).

Flavonoid and phenol contents of the extracts: The phenolic and flavonoid compounds quantified in the extracts seemed to be responsible for the antioxidant activity. Phenolic acids, flavonoids are the most commonly found polyphenolic compounds in plant extracts (Wolfe *et al.*, 2003). The antioxidant activity of phenolics plays an important role in absorption or neutralization of free radicals (Basile *et al.*, 1999). Polyphenols also enhance the level of cellular antioxidative system and induce the cytochrome P-450 resulting in detoxifying the activity of carcinogens intracellularly (De Flora, 1988). Total phenol varied from 91.49 ± 6.32 to 240.7 ± 47.31 mgGAE/g in the extract powder. These investigations provide a comprehensive profile of the antioxidant activity of extracts of plants with respect to their phenols and flavonoids content. Many reports of natural antioxidants of plant have been published and their importance in health, food and preventive medicine has been well documented (Halliwell *et al.*, 2005; Patil *et al.*, 2009). The abundance in polyphenol compounds would confirm the therapeutic properties that there are assigned in ethnotherapy. Indeed, several works have demonstrated that polyphenolic compounds confer to the plant several biologic activities (Kossah *et al.*, 2010).

Antioxidant activity

As results shown, extract exhibited dose-dependent chelating abilities on ferrous ions.

The different extracts revealed good chelating potencies of 50%. At different concentrations, plants extract showed higher activities and less than the control.

The reducing power of *Trema orientalis* was very potent and similar to vitamin C ($p>0.05$). The others plant extract could reduce the most Fe^{3+} ions, which had a lesser reductive activity than standard ascorbic acid. Increased absorbance reaction indicated increased reducing power.

DPPH radical scavenging method is standard procedure applied to evaluation of antiradical activity. This method is easy, rapid and sensitive way to survey the antioxidant activity of a specific compound or plant extracts (Koleva *et al.*, 2002). DPPH free radicals, which are stable in methanol shows maximum a proton donating substances such as antioxidant. Radicals would be scavenged and absorbed. The different extracts showed dose dependent DPPH radical scavenging

activity. IC_{50} of the standard compound (vitamin C) was $3,715 \pm 0,385 \mu g/ml$, which is the highest radical scavenging activity. It is similar to the one found by Somanjana *et al.*, 2013 with vitamin C. The difference between vitamin C and the others is significant. But the radical scavenging activities in the plant extracts are also important and decreased in the following order: *Newbouldia laevis* > *Cnestis ferruginea* > *Dialium dinklagei* > *Diospyros monbuttensis* and *Trema orientalis*. In general these results did not differ significantly ($P>0.05$) from each other. The little difference may be due to difference in plant species or due to different environmental conditions (Perveen *et al.*, 2012). In some cases the extracts with strong antiradical activity are abundant in flavonoids or phenolic compounds. The effect of free radical scavenging activity of extracts on DPPH radicals is thought to be due to their hydrogen donation ability of polyphenols of extracts (Kossah *et al.*, 2010).

Table.1 Results of phytochemical tests

Natural substances	Chemical groups												
	Steroids	Sterols and polyterpenes	Polyphenols	Flavonoids	Anthocyanins	Lucoanthocyanins	Tannins		Quinones	Alkaloids	Coumarins	Cardiotonics Glycosides	Saponins
							Gallic	Catechiq					
<i>Diospyros monbuttensis</i>	+	+	+++	+	-	+	+++	-	+++	+	++	-	+++
<i>Dialium dinklagei</i>	-	+++	++	++	+	+	-	++	+	+++	++	+	+++
<i>Newbouldia laevis</i>	-	-	+	++	-	+	-	+	+	++	+	+	+++
<i>Cnestis ferruginea</i>	-	++	+++	+	++	++	+++	-	-	++	-	++	+++
<i>Trema orientalis</i>	-	++	+	+	-	++	+	-	++	-	++	+	+++

- Strong positive: +++; moderately positive: ++; Low positive: +; negative test: -
- Here Decoction extract of leaves used for all plants in present study.

Table.2 Total phenols and flavonoids contents of extracts

Plant extracts	<i>Diospyros monbuttensis</i>	<i>Dialium dinklagei</i>	<i>Newbouldia laevis</i>	<i>Cnestis ferruginea</i>	<i>Trema orientalis</i>
Phenols content (mg GAE/g)	136,54± 12,63 ^a	185,59± 5,89 ^a	91,49± 6,32 ^a	125,58± 2,01 ^a	240,73± 47,31 ^b
Flavonoids content (mg QE/g)	62,18± 2,03 ^a	6,780± 0,61 ^b	22,42± 3,85 ^{bcd}	27,95± 2,96 ^d	59,59± 6,42 ^a

- a, b,c and d represent no significant aspect of Tukey statistique test. Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Means in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table.3 Antioxidant activities of extracts

Tests	Control	<i>Diospyros monbuttensis</i>	<i>Dialium dinklagei</i>	<i>Newbouldia laevis</i>	<i>Cnestis ferruginea</i>	<i>Trema orientalis</i>
Chelating ability (IC50)	EDTA 4,350±0,15 ^a	9,410±0,310 ^b	14,75±0,25 ^c	7,285±0,21 ^d	45,25±0,25 ^e	24,55±0,25 ^f
Reducing power (EC50)	Vitamine C 20,25 ±0,75 ^a	>200 ^b	133,5 ±2,50 ^c	148,0 ±1,00 ^d	121,5 ±1,00 ^e	24,30 ±0,80 ^f
DPPH radical scavenging activity (IC50)	Vitamine C 3,71±0,38 ^a	22,25±0,25 ^b	21,85±0,15 ^b	19,50±0,50 ^c	21,55±0,15 ^b	22,75±0,25 ^b

- a, b, c, d, e and f represent no significant aspect of Tukey statistique test. Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Means in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

References

- Akindede, A.J., Adeyemi, O.O., (2007): Antiinflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78: 25-28.
- Akoué, G.N., Obame, L.C., Ondo, J.P., Brama, I., Mbading-Mbading, W., N'ngang, E.S.O., Lepengue, N.A., Souza, A., Mbatchi, B., (2013): Ethnotherapy study, phytochemical and antiradical activities of *Agelaea pentagyna* (Lam) Baill and *Dialium dinklagei* Harms. Medicinal plants from Gabon. *International Journal of Advanced Research*, 1(8): 246-255.
- Anie, O.C., Arhewoh, M.I., Okeri, H.A., (2011): Antimicrobial activity of crude extracts of *Diospyros monbuttensis* (Fam: Ebenaceae) root and stem barks. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1)18-24.
- Ankanna, S., Sührulatha, D., Savithramma, N., (2012): Chemotaxonomical Studies of Some Important Monocotyledons. *Botany Research International*, 5: 90-96
- Arbonnier, M., (2004): Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones. CIRAD, Margraf Publishers GMBH MNHN, Cote d'Ivoire. p. 194.
- Atere, T.G., Ajao, A.T., (2009): Toxicological implications of crude

- alkaloidal fraction from *Cnestis ferruginea* D.C root on liver function indices of male Wistar rats. *Int J Biomed & Health Sci*, 5(3):145-56.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J. C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin M., (1996): Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46:1086-1089.
- Basile, A., Giordano, S., Lopez-Sacz, J.A., Cobianchi, R.C., (1999): Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem.*, 52:1479-1482.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S., Ginsburg, H., (2004): Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, 34: 163-189.
- Békro, Y. A., Békro, J. A. M., Boua, B. B., Tra, B. F. H., Ehilé, E. E., (2007): Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat.*, 4: 217-225.
- Betti, J.L., (1998) : Etude ethnobotanique des plantes médicinales de la réserve de faune du Dja : les plantes indiquées en thérapie traditionnelle comme anthelminthiques. *Nature et Faune*, 14: 32-48.
- Burkill, H.M., (1985): *The Useful Plants of West Tropical Africa*. Kew: Royal Botanic Gardens, Edition 2, vol.1, 960pp
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Analysis*, 10:178-182.
- Cheonga, B. E., Waslimb, M.Z., Lema, F.F., Teoh, P.L., (2013): Antioxidant and anti-proliferative activities of Sabah *Ruellia tuberosa*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 020-024
- De Flora, S., (1988): Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res.*, 202:279-83.
- Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Dumon, M.F., Receveur, M.C., Le Bras, M., Clerc, M., (1995): Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clinical biochemistry*, 28:163-169.
- Erel, O., Kocyigit, A., Avci, S., Aktepe, N., Bulut, V., (1997): Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical biochemistry*, 30:631-639.
- Eyong, O.K., Krohn, K., Hussain, H., Folefoc, G.N., Nkengfack, A.E., Schulz, B., Hu, Q., (2005): Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone–anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 53 (6): 616–619.
- Fezan, H. T. B., Irie, G. M., N’gaman, K. C.C., Mohou, C.H.B., (2008): Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l’hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d’Ivoire. *Sciences & Nature*, 5: 39-48.
- Gafner, S., Wolfender, J.L., Nianga, M., Hostettmann, K., (1997): Phenylpropanoid glycosides from

- Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry*, 44, 687–690.
- Gayathri, G., Neelima, M., Balabhaskar, R., (2012): *In vitro* Antioxidant Analysis of Selected Coffee Bean Varieties. *J. of Chem. Pharm. Res.*, 4:2126-2132
- Garon, D., Chosson, E., Rioult, J.P., Eldin de Pecoulas, P., Brasseur, P., Vérité, P., (2007): Poisoning by *Cnestis ferruginea* in Casamance (Senegal): An etiological approach. *Toxicon*, 50(2): 189-95.
- Gill, L.S., (1992): Ethnomedical uses of plants in Nigeria. Benin, Nigeria: Uniben Press.: 77p.
- Halliwell, B., (1994): Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344: 721-724.
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A., (2005): Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 268S - 76S.
- Hans, C. A., Steven, D. B., Rick, M. F., (2009): Antioxidant therapy: Reducing malaria severity? *Crit Care Med.*; 37:758–760.
- Ishola, I.O., Ashorobi, R.B., (2007): The anti-stress potential of the aqueous root extract of *Cnestis ferruginea*. *Int J Pharm*, 3(3): 295-8.
- Ishola, I.O., Akindele, A.J., Adeyemi, O.O., (2011): Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC(Connaraceae) methanolic root extract. *J Ethnopharmacol*, 135(1): 55-62.
- Iwu, M.M., (2000): Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, Inc. London p. 19.
- Kayode, J., Omotoyinbo, M.A., (2009): Ethnobotanical utilization and conservation of chewing sticks plants species in Ekiti State, Nigeria. *Res J. Botany*. 4 (1):1-9.
- Kerharo, J., Adam, J.G., (1974): La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. In: Plantes médicinales et toxiques. Vigot frères, Paris, 1007 p.
- Koleva, I.I, Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N., (2002): Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13: 8-17.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., Chen, W., (2010): Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria* L.) and Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruits. *Res. J. Phytochem.*, 4: 146-153.
- Kumpulainen, J.T., Salonen, J.T., (1999): Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease. *The Royal Society of Chemistry*, UK pp 178- 187.
- Le, K, Chiu, F., Ng, K., (2007): Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353-363.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., Jiang, Y., (2007): Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102:771-776.
- Lock, J.M., (1989): Legumes of Africa: a Check-List. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom. 619 pp
- Luersen, K., Walter; R.D., Muller, S., (2000): Plasmodium falciparum-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo

- synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *The Biochemical journal*, 2:545-552.
- Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N., (2013): Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, 9: 35-40
- Mallavadhani, U.V., Panda, A.K., Rao, Y.R., (1998): Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 49:901-51.
- Mathews, S.T., Selvam, R., (1991): Effect of radical treatment on erythrocyte lipid peroxidation in *Plasmodium vivax*-infected malaria patients. *Biochemistry international*, 25:211-220.
- Mcdonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards, K., (2001): Phenolic content and antioxidant activity of olive oil extracts. *Food Chem.*, 73: 73-84.
- Mohammedi, Z., Atik, F., (2011): Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.*, 2 :609-615.
- Nemlin, J., Brunel, J. E., (1995): Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3e année). Université Nationale de Côte-d'Ivoire. Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie. Laboratoire de Phytologie, 47 p.
- N'gaman, K. C. C., Békro, Y.A., Békro, M. J. A., Bénéié, A., Gooré, B. S., (2009): Sur la composition en métabolites secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de *Gmelina arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'ouest: Analyse par chromatographie en couche mince. *European Journal of Scientific Research*, 36:161-171.
- Odelola, H.A., Okorosobo, V.I., (1988): Preliminary investigation of *in vitro* Antimicrobial Activity of two Nigerian *Diospyros* sp. (Ebenaceae). *Afri. J. Med. Sci.*, 17(4):167-170.
- Okafor, J, Ham, R., (1999): Identification, utilisation et conservation des plantes médicinales dans le sud-est du Nigeria. *Thèmes de la biodiversité africaine*, 3: 1-8.
- Olasehinde, G, Olusola, O., Obashola, F., Singh, R., Adesola, A., (2012): In-vitro studies on the sensitivity pattern of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs and local herbal extracts. *Malaria Journal*, 11(Suppl 1):P72.
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., (2008): Antioxidant activity of *Smilax excels* L. leaf extracts. *J. Food chem.* 110:571-583.
- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., Kefalas, P., (2000): Evaluation of scavenging activity assessed by col (II) EDTA-induced luminal chemilunes-cence and DPPH (2,2-diphényl-1-pycryl-hydrayl) free radical assay. *J pharmacol toxicol method*, 44:507-512.
- Patil, S.M., Kadam, V.J., Ghosh, R., (2009): In vitro antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* Roxb. (Verbenaceae), *International Journal of PharmTech Research*, 1:1480-1484
- Perveen, F., Zaib, S., Irshad, S., Hassan, M., (2012): Antioxidant and DNA protection activities of the hill toon, *Cedrela serrata* (Royle) leaves

- extract and its fractions, *Journal of Natural Products*, Vol. 5: 207- 213
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N., (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1142-1145,
- Rastogi, R.P., Mehrotra, B.N., (1993): Compendium of Indian Medicinal Plants. Central Drug Research Institute, Lucknow Publications and Information Directorate, New Delhi, India, 2:169–70.
- Samantaray, S., (1991): Studies on the effects of minewastes on the vegetation of the adjoining regions of Sukinda chromite mine, Ph.D thesis, Utkal University.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., (2008): Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Bioinformation*, 3:100–110.
- Sandhya, B., Thomas, S., Isabel, W., Shenbagarathai, R., (2006): Ethnomedicinal plants used by the valaiyan community of Piranmalai hills (Reserved forest), Tamil Nadu, India – A pilot study. *Afri. j.l of Trad. Compl. and Alter. Med.*, 3: 101-114.
- Santiago, L.A., Dayrit, K.C., Correa, P.C.B., Mayor, A.B.R., (2014): Comparison of antioxidant and free radical scavenging activity of triterpenes α amyrrin, oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Natural Products*, 7: 29-36
- Schwarzer, E., Kuhn, H., Valente, E., Arese, P., (2003): Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 101:722-728.
- Somanjana, K., Snigdha, P., Ananya, C., Debal, R., Anirban, R., Krishnendu, A., (2013): Evaluation of antioxidative activity of ethanolic extract from *Russula delica*: An *in vitro* study. *J. Chem. Pharm. Res.*, 5:100-107
- Topçu, G., Ay, M. , Bilici, A., Sarıkurkcu, C., Ozturk, M., Ulubelen A., (2007): A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816-822.
- Wolfe K., Wu X., Liu R.H., (2003): Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.*, 51:609-614.
- Yakubu, M.T., Adams, D.M., Akanji, M.A., Oladiji, A.T., (2011): Laxative activity of the aqueous root extract of *Cnestis ferruginea* (Vahl ex DC) in loperamide-induced constipated rats. *Nig J Gastroenterol & Hepatol*, 3(1-2): 21-9.
- Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. A., (2001): Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 411-420.
- Zirihi, G.N., Kra, A.K.M., Guede-Guina, F., (2003). Évaluation de l'activité antifongique *Microglossa Pirifolia* (Lamarck) O. Kuntze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Revue de Medecine et Pharmacie Africaine*, 17:11-18.

PUBLICATION 3



Research Article

International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences

www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps

ISSN: 2321-3132



Phytochemical screening of some medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire (West Africa)

Béourou Sylvain^{2,*}, Tuo Karim^{1,2}, Ouattara Karamoko¹, Touré André O.²,
Meité Souleymane³, Ako Ako A.B.³, Tano Konan D¹., Gbessi Adji E.³, Djaman Allico J.^{1,3},
Coulibaly Adama¹

¹Pharmacodynamics Biochemical Laboratory, Biosciences U. F. R., University of Félix Houphouët-Boigny, Abidjan,
22 PoBox 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

²Department of parasitology and mycology, malariology Unit, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire

³Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, Department of Fundamental and Medical Biochemistry, Toxicology Unit

Received: 29 April 2014, Accepted: 30 May 2014, Published Online: 27 June 2014

Abstract

Because of the resistance of *Plasmodium falciparum* to most of the antimalarial drugs and the burden of malaria, there is an urgent need for the discovery of new antimalarial compounds. Many investigations showed that plants are often the main sources of new medicines. In this study, a phytochemical screening was performed with plants used in traditional medicine in Côte d'Ivoire to treat malaria. We identified the chemical compounds groups that could guide us towards pharmacological studies. The 20 crude extracts obtained from medicinal plants were tested for the detection of chemical groups. An abundance presence of alkaloids in all extracts and an absence of steroids in all extracts except the decoction extract of *Diospyros monbuttensis* have been established. The other chemical groups were present in all the 5 plants. Their presence in the different extracts varied according to extraction method. The whole results of the phytochemical screening would explain in a rational manner, the enthusiasm of traditional healers for these plants as antimalarial drug.

Keywords: Antimalarial Drug, Malaria, Phytochemical Screening, Medicinal Plants

Contents

1. Introduction	919
2. Experimental	920
3. Results and discussion	921
4. Conclusion	924
5. Acknowledgement	924
6. Competing Interests.	924
7. References	924

*Corresponding author

Sylvain Béourou

Department of Parasitology and Mycology

Pasteur Institute of Ivory Coast, France

E-mail: be_sylvain@yahoo.fr

Manuscript ID: IJCPS2096



PAPER-QR CODE

Copyright © 2013, IJCPS All Rights Reserved

1. Introduction

Population growth, increasing pauperization, cultural habits and expensiveness of the pharmaceutical drugs are responsible for the use of traditional medicines such as herbal medicine in rural and urban populations [1, 2]. Indeed, indigenous plants play an important role in the treatment of many diseases and an estimated of 80% of people worldwide to use herbal remedies [3, 2]. Traditional pharmacopoeia is used to treat many infections against which

plants used are as effective as the pharmaceutical drugs [4, 5, 2]. The secondary metabolites in these plants are involved into their medical properties. Further works on these secondary metabolites may represent a first step toward determination of active principles [6, 7]. This work was implemented to achieve the phytochemical screening of plants used against malaria in the ivorian traditional medicine. The aim of this work is to establish correlation between the active principles present in these medicinal plants and their therapeutic powers particularly their use as antimalarial drug.

2. Materials and Methods

Vegetal material

The vegetal material are leaves of *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* and *Trema orientalis*. There are few data available on the antiplasmodial activity of these 5 plants. The leaves of *Diospyros monbuttensis* were collected during January, 2013 from Talahini-Sokoura in Department of Sandegué (North-eastern Côte d'Ivoire). The leaves of *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* and *Trema orientalis* were collected during March, 2013 in the area of Abidjan (South of Côte d'Ivoire). Plant species were identified by Professor Ake-Assi from the "Centre National de Floristique", University of Felix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire. Vegetal material was air-dried for 7 to 10 days at room temperature (25°C) and then powdered. The different extracts were prepared from the powder obtained.

Preparation of crude extract

The decoction of each plant was obtained from the fine powder as of the traditional preparation method. Then, 3 successive extractions by solvents of increasing polarity (*n*-hexane, methanol and water) were implemented described previously by Bekro *et al.* and Zirih *et al.* [8, 9].

Decoction

The decoction was obtained by dissolving 20g of fine dry powder in 1L of distilled water. The whole was homogenized and boiled for 30 minutes. The preparation was first wrung out in a square of white cloth, and then filtered successively twice on an absorbent cotton and once on a Whatman filter paper 3mm. Filtrate 1 was thus obtained. The same operation was repeated with the residue by adding 1 liter of distilled water to obtain the filtrate 2. These two filtrates were gathered and evaporated in "Venticel" oven at 55°C. This series of operations led to the extract of decoction.

Extraction with hexane.

50g of fine dry powder were dissolved in 150mL of hexane in a blender. The whole was vigorously agitated in the blender for 10 minutes. The preparation was first wrung out in a square of white cloth, and then filtered successively with an absorbent cotton and filter paper as above. The first hexane filtrate was thus obtained (hexane filtrate 1). For filtrate 2, the same operation was repeated by addition of 150mL of hexane on the residue found. This activity was repeated for filtrate 3. These three filtrates were then gathered and evaporated in the "Venticel" oven at 55°C. This operation led to a hexane extract.

Extraction by methanol

After the extraction with hexane, residue from filtrate 3 was air-dried and the resulting powder was recovered in 150mL of methanol. Ten minutes of homogenization by agitation followed by a filtration led to the methanolic filtrate 1. The same operation was repeated for the two successive methanolic filtrates 2 and 3. The three filtrates obtained were also gathered and evaporated. This series of operations gave the methanolic extract.

Preparation of the aqueous extract.

The same previous operations were repeated on the marc of the methanolic extract with 150mL of water for the aqueous extract.

Phytochemical screening

The phytochemical analysis was based on the staining characteristics in order to highlight the major chemical groups. All the above extract was tested. Various chemical groups were identified by reference to the methods described by Nemlin and Brunel, Bekro *et al.* and Bruneton [8, 10, 11]. The results were classified as follows:

-: Absence; +: Presence in low concentration; ++: Presence in moderate concentration; +++: Presence in high concentration

Steroids: Salkowski test

Five drops of concentrated H₂SO₄ were added to 1mL of extract, the appearance of a red color indicated the presence of steroids.

Sterols and polyterpenes

0.1g of extract is dissolved at hot in 1mL of acetic anhydride in a capsule. The resulted solution was poured in a test tube and then 0.5mL H₂SO₄ was added. A violet coloration that turned in blue, then in green revealed the presence of sterols and triterpenes.

Saponins (Foam index)

0.1g of extract is dissolved in a test tube containing 10mL of distilled water. The tube was shaken vigorously up and down for 30-45 seconds and then left for 15 minutes. The height of the foam was measured. Persistent foam for more than 1cm high indicated the presence of saponins.

Alkaloids

Two drops of Bouchard's reagent (reagent of iodine-iodide) were added to 1mL of each solution. A red-brown precipitate coloration meant a positive reaction.

Polyphenols

A drop of alcoholic solution of 2% ferric chloride is added to 2mL of extracts. A blue-blackish to green more or less dark coloration indicated a positive reaction.

Flavonoid

In a tube containing 3mL of the solution extract, a few drops of 10 % NaOH were added. Appearance of yellow-orange color indicated the presence of flavonoids.

Anthocyanins

Five milliliters of 10 % H₂SO₄ was added to 5mL of 5 % extract, and then a base (NH₄OH). If the coloration is accentuated by acidification and then change into blue-purplish in a basic environment, anthocyanins were present.

Leucoanthocyanins

One milliliter of extract was added to 5mL of hydrochloric alcohol. The preparation was heated in the water-bath for 15minutes. A cherry red or purplish coloration meant the presence of leucoanthocyanins.

Tannins

Two milliliters of water and few drops of 1% ferric chloride were added to 1mL of extract contained in a test tube. The appearance of a blue, blue-black or black coloration indicates the presence of gallic tannins, the green or dark green coloration shows the presence of catechic tannins.

Quinones

An aliquot of extract was dissolved in 5mL of diluted HCl (1/5) and heated in a boiling water bath for 30minutes, and then extracted with 20mL of CHCl₃ after cooling. To the organic phase was added 0.5mL of 50 % NH₄OH diluted solution. The positivity of the reaction was indicated by a red to violet indicates a positive reaction.

Coumarins

To 5mL of extract, are added 2mL of hot water, and then the solution is shared between two test tubes. In the content of one, we added 0.5 mL of NH₄OH 25%. Under the UV at 366 nm, an intense fluorescence indicated the presence of coumarins.

Cardiotonic glycosides

This reaction is exothermic. It takes place in a glacial environment. To 2mL of aqueous solution of extract were added 1mL of glacial acetic acid and then 1mL of concentrated sulfuric acid. Adding few drops of 2% FeCl₃ gave a green-bluish coloration which is specific to cardiotonics glycosides.

3. Results and Discussion

Selection of plants and yields of extractions

Investigations were carried out by ethnobotanical approaches among traditional medicine actors, especially medicinal plants sellers on the markets of Abidjan area. These investigations helped in the selection of *Diospyros monbuttensis*, *Dialium dinklagei*, *Newbouldia laevis*, *Cnestis ferruginea* and *Trema orientalis* (Table1) considered as very used in the Ivorian traditional pharmacopoeia although paucity remains on antimalarial activity. These species have mainly been harvested both on the basis of indications from the literature and information from the healers (Table1). Of the five extracts, the decoction has produced the greatest yield (20%), and the hexane, the smallest (1%). These results suggest that the using of decoction is appropriate for preparation of plant extracts (Fig1). The lowest yield was obtained with hexane. This shows that the plants analyzed contained very little of non-polar compounds. This result is similar to that obtained by Bekro *et al.* [8] with the hexane extract of *Caesalpinia benthamiana* (0.75%).

Table 1. Selected Plants

Species	Family	Local name	Part tested
<i>Diospyros monbuttensis</i>	<i>Ebenaceae</i>	Gnamien-Baka (Baoulé)	leaves
<i>Dialium dinklagei</i>	<i>Caesalpinaceae</i>	N' séhia (Ebrie)	leaves
<i>Newbouldia laevis</i>	<i>Bignoniaceae</i>	Mogogbèboulou (Dioula) Tohounzué (Baoulé)	leaves
<i>Cnestis ferruginea</i>	<i>Connaraceae</i>	Kèrèkèssè (Baoulé)	leaves
<i>Trema orientalis</i>	<i>Ulmaceae</i>	Sodi goula (Dioula) N'sien (Baoulé)	leaves

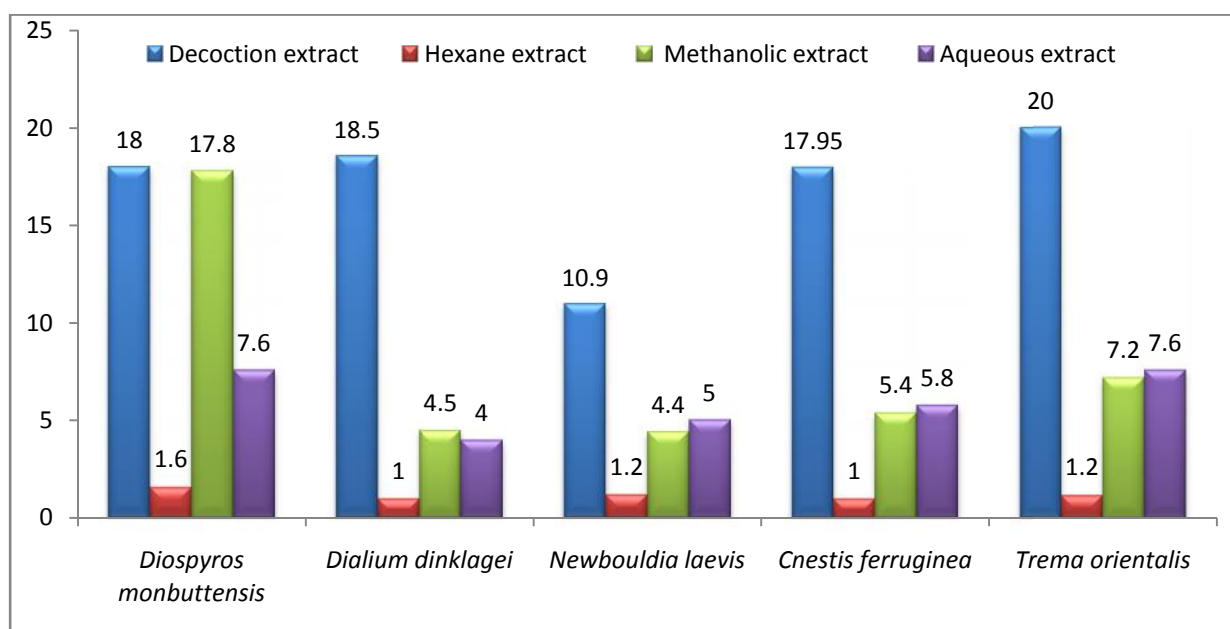


Figure 1. Yields of extractions of different extract

Table 2. Results of phytochemical tests

Natural substances			Chemical groups													
Plants	Parts	Extract	Steroids	Sterols and polyterpenes	Polyphenols	Flavonoids	Anthocyanins	Lucoanthocyanins	Tannins						Cardiotonics Glycosides	Saponins
									Gallic	Catechiq	Quinones	Alkaloids	Coumarins			
<i>Diospyros Monbuttensis</i>	Le	Dec	+	+	+++	+	-	+	+++	-	+++	+	++	-	+++	
		Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	
		Met	-	+	+++	+	+	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	++
		Aq	-	+	+++	+	-	+	+	+	+	++	+	+	-	+++
<i>Dialium Dinklagei</i>	Le	Dec	-	+++	++	++	+	+	-	++	+	+++	++	+	+++	
		Hex	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	-	
		Met	-	++	+	+++	++	+	+	+	-	+++	++	+	++	
		Aq	-	-	+	+++	-	++	+	+	-	+++	+	-	+++	
<i>Newbouldia laevis</i>	Le	Dec	-	-	+	++	-	+	-	+	+	++	+	+	+++	
		Hex	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+	-	-	
		Met	-	++	++	-	+++	-	++	+++	-	++	+	++	++	
		Aq	-	-	++	++	-	+	++	++	-	++	+	-	+++	
<i>Cnestis ferruginea</i>	Le	Dec	-	++	+++	+	++	++	+++	-	-	++	-	++	+++	
		Hex	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+++	-	-	-	
		Met	-	+	++	+	-	+	+	-	++	+	-	++	++	
		Aq	-	-	+++	-	+	++	+++	-	+++	+	-	-	+	
<i>Trema orientalis</i>	Le	Dec	-	++	+	+	-	++	+	-	++	-	++	+	+++	
		Hex	-	+	+	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	
		Met	-	+++	+++	+	-	+	-	+	-	+	-	+++	-	
		Aq	-	+	+	+++	+	-	+	+	-	+++	+++	-	-	

Strong positive: + + +; moderately positive: + +; Low positive: +; negative test:-

Le= leaves; Dec: Decoction extract;

Hex: Hexane extract;

Met: Methanolic extract;

Aq: Aqueous extract

Phytochemical screening basis of the therapeutic use of different species of plants

The results of the phytochemical screening carried out on the extracts of plants referred to malaria are mentioned in the **Table 2**. These results varied from one extract to another and from one plant to other.

***Diospyros monbutensis* Gürke (Ebenaceae)**

The leaves contain sterols, polyterpenes, polyphenols, flavonoids, alkaloids, saponins, leucoanthocyanins, tannins, quinones and coumarins. Anthocyanins, cardiotonics glycosides and steroids are present in very low quantity. Bouquet and Debray [12] reported similar results. They showed the presence in the leaves of some quinones, tannins, sterols and saponins and an absence of flavonoids and alkaloids. Anie *et al.* [13] noted an absence of tannins in the root and bark of stem. According to Bouquet and Debray [12], this plant is considered by the Baoulé and Agni ethnic groups from Ivory Coast as a good remedy for febrile aches, stomach pains, edema and leprosy. The antimalarial therapeutic indication could be related to the presence of alkaloids since the majority of antimalarial molecules belong to this chemical family [14]. Various studies have demonstrated that the coumarins have a potential antioxidant. This antioxidant activity is due to their ability to trap the free radicals and to chelate metal ions [15]. It is assigned to the terpenoids and tannins some analgesics and anti-inflammatory activities. Apart from this, the tannins contribute to healing wounds [16]. The constituents present into these plants play a significant role in identifying the crude drug. Phytochemical screening is very important in identifying new sources of therapeutically and industrially important compounds like alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, saponins, steroids, tannins, terpenoids etc [17].

***Dialium dinklagei* (Caesalpinaceae)**

The leaves of *D dinklagei* contain sterols, polyterpenes, polyphenols, flavonoids, alkaloids, coumarins and saponins in large quantity. Anthocyanins, leucoanthocyanins, tannins, quinones and cardiotonics glycosides are present in low quantity. There were also no steroids. Little work has been performed on this plant, but we noted that Bouquet and Debray [12] have described the presence of tannins in the leaves. Existence of sterols, saponins, polyterpenes and alkaloids may explain their traditional therapeutic usages. Traditionally, the saponins are widely used as detergents, pesticides and molluscides, in addition to their industrial applications as foam and surfactants, they may also have beneficial effects on health [18]. These results will be helpful to phytochemists and pharmacologists for the identification of new active compounds from plants [19].

***Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann ex-Bureau (Begoniaceae)**

The leaves of *Newbouldia laevis* contain plenty of saponins and alkaloids, moderate flavonoids, polyphenols, anthocyanins, tannins, and in low quantity sterols, polyterpenes, coumarins, quinones and leucoanthocyanins. There were no steroids. These results are in agreement with those of Bouquet et Debray [12] who noted the presence of sterols and saponin. In the contrary, Yemoa *et al.* [20] reported the absence of alkaloids, terpenes, steroids, saponosides and the presence of flavonoids in the leaves. According to Usman *et al.* [21], there are flavonoids, tannins, terpenes, steroids and cardiotonics glycosides in the extracts. The amount of secondary metabolites in this plant could explain his permanent usages by traditional healers. In fact, the roots of *Newbouldia laevis* are used in Benin in the treatment of Buruli ulcer [20]. This plant is also used in cases of constipation, gastrointestinal pain and bronchopneumonia. Use externally, treats the intercostal pains, rheumatism, neuralgia and the toothache. It is also used against venereal diseases [12, 22, 23]. It was too deemed to facilitate childbirth [12, 24]. Several works confirmed the antimicrobial activity of *N. laevis* [25,21].

***Cnestis ferruginea* Vahl exDC (Connaraceae)**

The leaves of *Cnestis ferruginea* contain saponins, quinones, polyphenols, gallic tannins and alkaloids in large quantity. The quantity of cardiotonics glycosides, sterols, polyterpenes, catechic tannins, leucoanthocyanins, and anthocyanins are present in average quantity. Some trace of coumarins and flavonoids and a lack of steroids were reported. The traditional use of this plant as antimalarial drug could be explained by the alkaloids. Several other usages were described. According to Bouquet and Debray [12], the leaves are deworming, very active against the ascaris. These leaves are also used to treat scabies, asthenia, to calm madness and have purgative properties. Another therapeutic indication that traditional pharmacopoeia recognizes to this plant is its use as an aphrodisiac and the treatment of eye disorders. Prior works have proven the anti-inflammatory analgesic activities [26, 28], anti-depressive and anxiolytic activities [27] of *Cnestis ferruginea*. The anthocyanins help the immune system to protect and fight effectively against viral infections [29].

***Trema orientalis* (L.) Blume (Ulmaceae)**

Leaves of *T. orientalis* do not contain steroids, but contain sterols, polyterpenes, polyphenols, flavonoids, tannins and alkaloids in varying proportions depending on the solvent. This result differs from that of Bouquet and Debray [12] who did not report alkaloids. It also differs from those of Bekro *et al.* [8] who mentioned a lack of tannin gallic and saponins. Kerharo and Adam [30] showed that the leaves have diuretic effects because of the flavonoids and deworming effects due to polyterpenes. The hypotensive effect of the plant described by the traditional healers would be due to polyphenols and flavonoids (flavonones). Dimo *et al.* [31] indicated that *Trema orientalis* has some antidiabetic properties (hypoglycaemic activity) and could be beneficial for diabetics with cardiovascular diseases. Dijoux-Franca *et al.*, [32], showed the presence of dihydrophenanthrene and phenyl

dihydroisocoumarine in *Trema orientalis*. The importance of secondary metabolites in this plant could therefore explain its various therapeutical virtues.

4. Conclusion

In our opinion, the whole results of the phytochemical screening could explain the enthusiasm of traditional healers for these plants as antimalarial drug. The therapeutic effects are induced by various chemical compounds (alkaloid, flavonoids, polyphenols, polyterpenes, saponins, sterols and tannins catechics) which constitute the scientific basis of the traditional therapeutic use of plants studied. Phytochemical constituents are the basic source for the establishment of several pharmaceutical industries. These results will be helpful to phytochemists and pharmacologists for identification of new active compounds from plants. We wish to deepen this phytochemical study on one hand by the studies *in vitro* and *in vivo* of antimalarial activity and on the other hand in establishing with precision the structures of active molecules.

5. Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

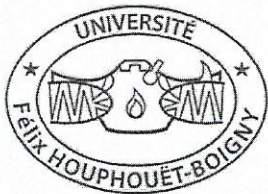
6. Acknowledgement

The authors are indebted to Professor Aké-Assi Laurent (Laboratory of Botany, Unité de Formation et de Recherche-Biosciences, University of Felix Houphouët-Boigny/Abidjan, Côte d'Ivoire) for botanical identification of the plants. We also acknowledge the healers for good collaboration in this work.

7. References

1. B Diaby; E Kroa; A Niare; D Coulibaly; Y Traore; S Giani; A Coulibaly; B Niare; A Guindo; MT Keita; SO Sylla; R Sanogo; OK Doumbo. *Mali Medical*, **2011**, Tome XXVI n°3, 8-12
2. F Séguéna; K Soro; D Soro; K. N'guessan. *J. Appl. Biosci.*, **2013**, 68: 5374–5393
3. B Sandhya; S Thomas; W Isabel; R. Shenbagarathai. *Compl. and altern. Med.*, **2006**, 3: 101-114
4. J Kerharo; A Bouquet. Plante médicinale et toxique de Côte d'Ivoire et Haute-Volta, mission d'étude de la pharmacopée indigène en AOF. *Edition Vigot frère*, Paris, **1950**: p300.
5. Pousset. Plantes médicinales Africaine. Utilisation pratique. Deuxième Tome, ACCT, Paris, **1989**: p156.
6. JP Anthony; I Fyfe; H Smith. *Trends in Parasitol.*, **2005**, 21: 462-468
7. NJ Toyang; R Verpoorte. *J. of Ethnopharm.*, **2013**, 146: 681–723
8. YA Békro; JAM Békro; BB Boua; BFH Tra; EE Ehilé. *Rev. Sci. Nat.* **2007**, 4: 217-225.
9. GN Zirihi; AKM Kra; F Guede-Guina. *Revue de Med. et Pharmacie Africaine*, **2003**, 17: 11-18.
10. J Nemlin; JE Brunel. Fascicule de Travaux Pratiques de Matière Médicale (3e année). Université Nationale de Côte-d'Ivoire. Faculté de Pharmacie. Département de Pharmacognosie. Laboratoire de Phytologie, **1995**, pp. 47.
11. J Bruneton. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition Lavoisier **2009**: p1288
12. A Bouquet ; M Debray. Plantes médicinales de Côte-d'Ivoire, *Imprimerie Louis Jean*, Paris (France), **1974**: pp. 232.
13. CO Anie; IA Matthew; HA Okeri. *Inter. J. of Biomedical Res.*, **2011**, 1: 18-24
14. GN Zirihi; K N'guessan; DT Etien; KBP Seri. *Joun. of Animal & Plant Sci*, **2009**, 5: 406 - 413.
15. A Tseng. *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, **1991**, 32: 2257.
16. DE Okwu; C Josiah. *Afri. J. Biotech.*, **2006**, 5: 357-361.
17. A.J Akindele; OO. Adeyemi. *Fitoterapia*, **2007**, 78, 25-28.
18. J Shi; K Arunasalam; D Yeung; Y Kakuda; G Mittal; Y Jiang. *J. Med. Food*, **2004**, 7: 67-78
19. S Ankanna; D Suhulatha; N Savithramma. *Botany Research International*, **2012**, 5: 90-96
20. AL Yemoa; JD Gbenou; RC Johnso; JG Djego; C Zinsou; M Moudachirou; J Quetin-Leclercq; A Bigot; F Portaels. *Ethnopharmacologia*, **2008**, N°42
21. H Usman; JCU Osuji. *Afr. J. Trad. CAM*, **2007**, 4: 476-480
22. D Soro; MW Kone; K Kamanzi. *European Journal of Scientific Research*, **2010**, 40: 307-317.
23. FH Tra-Bi. Utilisation des plantes par l'homme, dans les forêts classées du Haut- Sassandra et de Scio, en Côte-d'Ivoire. Thèse de 3ème Cycle, Université de Cocody, Abidjan, **1997**, pp. 215.
24. EB Enitome ; U. Sanni ; AMN Zuleikha. *Pharmaceutical Biology*, **2010**, 48: 808–815.
25. V Kuete; KO Eyong; GN Folefoc; VP Beng; H Hussain; K Krohn; AE Nkengfack. *Pharmazie*, **2007**, 62: 552-6.
26. IO Ishola; AJ Akindele; OO Adeyemi. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 135: 55–62.
27. IO Ishola; M Chatterjee; T Santoshkumar; N Tadigopulla; OA Olufunmilayo; G Palit; R Shukla. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **2012**, 103: 322–331

28. IO Ishola; JP Chaturvedi; S Rai; N Rajasekar; OO Adeyemi; R Shukla; T Narender. *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, 146: 440–448
29. AL Liu; SH Shu; HL Qin; SM Lee; YT Wang; GH Du. *Planta Med.*, **2009**, 75: 337-9.
30. J Kerharo; JG Adam. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques, *Vigot frères*, Paris, **1974**, pp. 1007.
31. MG Dijoux-Franca; D Nougoué-Tchamo D; B Cherel; M Cussac; E Tsamo; AM Mariotte. *J Nat Prod.*, **2001**, 64: 832-5.
32. T Dimo; FT Nguéguim; P Kamtchouing; E Dongo; PV Tan. *Pharmazie*, **2006**, 61: 233-6.



22 BP : 582 Abidjan 22

PERMIS D'IMPRIMER DE LA VERSION CORRIGEE DE LA THESE

Doctorat de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Présenté par Monsieur TUO Karim

THEME : Criblage phytochimique, activité antioxydante et antiplasmodiale *in vitro* de cinq plantes utilisées traditionnellement en Côte d'Ivoire contre le paludisme.

Vu et approuvé

Abidjan, le 22 juillet 2015

Le Vice-Doyen Chargé de la Recherche

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'AHONZO-NIAMKE I. Sébastien'.



Prof. AHONZO-NIAMKE I. Sébastien
Professeur Titulaire

Vu et Permis d'Imprimer

Abidjan, le 22 juillet 2015

Le Vice-Président de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY


Prof. AFFIAN Kouadio
Professeur Titulaire



Résumé

La résistance aux antipaludéens et la persistance de l'endémie palustre constituent un problème majeur de santé publique en Côte d'Ivoire. Outre la production des radicaux libres, l'infection palustre s'accompagne d'une dépression générale des antioxydants totaux plasmatiques pouvant contribuer à la morbidité et mortalité dues à la malaria. Ce travail a consisté à étudier cinq espèces végétales utilisées par la pharmacopée ivoirienne contre le paludisme. Les études phytochimiques, les mesures quantitatives et qualitatives de l'activité antioxydante par le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), le pouvoir chélateur et le pouvoir réducteur des extraits ont été réalisés. Les tests d'activité *in vitro* ont été réalisés sur des isolats de *P. falciparum* prélevés sur des patients souffrant de paludisme simple et sur des souches de référence (3D7 et Dd2). La méthode de plaques de microtitrations basée sur la lecture de fluorescence au SYBR Green par un appareil de type Spectra max GEMINI XPS (Molecular Devices) a été utilisée. La chloroquine, la quinine et l'artesunate ont été choisies comme antipaludique de référence. Enfin l'activité hémolytique des extraits ayant montré de bonnes activités antiplasmodiales a été étudiée. Les résultats des études phytochimiques ont montrés une richesse de ces plantes en métabolites secondaires. Les extraits bruts et partitions testés se sont montrés actifs sur le DPPH en donnant une tache jaune sur fond pourpre. Les meilleurs résultats des tests antiplasmodiaux avec les extraits bruts ont été obtenus avec la décoction de *Dialium dinklagei* ($CI_{50}=12,8\pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$), de *Cnestis ferruginea* ($CI_{50}=11,78\pm 2,2$ $\mu\text{g/mL}$) et de l'extrait méthanolique de *Newbouldia laevis* ($CI_{50}=10,21\pm 3,2$ $\mu\text{g/mL}$). La partition liquide-liquide a permis d'améliorer sensiblement l'activité antiplasmodiale de 10 $\mu\text{g/mL}$ pour les extraits bruts à environ 1 $\mu\text{g/mL}$ pour les fractions issues des partitions. En effet, les fractions F_3 de *Dialium dinklagei*, F_3 de *Newbouldia laevis*, et F_2 de *Cnestis ferruginea* ont donné les meilleurs résultats respectivement 1,22 \pm 0,37 $\mu\text{g/mL}$, 6,11 \pm 1,3 $\mu\text{g/mL}$ et 4,37 \pm 0,77 $\mu\text{g/mL}$. La chloroquine, l'artesunate et la quinine ont été utilisés comme molécules de référence et ont donné des CI_{50} qui ont varié entre 33,01 \pm 0,9 et 51,07 \pm 2,2 nM pour la chloroquine, entre 2,22 \pm 0,16 et 6,31 \pm 3,01 nM pour l'artesunate et 5,76 \pm 0,95 et 44,37 \pm 2,15 nM pour la quinine sur les différentes souches testées. L'étude de l'activité hémolytique a révélée une hémolyse inférieure à 1% à des concentrations égales à 200 $\mu\text{g/mL}$. Ce travail montre une piste pour trouver de nouvelles molécules ayant des propriétés antioxydantes en même temps capables de traiter le paludisme.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, Hémolytique, *in vitro*, antiplasmodiale, partition, antioxydant

Summary

Resistance to antimalarial drugs and persistence of malaria endemicity constitute a major public health problem in Côte d'Ivoire. Besides the production of free radicals, malaria infection is associated with general depression of total plasma antioxidants may contribute to morbidity and mortality due to malaria. This work aimed to study five plant species used by the Ivorian pharmacopoeia against malaria. Phytochemical studies, quantitative and qualitative measures of antioxidant activity by radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), the chelating ability and the reducing power of the extracts have been realized. The *in vitro* activity tests were performed on *P. falciparum* isolates from patients with uncomplicated malaria and reference strains (3D7 and Dd2). The method of microtitration plates based on reading SYBR Green fluorescence by an apparatus of Spectra max GEMINI XPS (Molecular Devices) was used. Chloroquine, quinine and artesunate were chosen as reference antimalarial. Finally the hemolytic activity of the extracts and partitions exhibited good antiplasmodial activities has been studied. Phytochemical study results shown richness of plants in secondary metabolites. Crude extracts and partitions tested were active on the DPPH by giving a yellow spot on purple background. The best antiplasmodial activities with crude extract were obtained with decoction of *Dialium dinklagei* ($IC_{50}=12.8\pm 2.4$ $\mu\text{g/mL}$), *Cnestis ferruginea* ($IC_{50}=11.78\pm 2.2$ $\mu\text{g/mL}$) and the methanolic extract of *Newbouldia laevis* ($IC_{50}=10.21\pm 3.2$ $\mu\text{g/mL}$). Liquid-liquid partition allowed us to significantly improve the antiplasmodial activity from 10 $\mu\text{g/mL}$ for crude extracts about 1 $\mu\text{g/mL}$ for fractions from the partitions. Indeed, fractions F_3 *Dialium dinklagei*, F_3 *Newbouldia laevis*, and F_2 *Cnestis ferruginea* gave the best results respectively 1.22 \pm 0.37 $\mu\text{g/mL}$, 6.11 \pm 1.3 $\mu\text{g/mL}$ and 4.37 \pm 0.77 $\mu\text{g/mL}$. Chloroquine, artesunate and quinine were used as reference molecules and gave IC_{50} that ranged from 33.01 \pm 0.9 and 51.07 \pm 2.2nM for chloroquine, between 2.22 \pm 0.16 and 6.31 \pm 3.01nM for artesunate and 5.76 \pm 0.95 and 44.37 \pm 2.15nM for quinine on the different strains tested. The study of hemolytic activity revealed less than 1% hemolysis at concentrations of 200 $\mu\text{g/mL}$. This work shows a track to find new molecules with antioxidant properties at the same time able to treat malaria.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, hemolytic, *in vitro*, antiplasmodial, partitions, antioxidant