

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

*Union - Discipline - Travail*

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Institut National Polytechnique  
Félix HOUPHOUËT-BOIGNY de Yamoussoukro



Ecole Doctorale Polytechnique

## THESE UNIQUE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE**

**FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY**

*Mention :*

**SCIENCES DES PROCEDES CHIMIQUES, ALIMENTAIRES  
ET ENVIRONNEMENTAUX**

*Spécialité :*

**Chimie des Substances Naturelles**

*Thème :*

---

**OPTIMISATION DE LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT  
TRADITIONNEL A BASE DE TROIS PLANTES (*Azadirachta indica*,  
*Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*) UTILISE DANS LE  
TRAITEMENT DU PALUDISME: EVALUATION PHYSICO-CHIMIQUE,  
TOXICOLOGIQUE ET DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE**

---

Présentée et soutenue publiquement le 18/09/2020

Par **M. BOHUI Gouegoui Serge-Pacôme**

### JURY

<b>M. ASSIDJO Nougou Emmanuel</b>	<b>Professeur Titulaire</b>	<b>INP-HB</b>	<b>Président</b>
<b>M. BEOUROU Sylvain</b>	<b>Maître de Recherches</b>	<b>IPCI</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. EKOUE Tchirioua</b>	<b>Professeur Titulaire</b>	<b>UNA</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. BIEGO Godi Henri Marius</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>UFHB</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. N'GUESSAN Jean David</b>	<b>Professeur Titulaire</b>	<b>UFHB</b>	<b>Co-Directeur</b>
<b>M. ADIMA Amissa Augustin</b>	<b>Maître de Conférences</b>	<b>INP-HB</b>	<b>Co-Directeur</b>

# **DEDICACES**

*Je dédie ce travail :*

**A l'Éternel mon Dieu**

Pour le souffle de vie qu'il renouvelle en moi tous les jours et pour sa présence permanente dans ma vie quelque que soient les circonstances. Ce travail qui m'a été confié est l'œuvre de ses mains. Gloire et honneur te soient rendus !

**A ma mère BOHUI Koko Anne Marie**

Depuis mon enfance, tu as su jouer à la fois les rôles de papa et de maman dans mon éducation. Je t'exprime mon infinie gratitude et mon amour. Que Dieu te garde longtemps auprès de nous et t'accorde de belles années pleines de joies et de satisfactions. Puisse Dieu te bénir !

**A mon épouse SORO Tiénourougo Cynthia**

Durant cette longue et difficile épreuve, tu as accepté de m'accompagner. Ta présence à mes côtés m'a donné de l'assurance, du courage et m'a permis de tenir bon. Merci pour tes encouragements et tes prières. Je t'aime avec toute ma tendresse, mon Amour. Puisse Dieu te bénir !

**A mes enfants BOHUI Anne Netsiah Moriel, BOHUI Ange Eniel Debry, BOHUI Beni Samuel et BOHUI Laurène Victoire**

Je vous aime et je vous remercie pour vos prières pour Papa.

**A mes frères et sœurs**

Je vous aime et vous remercie pour vos prières et votre soutien.

**A la famille KOFFI Nathan**

Pour votre soutien et votre gentillesse. Voyez en ces mots l'expression de mon profond respect et mon infinie reconnaissance.

# **REMERCIEMENTS**

Ce travail de thèse a été l'un des plus grands défis que la vie m'a réservé avec des nombreux obstacles dans sa mise en œuvre. Sa réalisation a été possible grâce à Dieu, qui a suscité des personnes de qualité que j'ai côtoyées et écoutées.

J'adresse mes vifs remerciements à :

- Monsieur **ASSIDJO Nogbou Emmanuel**, Professeur Titulaire au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro, pour avoir accepté de présider le Jury de ma soutenance de thèse malgré son emploi du temps chargé.
- Monsieur **BEOUROU Sylvain**, Maître de Recherches, Chargé de Recherche en parasitologie, chef adjoint de l'Unité de Paludologie à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) pour avoir instruit avec beaucoup d'intérêt et de rigueur ce mémoire et accepté d'être membre du jury en tant que rapporteur.
- Monsieur **EKOU Tchirioua**, Professeur Titulaire à l'Université Nangui Abrogoua (UNA) au Laboratoire de Thermodynamique et Physico-chimie du Milieu (LTPCM) pour avoir instruit avec beaucoup de rigueur ce mémoire et accepté d'être membre du jury en tant que rapporteur.
- Monsieur **BIEGO Godi Henri Marius**, Maître de Conférences à l'Université Félix Houphouët Boigny, pour avoir accepté d'être l'examineur de cette thèse malgré ses nombreuses responsabilités.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **ADIMA Amissa Augustin**, Maître de Conférences au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Vous avez non seulement accordé un intérêt particulier à ce projet, mais votre sens du travail bien fait et votre grande ouverture d'esprit, m'ont permis de mener à bien ce travail. Je voudrais vous remercier pour tous vos enseignements et vos conseils avisés. Recevez cher maître toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **N'GUESSAN Jean David**, Professeur Titulaire de Biochimie au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique et Vice-Doyen chargé de la Pédagogie à l'UFR Biosciences de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Vos critiques m'ont orienté dans mes travaux. Je ne vous remercierais jamais assez pour tous vos efforts et votre disponibilité à mon endroit.

Je remercie Monsieur **YAO Kouassi Benjamin**, Professeur Titulaire à l'Institut National Polytechnique Houphouët Boigny (INP-HB) de Yamoussoukro, Directeur du Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour la réalisation de mes travaux.

Je remercie particulièrement Madame **NIAMKE Bobelé Florence**, Maître de conférences au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro, pour ses conseils avisés et ses encouragements. Votre disponibilité à écouter et vos suggestions lors des corrections resteront gravées dans ma mémoire.

Je remercie Madame **DOSSO Mireille**, Professeur Titulaire de Bactériologie-Virologie et Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Merci infiniment cher maître pour m'avoir ouvert les portes de votre Institut.

Je remercie Monsieur **DJAMAN Allico Joseph**, Professeur Titulaire de Biochimie et de parasitologie au laboratoire de Pharmacologie Biochimique à l'UFR Biosciences de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY pour son soutien.

Je remercie Monsieur **TOURE Offianan André**, Maître de Recherche en Parasitologie-Mycologie, chef du département de parasitologie et mycologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Je vous remercie très sincèrement pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein du département.

Je remercie Monsieur **GNAHOUE Goueh**, Maître de Conférences de Biochimie et de Pharmacologie au laboratoire de Biochimie section SVT à l'Ecole Normale Supérieure. Je vous remercie pour m'avoir ouvert la porte du VIVARIUM pour la réalisation des tests sur la toxicité. Merci cher maître.

Je remercie Monsieur **SORO Siaka**, Maîtres de Conférences de chimie Organique au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de l'INP-HB, pour ses conseils et suggestion qui m'ont aidé à atteindre mes objectifs à travers ses critiques.

Je remercie **Monsieur SORO Yaya**, Maîtres de Conférences de chimie organique au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN), pour ses sages conseils et sa grande disponibilité. Merci cher maitre.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **BOA David**, Professeur Titulaire, Doyen honoraire de l'UFR Sciences Fondamentales et Appliquées de l'UNA, pour avoir disposé de son temps afin de participer aux différents comités de thèse. Merci cher maitre pour vos conseils et ses suggestions lors de ses échanges.

Je remercie Monsieur **DJEDJRO Clément Akmel**, Maîtres de Conférences au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN), pour sa disponibilité dans la production de nos extraits. Grand merci à vous cher maitre.

Je remercie Monsieur **ADJE Felix**, Maîtres Assistant au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN), pour ses conseils avisés.

Je remercie Monsieur **KONAN Kouassi**, Maîtres Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique à l'UFR Biosciences de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, pour sa disponibilité, pour ses conseils avisés.

Je remercie les Docteurs **TUO Karim, YAO Serge, YAO N'Guessan Jean Claude, ATTEMENE Serge, KARAMOKO Cherif, KAMBOU Philippe, YOBOUE Antoinette, KOUASSI Appiah, KONE Kowelton, N'GUESSAN Landry, KOFFY David, DIBI Jacques, SEKA Clovis et KONAN Sylvie**. Je vous suis reconnaissant pour vos différents apports à la réalisation de ce document. Que Dieu bénisse vos différentes carrières

Je tiens particulièrement à remercier **GNONDJUI Albert**, pour m'avoir "coaché", initié à la culture de *Plasmodium falciparum*. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien. Grace à vous, j'ai appris à identifier les différentes souches de *Plasmodium*.

Je remercie les doctorants du laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de Yamoussoukro, qui sont **BAMBA Ismaël, KOUADIO Floresse, DIGBE Thomas, DAN Nixon, N'DA Philippe** pour leur soutien durant ces années.

Je remercie également les doctorants du Laboratoire de Nutrition et Pharmacologie de l'UFR Biosciences et ceux de l'Unité de Paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire **KOUI Tossea, N'DRI Borel, KOUMAN Angelo, DIBI Saint Didier, KOUDOU Marina**, pour leur entière disponibilité.

Je remercie les doctorants du laboratoire de chimie Organique de l'UFR SSMT **GNAHORE Toussaint, DEGNY Lise, NEA Fatim, N'GORAN Eroï** pour leur entière disponibilité.

Je te suis infiniment reconnaissant ma chère et tendre épouse **BOHUI Cynthia**, Pour ta patience, ton amour et ton soutien indéfectible pendant la réalisation de ce travail. Merci pour tous tes efforts, tes prières et pour le bonheur et la joie de vivre que tu me procures chaque jour.

Je remercie **SORO Abraham Yassougo**, pour ton soutien indéfectible pendant la réalisation de ce travail. Merci pour tous tes efforts mon beau-frère.

Je remercie également **KONE Adama**, pour ton soutien indéfectible pendant la réalisation de ce travail. Merci pour toutes tes prières.

Enfin, je tiens à remercier affectueusement tous les membres de ma famille, ma belle-famille et la famille **KOFFI Nathan** pour leur soutien moral, financier et surtout pour leurs conseils avisés durant mon parcours scolaire et universitaire. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude.

Que tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail et qui n'ont pas pu être cités, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Merci à tous pour tout.

Puisse Dieu vous bénir !

# **AVANT-PROPOS**

Les travaux de recherche ayant abouti à la rédaction de ce document ont été réalisés au Laboratoire des Procédés Industriels, de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN) de Yamoussoukro et au Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique de l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët- Boigny (UFHB). Au cours de sa réalisation, cette thèse a bénéficié de la collaboration de l'Unité de paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et du laboratoire de Biochimie section SVT à l'Ecole Normale Supérieure.

Ce travail s'inscrit dans l'axe de la valorisation de la médecine traditionnelle africaine. Il est motivé par plusieurs facteurs : la lutte contre le paludisme, les limites et les effets indésirables de certains médicaments dits "conventionnels", la volonté d'apporter une preuve scientifique permettant de confirmer ou d'infirmer les usages bénéfiques des recettes à base de plantes médicinales africaines dans le traitement traditionnel du paludisme, la nécessité des études précliniques et cliniques pour la mise au point des médicaments traditionnels améliorés. C'est dans ce cadre que la présente étude a donc été effectuée sur la recette « Ahoutou », décocté d'un mélange de feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*, utilisé traditionnellement pour soigner le paludisme par certaines populations de Côte d'Ivoire. L'étude a consisté à faire une étude phytochimique et des expérimentations *in vitro* pour l'évaluation des potentialités antioxydantes et antiplasmodiales de la recette. Aussi, ce travail a consisté à évaluer la toxicité aiguë et subaiguë de la recette chez le rat wistar.

# **TABLE DES MATIERES**

DEDICACES .....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
AVANT-PROPOS.....	viii
TABLE DES MATIERES .....	x
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	xxi
LISTE DES FIGURES .....	xxiv
LISTE DES TABLEAUX .....	xxvii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
I-1- GENERALITES SUR LE PALUDISME .....	6
I-1-1- Paludisme .....	6
I-1-2- Epidémiologie .....	6
I-1-3- Agents responsables .....	7
I-1-4- Cycle évolutif du <i>Plasmodium</i> .....	9
I-1-4-1- Multiplication sexuée chez l’anophèle .....	9
I-1-4-2- Multiplication asexuée chez l’Homme .....	10
I-1-4-2-1- Phase exo-érythrocytaire .....	10
I-1-4-2-2- Phase endo-érythrocytaire .....	10
I-1-5- Signes cliniques du paludisme .....	12
I-1-5-1- Paludisme simple .....	12
I-1-5-1-1- Paludisme simple de primo-invasion .....	13
I-1-5-1-2- Paludisme simple du sujet immun .....	13
I-1-5-2- Paludisme grave .....	13
I-1-6- Diagnostic du paludisme.....	14
I-1-6-1- Microscopie .....	14
I-1-6-1-1- Goutte épaisse .....	14

I-1-6-1-2- Frottis sanguin.....	15
I-1-6-2- Tests indirects .....	17
I-1-6-2-1- Sérologie.....	17
I-1-6-2-2- Microscopie de fluorescence directe .....	17
I-1-6-2-3- Tests de diagnostic rapide (TDR) : recherche d'antigènes.....	17
I-1-6-2-4- Polymérase Chain Réaction (PCR) .....	18
I-1-7- Traitement .....	18
I-1-7-1- Antipaludiques .....	18
I-1-7-1-1- Schizonticides naturels .....	18
I-1-7-1-2- Schizonticides hémisynthétiques .....	19
I-1-7-1-3- Schizonticides synthétiques .....	19
I-1-7-1-4- Schizonticides antibiotiques : la doxycycline.....	20
I-1-7-2- Combinaisons thérapeutiques antipaludiques .....	20
I-1-8- Résistance aux antipaludiques.....	21
I-1-8-1- Mécanismes de résistance aux antipaludiques .....	21
I-1-8-2- Bases génétiques de la pharmaco-résistance .....	22
I-1-8-3- Causes de la pharmaco-résistance .....	23
I-1-8-3-1- Pauvreté.....	23
I-1-8-3-2- Prévalence des infections asymptomatiques.....	23
I-1-9- Plantes comme remèdes antipaludiques .....	23
I-1-10- Étude de la résistance plasmodiale .....	24
I-1-10-1- Test <i>in vivo</i> .....	24
I-1-10-2- Tests <i>ex vitro</i> et <i>in vitro</i> .....	25
I-2- Généralités sur les plantes étudiées .....	26
I-2-1- <i>Azadirachta indica</i> .....	26
I-2-1-1- Description de la plante .....	26
I-2-1-2- Origine et répartition géographique .....	27

I-2-1-3- Aspect botanique .....	27
I-2-1-4- Usages thérapeutiques traditionnels .....	28
I-2-1-5- Données Phytochimiques.....	29
I-2-1-6- Données Pharmacologiques .....	29
I-2-1-7- Données Toxicologiques .....	29
I-2-2- <i>Cymbopogon citratus</i> .....	30
I-2-2-1- Description de la plante .....	30
I-2-2-2- Répartition géographique.....	31
I-2-2-3- Aspect Botanique .....	31
I-2-2-4- Usages thérapeutiques traditionnels .....	32
I-2-2-5- Données Phytochimiques.....	33
I-2-2-6- Données Pharmacologiques .....	33
I-2-2-7- Données Toxicologiques .....	34
I-2-3- <i>Psidium guajava</i> .....	34
I-2-3-1- Description de la plante .....	34
I-2-3-2- Répartition géographique.....	35
I-2-3-3- Aspect Botanique .....	35
I-2-3-4- Usages thérapeutiques traditionnels .....	37
I-2-3-5- Données Phytochimiques.....	37
I-2-3-6- Données Pharmacologiques .....	38
I-2-3-7- Données Toxicologiques .....	38
I-3- Etude de la biotolérance .....	39
I-3-1- Notion de toxicité .....	39
I-3-2- Toxicité aiguë .....	39
I-3-2-1- Définition .....	39
I-3-2-2- Dose létale 50.....	39
I-3-3- Toxicité subaiguë .....	40

I-3-4- Toxicité subchronique .....	41
I-3-5- Toxicité chronique.....	41
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....	42
II-1- Matériel.....	43
II-1-1- Produit expérimental et matériel végétal.....	43
II-1-1-1- Produit expérimental .....	43
II-1-1-2- Matériel végétal .....	43
II-1-2- Matériel animal .....	45
II-1-3- Souches de plasmodies .....	45
II-1-4- Globules rouges sains.....	45
II-1-5- Matériel et réactifs.....	46
II-1-5-1- Matériel technique et réactifs pour les tests phytochimiques et antioxydants.....	46
II-1-5-2- Matériel technique, milieux de culture et réactifs pour les tests <i>in vitro</i> .....	46
II-1-5-3- Matériel technique et réactifs pour les tests de toxicologies .....	47
II-1-5-4- Matériel technique et réactifs pour l'identification des composés par la méthode HPLC.....	47
II-2- Méthodes.....	47
II-2-1- Enquête ethnobotanique sur l'utilisation de la recette « <i>Ahoutou</i> ».....	47
II-2-2- Paramètres physico-chimiques de la recette « <i>Ahoutou</i> » et des plantes qui la composent .....	48
II-2-2-1- Teneur en eau par la méthode gravimétrique .....	48
II-2-2-2- Teneur en matière sèche .....	48
II-2-2-3- Teneur en cendre totales.....	49
II-2-3- Obtention de l'extrait sec de <i>Ahoutou</i> .....	49
II-2-4- Extraction.....	49
II-2-4-1- Décoction.....	49
II-2-4-2- Infusion.....	49
II-2-4-3- Macération aqueuse.....	50

II-2-4-4- Macération hydroalcoolique .....	51
II-2-5- Détermination du rendement d'extraction .....	51
II-2-6- Extraction des flavonoïdes totaux des extraits issus de la combinaison de trois plantes .....	52
II-2-6-1- Paramètres d'études .....	52
II-2-6-2- Traitement mathématique .....	52
II-2-6-3- Caractéristiques du plan .....	54
II-2-7- Analyses qualitatives .....	55
II-2-7-1- Criblage phytochimique .....	55
II-2-7-2- Activité antiradicalaire : Test qualitatif du DPPH .....	56
II-2-7-3- Préparation des solutions .....	57
II-2-8- Analyse quantitative .....	57
II-2-8-1- Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux .....	57
II-2-8-2- Dosage spectrophotométrie des flavonoïdes totaux .....	58
II-2-8-3- Evaluation de l'activité antioxydante .....	58
II-2-8-3-1- Mesure du pouvoir antiradicalaire : Test quantitatif du DPPH .....	58
II-2-8-3-2- Piégeage du ABTS .....	59
II-2-9- Détermination du profil en polyphénols et en alcaloïdes de Ahoutou et des extraits optimisés par HPLC .....	60
II-2-9-1- Détermination des composés par dosage HPLC .....	60
II-2-9-2- Principe .....	61
II-2-9-3- Conditions d'analyse des polyphénols .....	61
II-2-10- Tests réalisés sur <i>Plasmodium falciparum</i> .....	63
II-2-10-1- Préparation des milieux de cultures .....	63
II-2-10-2- Culture continue .....	64
II-2-10-2-1- Décongélation des souches de <i>Plasmodium falciparum</i> (Basco, 2007) .....	64
II-2-10-2-2- Préparation des hématies saines .....	64
II-2-10-2-3- Mise en culture de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	65

II-2-10-2-4- Entretien quotidien de la culture et contrôle de la parasitémie.....	65
II-2-10-2-5- La synchronisation .....	66
II-2-10-3- Culture <i>ex-vivo</i> .....	66
II-2-10-3-1- Collecte des échantillons.....	66
II-2-10-3-2- Préparation des globules rouges parasités.....	67
II-2-10-3-3- Préparation de l'inoculum .....	67
II-2-10-3-4- Préparation de la gamme de concentration.....	67
II-2-10-3-5- Incubation et lecture.....	70
II-2-10-3-6- Expression des résultats .....	72
II-2-11- Dosage quantitatif des minéraux.....	72
II-2-11-1- Préparation de l'échantillon.....	72
II-2-11-2- Préparation des réactifs .....	73
II-2-11-2-1- Réactif de Lanthane .....	73
II-2-11-2-2- Réactif d'étalon.....	73
II-2-12- Eude des toxicités.....	74
II-2-12-1- Evaluation de la toxicité aiguë d'Ahoutou et des extraits optimisés .....	74
II-2-12-1-1- Principe .....	74
II-2-12-1-2- Conduite de l'expérimentation .....	74
II-2-12-2- Evaluation de la toxicité subaiguë .....	76
II-2-12-2-1- Détermination de la dose thérapeutique de la recette « Ahoutou ».....	76
II-2-12-2-1-1- Mode opératoire.....	76
II-2-12-2-1-2- Répartition des rats en lots :.....	77
II-2-12-2-2- Administration des extraits.....	77
II-2-12-2-3- Evaluation de la masse pondérale des animaux.....	77
II-2-12-2-4- Evaluation des paramètres biochimiques .....	78
II-2-12-2-4-1- Dosage de la créatine kinase MB (CK-MB) .....	78

II-2-12-2-4-2- Mesure de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase sérique (ASAT) .....	79
II-2-12-2-4-3- Mesure de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase sérique (ALAT) .....	79
II-2-12-2-4-4- Dosage de l'urée .....	80
II-2-12-2-4-5- Dosage de la créatinine .....	81
II-2-13- Analyse statistique des résultats.....	81
<b>PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>82</b>
III-1- Enquête sur l'utilisation de Ahoutou.....	83
III-1-1- Résultats .....	83
III-1-2- Discussion .....	84
III-2- Propriétés physico-chimiques, phytochimie et activité antiplasmodiale .....	84
III-2-1- Résultats de la Recette Ahoutou .....	84
III-2-1-1- Propriétés physico-chimiques.....	84
III-2-1-2- Criblage phytochimique .....	85
III-2-1-3- Teneurs en composés phénoliques.....	85
III-2-1-4- Activités antioxydantes .....	86
III-2-1-4-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM .....	86
III-2-1-4-2- Test quantitatif : Pouvoir antiradicalaire .....	86
III-2-1-5- Activités antiplasmodiales .....	87
III-2-1-6- Discussion partielle.....	89
III-2-2- Résultats des feuilles de <i>Azadirachta indica</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> et de <i>Psidium guajava</i> .....	91
III-2-2-1- Propriétés physico-chimiques.....	91
III-2-2-2- Criblage phytochimique .....	91
III-2-2-3- Rendements d'extraction.....	92
III-2-2-4- Teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux .....	93
III-2-2-5- Activités antioxydantes .....	94

III-2-2-5-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM .....	94
III-2-2-5-2- Test quantitatif du DPPH et ABTS .....	95
III-2-2-6- Activités antiplasmodiales .....	96
III-2-2-7- Discussion partielle.....	97
III-2-3- Discussion générale .....	99
III-3- Optimisation des extractions par décoction, par infusion et par macération des polyphénols (flavonoïdes) des feuilles de la recette Ahoutou .....	101
III-3-1- Résultats .....	101
III-3-1-1- Dosage des flavonoïdes totaux .....	101
III-3-1-2- Analyse de précision et de variance du modèle de régression .....	102
III-3-1-3- Analyse des coefficients du modèle de régression et estimation de la teneur en flavonoïdes .....	102
III-3-1-4- Optimisation de la teneur en flavonoïde dans la préparation du Ahoutou..	103
III-3-1-5- Validation par l'expérience du choix indiqué par le plan factoriel mixte...	103
III-3-2- Discussion .....	103
III-4- Propriétés physico-chimiques, phytochimie et activité antiplasmodiale des extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique .....	104
III-4-1- Résultats .....	105
III-4-1-1- Propriétés physico-chimiques.....	105
III-4-1-2- Criblage phytochimique .....	105
III-4-1-3- Rendements d'extraction.....	106
III-4-1-4- Teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux .....	106
III-4-1-5- Activité antioxydante .....	108
III-4-1-5-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM .....	108
III-4-1-5-2- Test quantitatif : Test DPPH et test ABTS .....	108
III-4-1-6- Activités antiplasmodiales des extraits optimisés .....	110
III-4-2- Discussion .....	110

III-5- Profil en polyphénols et en alcaloïdes de Ahoutou et des formulations de décoction et hydroéthanolique par HPLC.....	113
III-5-1- Résultats .....	113
III-5-2- Discussion .....	114
III-6- Quantification des minéraux.....	116
III-6-1- Résultats .....	116
III-6-2- Discussion .....	116
III-7- Etude de la toxicité de « Ahoutou » et des nouvelles formulations de Ahoutou .....	118
III-7-1- Toxicité aiguë .....	118
III-7-1-1- Résultats .....	118
III-7-1-1-1- Signes cliniques d'intoxication .....	118
III-7-1-1-2- Mortalité.....	118
III-7-1-1-3- Effet de Ahoutou et des formulations sur le poids corporel des rats.....	119
III-7-1-2- Discussion .....	120
III-7-2- Toxicité subaigüe.....	120
III-7-2-1- Résultats.....	120
III-7-2-1-1- Effets de Ahoutou et des formulations sur le poids corporel chez les rats wistar .....	120
III-7-2-1-2- Effets de Ahoutou et des formulations sur le poids des organes prélevés chez le rats wistar .....	122
III-7-2-1-3- Effets de Ahoutou et des formulations sur les paramètres biochimiques chez le rats wistar .....	123
III-7-2-1-4- Effets de Ahoutou et des formulations sur les paramètres hépatiques chez le rats wistar.....	124
III-8-2-1-5- Effets de Ahoutou et des formulations sur l'un des paramètres du cœur chez le rats wistar .....	126
III-7-2-2- Discussion .....	126
CONCLUSION GENERALE.....	129

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	132
ANNEXE .....	157
COMMUNICATIONS .....	162
PUBLICATION .....	164

# **LISTE DES ABBREVIATIONS**

<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribo Nucléique
<b>Ag</b>	: Antigène
<b>AL</b>	: Artéméther/Luméfantrine
<b>ASAQ</b>	: Artésunate/Amodiaquine
<b>CIVD</b>	: Coagulation Intravasculaire Disséminée
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CPN</b>	: Consultation Périnatale
<b>CTA</b>	: Combinaison Thérapeutique à base de dérivé d'Artémisinine
<b>CQ</b>	: Chloroquine
<b>DDT</b>	: Dichloro Diphényl Trichloroéthane
<b>DHA</b>	: Dihydroartémisinine
<b>DHFR</b>	: Dihydrofolate Réductase
<b>DHPS</b>	: Dihydroptéroate-Synthétase
<b>EDTA</b>	: Ethylène Diamine Tétracétate
<b>ECT</b>	: Echec clinique tardif
<b>EPT</b>	: Echec Parasitologique Tardif
<b>ETT</b>	: Echec Thérapeutique Tardif
<b>ETP</b>	: Echec Thérapeutique Précoce
<b>ET</b>	: Echec thérapeutique
<b>FS</b>	: Frottis Sanguin
<b>G6PD</b>	: Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
<b>GE</b>	: Goutte Epaisse
<b>GPARC</b>	: Global plan for artemisinin resistance containment
<b>HRP 2</b>	: Histidine Rich Protein 2
<b>Ig G</b>	: Immunoglobuline G
<b>Ig M</b>	: Immunoglobuline M
<b>LDH</b>	: lactate-déshydrogénase
<b>MILDA</b>	: Moustiquaire Imprégnée à Longue Durée d'Action
<b>mM</b>	: Millimolaire
<b>MSF</b>	: Malaria SYBR Green-I Based Fluorescence
<b>msp1</b>	: Merozoït surface protein 1
<b>msp2</b>	: Merozoït surface protein 2
<b>OMD</b>	: Objectif du Millénaire pour le Développement
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé

- ONU** : Organisation des Nations Unies
- OUA** : Organisation de l'Unité Africaine
- PABA** : Acide Para-Amino Benzoïque
- PAMCP** : Plan d'action mondial contre le paludisme (PAMCP)
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PfATPase 6** : *Plasmodium falciparum* Adenosine Triphosphatase 6
- Pfcr1** : *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter

# **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Répartition géographique du paludisme dans le monde (OMS, 2018) .....	7
<b>Figure 2</b> : Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i> (Ménard et al., 2013).....	11
<b>Figure 3</b> : Formes sanguines de <i>Plasmodium falciparum</i> (Flamand, 2005).....	12
<b>Figure 4</b> : Trophozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> et leucocytes observés sur une goutte épaisse colorée au Giemsa (Le-Bras, 2006) .....	15
<b>Figure 5</b> : Formes en anneau (Ring form), trophozoïtes et schizontes ayant libéré des mérozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> coloré au Giemsa (Salery, 2007) .....	16
<b>Figure 6</b> : Gamétocytes de <i>Plasmodium falciparum</i> observés sur un frottis sanguin fixé au méthanol et coloré au Giemsa (Salery, 2007).....	16
<b>Figure 7</b> : Les feuilles de <i>Azadirachta indica</i> (Herbal, 2018).....	28
<b>Figure 8</b> : <i>Cymbopogon citratus</i> (Côte d’Ivoire) (Kouame et al., 2015).....	32
<b>Figure 9</b> : Les feuilles de <i>Psidium guajava</i> (Laborpresse.net, 2014) .....	36
<b>Figure 10</b> : Bouteille en plastique contenant une solution de « Ahoutou » .....	43
<b>Figure 11</b> : Matériel végétal ( <i>Azadirachta indica</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> et <i>Psidium guajava</i> ) .....	44
<b>Figure 12</b> : Rat mâle de souche Wistar, âgé de 11 semaines .....	45
<b>Figure 13</b> : Schéma d’extraction par macération, par infusion et par décoction dans l’eau .....	50
<b>Figure 14</b> : Schéma d’extraction à partir d’éthanol-eau (70/30 ; v/v) .....	51
<b>Figure 15</b> : Réaction de réduction du DPPH (Blois, 1958).....	58
<b>Figure 16</b> : HPLC SHIMADZU SPD 20 A.....	61
<b>Figure 17</b> : Milieux de culture.....	64
<b>Figure 18</b> : Mise en Culture de <i>Plasmodium falciparum</i> dans des flasques à culture.....	65
<b>Figure 19</b> : Ajout de l’inoculum dans une Plaque à 96 puits contenant les Extraits .....	69
<b>Figure 20</b> : Plaques de culture à 96 puits .....	70
<b>Figure 21</b> : Spectrofluorimètre, BIOTEK FLX 800 couplé à un ordinateur utilisé pour la mesure de l’activité antiplasmodiale .....	71
<b>Figure 22</b> : Schéma d’essai avec une dose initiale de 2000 mg/kg .....	75
<b>Figure 23</b> : Administration des extraits par gavage.....	77
<b>Figure 24</b> : Tache jaune sur fond violet indiquant l’activité antiradicalaire de l’extrait de Ahoutou.....	86
<b>Figure 25</b> : Capacité antioxydante de Ahoutou selon les tests au DPPH et d’ABTS.....	87
<b>Figure 26</b> : Modèle de courbe d’inhibition pour la détermination de la CI <sub>50</sub> des différentes drogues (pantes et molécule de référence) sur la croissance de <i>Plasmodium falciparum</i> ..	88

<b>Figure 27</b> : Screening de l'activité antioxydante par bioautographie des extraits bruts des plantes étudiées et de Ahoutou en utilisant le DPPH comme révélateur .....	95
<b>Figure 28</b> : Teneurs en Flavonoïdes totaux des différents extraits étudiés .....	107
<b>Figure 29</b> : Teneurs en Polyphénols totaux des différents extraits étudiés.....	107
<b>Figure 30</b> : Screening de l'activité antioxydante par bioautographie des extraits des formulations en utilisant le DPPH comme révélateur .....	108
<b>Figure 31</b> : Valeurs des $CI_{50}$ de Ahoutou et des extraits optimisés .....	109
<b>Figure 32</b> : Capacité antioxydante des différents extraits par la méthode ABTS .....	110
<b>Figure 33</b> : Représentation graphique des résultats de HPLC.....	114
<b>Figure 34</b> : Poids moyen en gramme (g) des rats en fonction du temps de traitement....	119
<b>Figure 35</b> : Effet de l'extrait d'Ahoutou ( $E_{13}$ ) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement. ....	121
<b>Figure 36</b> : Effet de l'extrait de la formulation de décoction ( $E_{14}$ ) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement. (*) significatif à $p < 0,05$ par rapport au témoin. ....	121
<b>Figure 37</b> : Effet de l'extrait de la formulation hydroéthanolique ( $E_{16}$ ) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement.....	122
<b>Figure 38</b> : Les organes prélevés des Rats .....	122

# **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I</b> : Répartition géographique des 5 espèces plasmodiales humaines .....	9
<b>Tableau II</b> : Position systématique de <i>Azadirachta indica</i> .....	26
<b>Tableau III</b> : Noms vernaculaires de <i>Azadirachta indica</i> de quelques pays.....	26
<b>Tableau IV</b> : Position systématique de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	30
<b>Tableau V</b> : Noms vernaculaires de <i>Cymbopogon citratus</i> de quelques pays .....	31
<b>Tableau VI</b> : Position systématique de <i>Psidium guajava</i> .....	35
<b>Tableau VII</b> : Noms vernaculaires de <i>Psidium Guajava</i> de quelques pays .....	35
<b>Tableau VIII</b> : Les différentes formes de toxicité.....	39
<b>Tableau IX</b> : Exemple de classification de la toxicité : cas de la toxicité orale aiguë chez le rat ( <b>Lauwerys et al., 2007</b> ).....	40
<b>Tableau X</b> : Facteurs principaux et leurs domaines de variation .....	53
<b>Tableau XI</b> : Les différents codes des paramètres technologiques .....	53
<b>Tableau XII</b> : Caractéristiques du plan.....	54
<b>Tableau XIII</b> : Les différents essais de l'expérience .....	55
<b>Tableau XIV</b> : Table du gradient d'élution des extraits en HPLC.....	62
<b>Tableau XV</b> : Temps de rétention des composés phénoliques standards .....	62
<b>Tableau XVI</b> : Plan de plaque des isolats cliniques et de la souche de référence de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	68
<b>Tableau XVII</b> : Classification de l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes et des composés purs isolés ( <b>Bero et al., 2009; Beourou et al., 2017</b> ). .....	72
<b>Tableau XVIII</b> : Différentes catégories de classe de toxicité aiguë .....	76
<b>Tableau XIX</b> : Résultats de l'enquête sur la recette Ahoutou .....	83
<b>Tableau XX</b> : Propriétés physico-chimiques de la recette Ahoutou .....	85
<b>Tableau XXI</b> : Caractérisation phytochimique de Ahoutou .....	85
<b>Tableau XXII</b> : Teneur en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de Ahoutou .....	86
<b>Tableau XXIII</b> : Activité antiplasmodiale de Ahoutou sur les isolats cliniques et la souche de référence Dd2.....	89
<b>Tableau XXIV</b> : Propriétés physico-chimiques des feuilles de <i>Azadirachta indica</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> et de <i>Psidium guajava</i> .....	91
<b>Tableau XXV</b> : Screening phytochimique des extraits aqueux des feuilles de <i>Azadirachta indica</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> et <i>Psidium guajava</i> .....	92

<b>Tableau XXVI :</b> Rendements d'extraction des extraits aqueux obtenus à partir des feuilles de <i>A. indica</i> , <i>C. citratus</i> et <i>P. guajava</i> à différents par décoction, par macération et par infusion .....	92
<b>Tableau XXVII :</b> Teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux des extraits aqueux des feuilles de <i>Azadirachta indica</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> et <i>Psidium guajava</i> .....	94
<b>Tableau XXVIII:</b> Valeurs des $CI_{50}$ du test de DPPH et de l'ABTS des extraits aqueux ..	96
<b>Tableau XXIX :</b> $CI_{50}$ des extraits sur 4 isolats cliniques et la souche de référence Dd2 ..	96
<b>Tableau XXX :</b> Matrice des trois variables utilisées pour l'extraction des flavonoïdes des différentes permutations mélange de feuilles de <i>A. indica</i> , <i>C. citratus</i> et <i>P. guajava</i> .....	101
<b>Tableau XXXI :</b> Les effets du modèle de la réponse .....	102
<b>Tableau XXXII :</b> Valeur expérimentale et théorique.....	103
<b>Tableau XXXIII :</b> Propriétés physico-chimiques de la recette Ahoutou .....	105
<b>Tableau XXXIV :</b> Caractérisation phytochimique des extraits issus des formulations ..	105
<b>Tableau XXXV :</b> Rendement d'extraction des extraits des formulations .....	106
<b>Tableau XXXVI :</b> Valeurs des $CI_{50}$ des extraits sur les isolats et la souche de référence Dd2 .....	110
<b>Tableau XXXVII :</b> Composition en oligo-éléments ( $\mu\text{g/g}$ ) des extraits d'Ahoutou, décoction et hydroéthanolique optimisées .....	116
<b>Tableau XXXVIII :</b> Résultats de l'observation des animaux durant les premières 24 heures et tous les jours durant 14 jours après administration orale de Ahoutou et des formulations. ....	118
<b>Tableau XXXIX :</b> Mortalité des rats en fonction de la dose de Ahoutou et des formulations .....	119
<b>Tableau XL :</b> Effet des extraits de Ahoutou ( $E_{13}$ ) et des formulations de décoction ( $E_{14}$ ) et hydroéthanolique ( $E_{16}$ ) sur le poids relatif des organes chez le rat après 28 jours de traitement .....	123
<b>Tableau XLI :</b> Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à $J_0$ .....	124
<b>Tableau XLII :</b> Effet des extraits de Ahoutou ( $E_{13}$ ) et des formulations de décoction ( $E_{14}$ ) et hydroéthanolique ( $E_{16}$ ) sur les paramètres rénaux des rats après 28 jours de traitement .....	124
<b>Tableau XLIII :</b> Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à $J_0$ .....	125

<b>Tableau XLIV</b> : Effet des extraits de Ahoutou (E <sub>13</sub> ) et des formulations de décoction (E <sub>14</sub> ) et hydroéthanolique (E <sub>16</sub> ) sur les paramètres hépatiques des rats après 28 jours de traitement .....	125
<b>Tableau XLV</b> : Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à J <sub>0</sub> .....	126
<b>Tableau XLVI</b> : Effet des extraits de Ahoutou (E <sub>13</sub> ) et des formulations de décoction (E <sub>14</sub> ) et hydroéthanolique (E <sub>16</sub> ) sur l'un des paramètres du cœur des rats après 28 jours de traitement .....	126

# **INTRODUCTION GENERALE**

L'utilisation des plantes médicinales en thérapie à travers le monde est une pratique très ancienne. Cette pratique connaît actuellement un regain d'intérêt auprès de la population et cela malgré les progrès de la médecine moderne. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale a recours à la médecine dite traditionnelle pour faire face à ses problèmes de santé (OMS, 2008). Cet engouement s'explique par le fait que de nombreuses maladies sont traitées de manière satisfaisante et à moindre coût par les plantes (Kamanyi *et al.*, 1995). Ce recours à la médecine traditionnelle est aussi favorisé par le faible pouvoir d'achat des populations cibles. Cet état de fait entraîne l'inaccessibilité aux médicaments conventionnels compte tenu de leur coût élevé. Bien qu'ayant des propriétés pharmacologiques avérées, de multiples effets secondaires sont dévolus aux remèdes à base de plantes et leurs effets seraient de types cardiovasculaires, neurologiques, hépatiques et rénaux (Isnard *et al.*, 2004). Ces effets observés seraient dus à la présence de métabolites secondaires bioactifs contenus dans ses préparations médicinales pouvant être toxiques (Larrey, 1997).

L'étude des plantes médicinales s'avère donc nécessaire. Une telle étude permet de rechercher les preuves scientifiques de leur efficacité, de déterminer leur limite de tolérance en vue d'une utilisation rationnelle. Elle permet également de caractériser et de purifier de nouvelles molécules bioactives en vue de la production de médicaments.

En effet, l'absence de doses et d'une posologie précises et la méconnaissance des effets toxiques de ces plantes constituent un frein à leur utilisation. A cet effet, diverses équipes de recherches orientent depuis plusieurs années leurs travaux sur la valorisation des plantes médicinales à travers l'étude de leur biotolérance d'une part. D'autre part, ces études s'intéressent aux potentialités thérapeutiques des plantes contre diverses pathologies dont le paludisme.

Le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle transmise à l'homme par les moustiques femelles du genre *Anopheles* et qui s'accompagne de divers symptômes, principalement la fièvre (OMS, 2017). Cette maladie constitue aujourd'hui un problème de santé publique dans les régions tropicales et subtropicales de la planète (Rocha *et al.*, 2011). Selon le dernier rapport de l'OMS, le nombre de cas de paludisme dans le monde est estimé à 228 millions avec 405000 décès en 2018 (WHO, 2019). La plupart des cas (213 millions ou 93 %) et des décès (94 %) ont été enregistrés en 2018 en Afrique.

L'Afrique subsaharienne reste toujours la région la plus touchée par cette maladie au niveau mondial. En effet, dix-neuf pays d'Afrique subsaharienne et l'Inde ont concentré quasiment 85 % du nombre total de cas de paludisme dans le monde (WHO, 2019).

La Côte d'Ivoire n'est pas épargnée par cette situation. En effet, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique, par sa fréquence élevée, sa gravité et ses conséquences socio-économiques importantes. Le paludisme constitue à lui seul, 33 % des motifs de consultation et la première cause d'hospitalisation dans les centres de santé. Les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans sont les plus atteints. Le nombre de cas liés au paludisme a été de 3 557 891 en 2017 avec un nombre de décès de 3 222 (**Anonyme1, 2018**). Il est donc nécessaire de disposer de médicaments efficaces pour lutter contre ce fléau.

Face à un tel problème de santé publique, des stratégies de lutte ont été développées. L'emploi de la chloroquine et des monothérapies ont alors été abandonnée au profit des combinaisons thérapeutiques à base de l'artémisinine ou de ses dérivés (CTA). Aujourd'hui, la thérapie de combinaison à base d'artémisinine (CTA) est utilisée comme traitement de première ligne pour le paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* dans plus de 100 pays (**Chenq et al., 2012**). Malheureusement, ces dernières années, la résistance du parasite à l'artémisinine a été détectée dans quatre pays notamment, le Cambodge, le Myanmar, la Thaïlande et le Vietnam (**Cui et al., 2015**). L'OMS estime que si la résistance à l'artémisinine se propageait à une grande échelle, les conséquences pour la santé des populations seraient désastreuses. C'est ainsi que dans l'espoir d'apporter une réponse adaptée à ces résistances observées chez *Plasmodium falciparum*, le développement de la recherche sur les plantes médicinales, réservoir de nouveaux principes actifs a été suscité (**Kaushik et al., 2013; Nondo et al., 2017**).

Plusieurs travaux de recherches ont déjà été menés en Afrique en générale et particulièrement en Côte d'Ivoire dans cette perspective de valorisation des plantes médicinales. De façon non exhaustive, nous pouvons citer les auteurs tels que **Zirihhi et al. (2007)**, **N'Guessan et al. (2009)**, **Tuo (2015)**, **Tano (2016)** et **Koffi (2017)**. Ces travaux ont montré que plusieurs plantes de la flore ivoirienne possèdent des métabolites secondaires à activité antiplasmodiale. Il s'agit des tanins, des flavonoïdes (quercétine), des polyphénols (acide ellagique), des triterpènes, des sesquiterpènes (nérodiol), des quinones, des alcaloïdes (quinoléines, isoquinoléiques, dibenzoquinoléines, oxo-aporphines), des stéroïdes (**Nassirou et al., 2015 ; Camacho et al., 2000**). Toutefois la prise en charge des malades devient de plus en plus coûteux à cause de la recrudescence du paludisme et du traitement qui n'est pas toujours à la portée des populations des pays en développement. Ces populations ont donc recours aux combinaisons à base de plantes médicinales de tradipraticiens de santé.

Dans la médecine traditionnelle ivoirienne, les tradipraticiens de santé proposent différentes plantes et également diverses recettes à base de combinaisons de plantes pour

soigner les maladies comme l'hypertension artérielle et le paludisme (**Adjanohoun et al., 1987**). Parmi ces recettes utilisées on trouve « Ahoutou », une recette locale du village de « Djahakro » situé dans de la commune de Yamoussoukro (région du Bélier). Cette recette est beaucoup utilisée dans la prise en charge du paludisme dans cette localité et semble avoir une bonne presse auprès de la population villageoise. Selon le tradipraticien qui a élaboré le « Ahoutou », cette recette est constituée de feuilles de trois (3) plantes que sont *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*.

A ce jour, aucune donnée scientifique n'existe sur les propriétés antiplasmodiales de Ahoutou. Les présents travaux s'inscrivent dans la droite ligne de la directive de l'OMS visant la promotion du rôle de la médecine traditionnelle dans le système de santé (**OMS, 2001**). Comme mentionné, Ahoutou est une recette à base de plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne utilisée pour le traitement du paludisme. Il faut souligner que bien que cette recette soit déjà commercialisée au niveau locale et utilisée par les populations pour soigner le paludisme, elle n'a pas encore fait l'objet d'expérimentations scientifiques indispensables pour la mise au point d'un médicament.

L'objectif général de cette thèse est de contribuer à la valorisation des plantes médicinales en proposant une formulation améliorée de la recette « Ahoutou ». Ce travail consistera à tester l'efficacité de la recette « Ahoutou » et de la combinaison des trois plantes qui la compose sur certaines souches de *Plasmodium falciparum* et à évaluer leur toxicité.

De façon spécifique, il s'agira de :

- ✚ Réaliser une enquête permettant de vérifier l'utilisation de la recette « Ahoutou »,
- ✚ Déterminer les propriétés physico-chimiques des extraits étudiés,
- ✚ Optimiser par un plan d'expérience l'extraction des polyphénols (flavonoïdes) à partir de la combinaison des trois plantes étudiées,
- ✚ Evaluer l'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits sur les souches de *P. falciparum*,
- ✚ Evaluer la toxicité aiguë et subaiguë des extraits actifs sur des rats de souche Wistar.

La thèse comporte trois parties. La première partie rapporte les généralités sur le paludisme, les feuilles qui composent la recette Ahoutou et la toxicité. La seconde partie décrit le matériel et les méthodes d'investigation expérimentale. La troisième partie présente les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail et leur discussion, suivie d'une conclusion et des perspectives.

# **PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I-1- GENERALITES SUR LE PALUDISME**

### **I-1-1- Paludisme**

Le paludisme demeure l'une des maladies parasitaires les plus fréquentes et les plus répandues dans le monde. Cette maladie infectieuse est transmise aux humains par la piqûre d'un moustique infecté du genre *Anopheles* qui lui injecte un protozoaire du genre *Plasmodium*, qui se multiplie à l'intérieur des érythrocytes des vertébrés (Corbett *et al.*, 2004). Le paludisme est une maladie associée à la fièvre, l'anémie et à d'autres pathologies (Chen *et al.*, 2016).

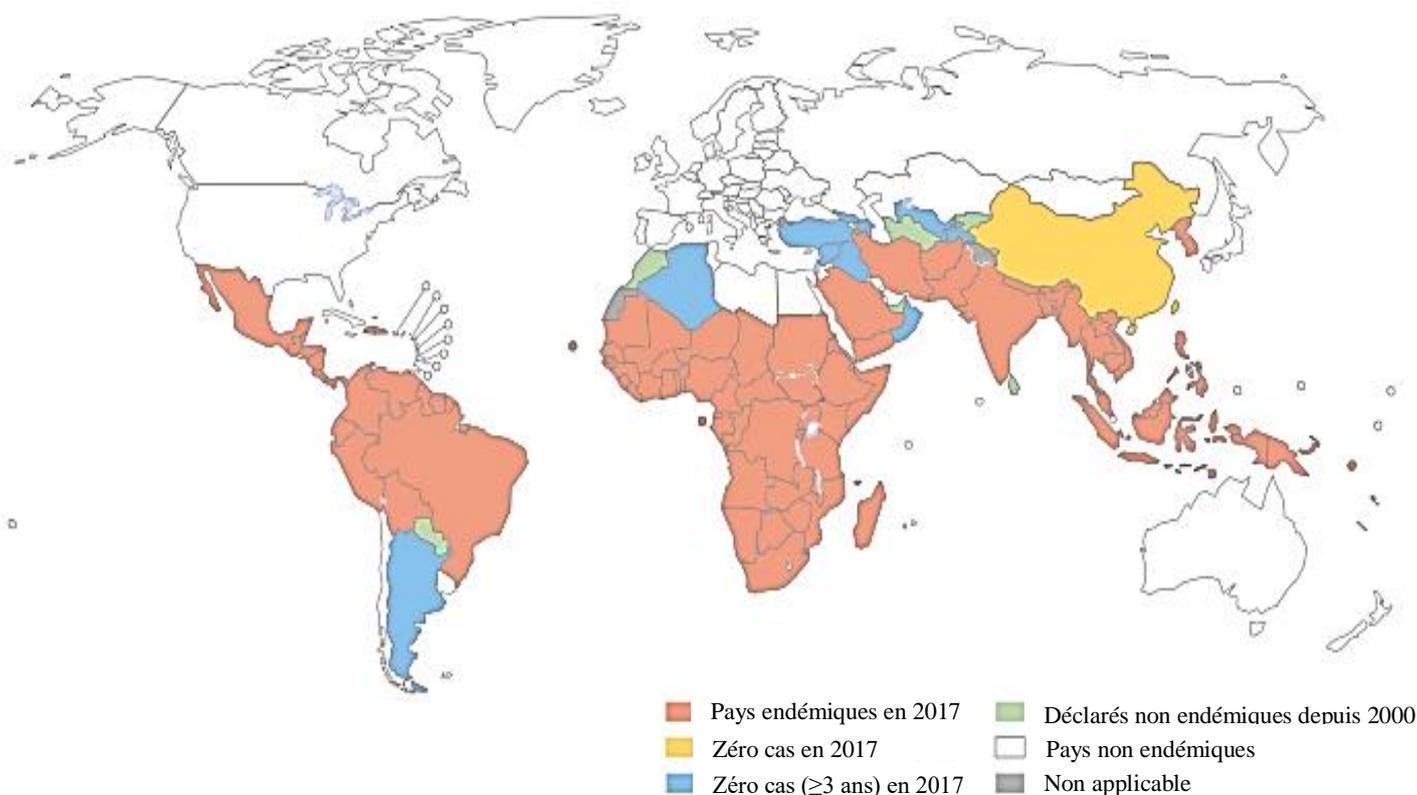
### **I-1-2- Epidémiologie**

Véritable problème majeur de santé publique dans les pays endémiques, le paludisme sévit dans le monde, plus particulièrement dans les pays de l'Afrique subsaharienne à climat tropical et subtropical (Figure 1). La température, l'humidité, le vent, les précipitations sont des facteurs qui influencent le cycle complet du *Plasmodium* et sa transmission d'une personne à une autre (Pascual *et al.*, 2006). L'épidémiologie du paludisme est extrêmement variable d'une zone géographique à une autre. Cette variation de transmission permet de définir différentes zones épidémiologiques, ainsi nous avons :

- **En zone tropicale et humide**, la transmission est permanente avec des poussées épidémiques à la saison des pluies.
- **En zone subtropicale**, le paludisme est plus saisonnier, la transmission n'est possible que durant les mois chauds.
- **En zone tempérée**, la réintroduction du paludisme dans les régions où il a été éradiqué est exceptionnelle. Elle peut arriver en cas d'été chaud ou à proximité d'un aéroport.

La transmission du paludisme se fait généralement par la piqûre d'un moustique, un anophèle femelle. Il peut, dans certains cas, se transmettre en absence de piqûres de moustiques dans le cas de la femme enceinte, de la mère à l'enfant, via le placenta (transmission congénitale) (Menendez *et al.*, 1994).

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



**Figure 1 : Répartition géographique du paludisme dans le monde (OMS, 2018)**

### I-1-3- Agents responsables

Le paludisme est transmis par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*. Il existe cinq espèces de *Plasmodium* qui infestent l'Homme. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*, parasite habituel des singes (macaques) d'Asie qui vient de passer récemment chez l'homme. Les cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. *Le Plasmodium falciparum* se diffère des autres espèces. En effet, *Plasmodium falciparum* est celui qui est le plus largement répandu à travers le monde, qui développe des résistances aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles.

#### ❖ *Plasmodium falciparum* :

L'espèce qui donne la pathologie la plus grave. Il n'existe que chez les humains. *Plasmodium falciparum* est plus rencontré dans les zones tropicale et subtropicale, et sa recrudescence est saisonnière (chaude et humide). Il est responsable de la fièvre tierce maligne

et amène souvent des complications sévères et peut entraîner le décès. Aussi, il a la particularité d'induire une adhérence des globules rouges infectés à l'endothélium des petits vaisseaux (protéines knobs) qui entraîne les complications telle que le paludisme cérébral. De plus, la maturation des schizontes hépatiques est plus rapide (6 jours) que chez les autres espèces (15 jours) et les vecteurs sont nombreux. *Plasmodium falciparum* se transmet donc plus rapidement (**Das et al., 2009**).

❖ *Plasmodium vivax* :

Ce parasite sévit dans la corne de l'Afrique de l'est, en Asie et la plupart des pays d'Amérique latine ainsi qu'au Moyen-Orient. Après une incubation de 14 jours, il donne une fièvre tierce bénigne qui peut évoluer spontanément vers la guérison. Il peut également donner de nombreuses récidives ou reviviscences liées à la présence des hypnozoïtes au niveau du foie. Après plusieurs récidives d'épisodes de malaria, il peut évoluer vers un pseudo paludisme viscéral évolutif. Il provoque exceptionnellement des formes graves avec complications tel que des ruptures spléniques, pouvant même conduire à la mort (**Changpradub et Mungthin, 2014**).

❖ *Plasmodium ovale* :

Cette espèce est communément rencontrée en Afrique (spécifiquement en Afrique de l'Ouest) et sur l'île du pacifique Ouest. Elle infecte préférentiellement les globules rouges non matures. Les cellules infectées sont ovales et légèrement plus grandes que les cellules non infectées et les trophozoïtes sont très souvent amiboïdes. *Plasmodium ovale* est biologiquement et morphologiquement très similaire à *Plasmodium vivax*.

❖ *Plasmodium malariae* :

Présent dans les zones tempérées et subtropicales, *Plasmodium malariae* est responsable de la « fièvre quarte » survenant toutes les 72 heures (**Mendis et al., 2001**). Si le patient n'est pas traité, il peut causer une infection chronique qui peut durer toute la vie et dans certains cas peut causer de sérieuses complications tel que le syndrome néphrotique.

❖ *Plasmodium Knowlesi* :

Cette espèce est naturellement présente chez les macaques des forêts du Sud-Ouest asiatique. Elle peut être transmise du singe à l'homme par la piqûre d'un moustique infecté *Anophèles leucosphyrus*, *Anophèles latents* qui vit près des forêts et des lisières. Le cycle complet est de 24 heures, *Plasmodium Knowlesi* ne donne pas de forme dormante ou des hypnozoïtes dans le foie et donc pas de reviviscence.

Les cas importés sont rares (**Daneshvar et al., 2009**). La multiplication de ce parasite est journalière et peut entraîner de forte parasitémie pouvant occasionner la mort chez l'homme.

La répartition mondiale varie en fonction de l'espèce plasmodiale en cause et est résumée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I** : Répartition géographique des 5 espèces plasmodiales humaines

<b>Espèces plasmodiales</b>	<b>Zones géographiques concernées</b>
<i>Plasmodium falciparum</i>	Afrique sub-saharienne Asie – Océanie Amérique Centrale et Sud
<i>Plasmodium vivax</i>	Afrique (peu représenté) Asie Amériques du Sud et Centrale
<i>Plasmodium malariae</i>	Afrique
<i>Plasmodium ovale</i>	Sporadique (Amazonie), Océanie, Asie, et Afrique de l'Ouest
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Asie du Sud-Est

#### **I-1-4- Cycle évolutif du *Plasmodium***

Les études de **Troye (2002)** ont montré que le cycle évolutif du *Plasmodium* (Figure 2) est complexe. Il présente deux phases :

- La phase de multiplication sexuée qui s'effectue chez l'anophèle
- La phase de multiplication asexuée qui se déroule chez l'Homme

##### **I-1-4-1- Multiplication sexuée chez l'anophèle**

Lors de son repas sanguin, l'anophèle inocule les sporozoïtes tout en récupérant chez l'hôte vertébré infecté les gamétocytes. La fécondation des gamétocytes mâles et femelles a lieu dans l'intestin du moustique et va aboutir à la formation d'un zygote diploïde. Ce zygote va se transformer en ookinètes mobile qui va adhérer à la paroi stomacale de l'anophèle femelle et former un oocyste (**Melhorn, 2001**). Après plusieurs mitoses, près d'un millier de sporozoïtes libérés par éclatement de l'oocyste regagnent les glandes salivaires du moustique pour y achever leur maturation. Ils seront injectés lors d'une nouvelle pique chez l'hôte vertébré (**Bricaire et al., 1990**). La figure 2 présente le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*. La durée de cette phase chez le moustique est de douze jours en Afrique tropicale, mais elle peut varier en fonction de la température. Le cycle s'arrête lorsque la température moyenne est inférieure à 18°C.

### **I-1-4-2- Multiplication asexuée chez l'Homme**

Encore appelé phase asexuée ou schizogonie, le cycle chez l'homme comporte deux phases qui sont la phase tissulaire ou exo-érythrocytaire et la phase sanguine ou intraérythrocytaire.

#### **I-1-4-2-1- Phase exo-érythrocytaire**

Pendant le repas sanguin, les moustiques du genre *Anophèle* femelles infestés inoculent à l'homme des sporozoïtes dans un capillaire sanguin par leur salive (**Rowe et al., 1994**). Les sporozoïtes sont des cellules minces et allongées, mononuclées, capable de pénétrer dans les hépatocytes et de s'y transformer en une masse cytoplasmique plurinucléée (**Amino et al., 2006**). Ces sporozoïtes pénètrent les hépatocytes et à ce moment commence la formation des schizontes hépatiques. Cette phase passe inaperçue et est asymptomatique. A l'issue de celle-ci, des milliers de mérozoïtes sont générés par éclatement des schizontes hépatiques. Cette étape dure une à deux semaines selon l'espèce (**Baer et al., 2007**). Il faut noter que la schizogonie hépatique est unique dans le cycle du fait que les hépatocytes ne peuvent être infectés que par des sporozoïtes (**Tardieux et Ménard, 2008**).

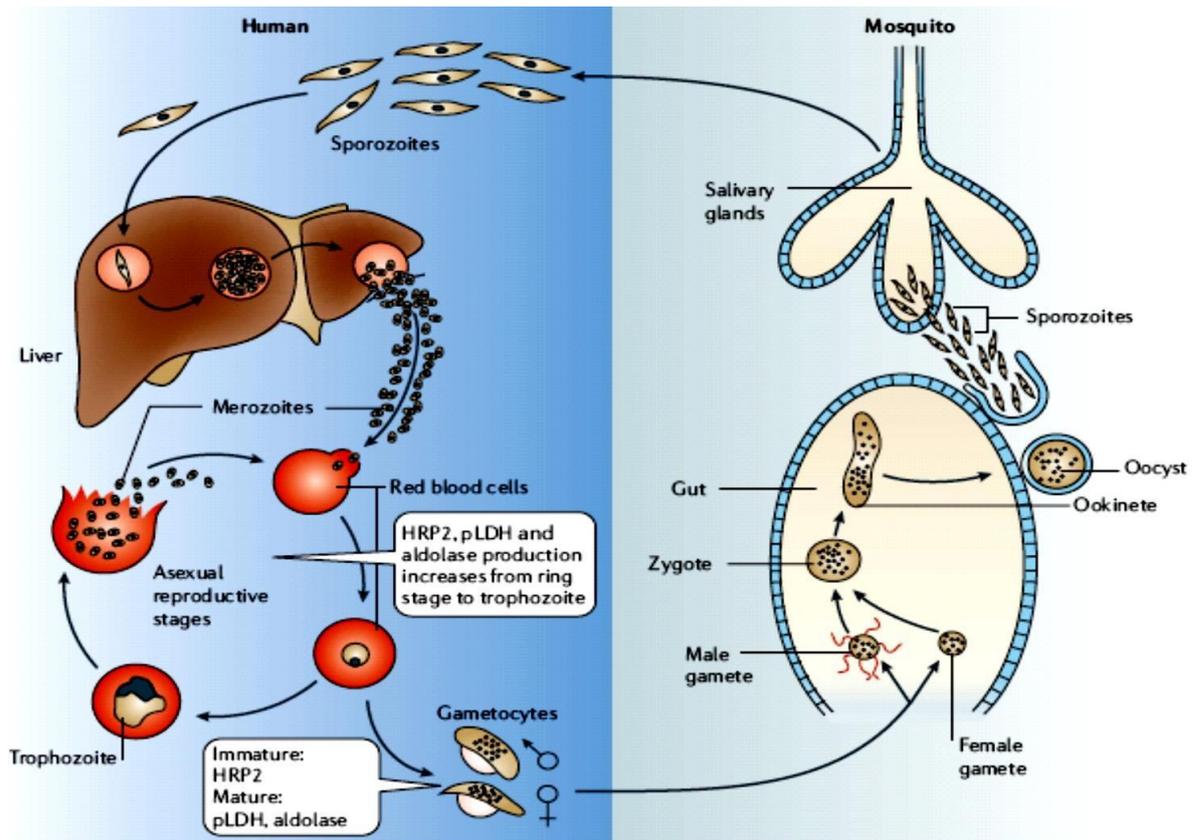
#### **I-1-4-2-2- Phase endo-érythrocytaire**

L'invasion du globule rouge par un mérozoïte, décrite pour la première fois au niveau ultrastructural par (**Ladda et al., 1969**), se déroule en une trentaine de secondes (**Dvorak et al., 1975**), impliquant une reconnaissance cellulaire, une réorientation, l'attachement du mérozoïte et enfin un glissement du mérozoïte à l'intérieur du globule rouge, accompagné de la formation d'une vacuole parasitophore qui isole le mérozoïte du cytoplasme érythrocytaire : c'est la phase anneau. Lors de son développement, l'anneau ingère l'hémoglobine de l'hématie par pinocytose. Il se déploie en un fin disque biconcave dans lequel le noyau s'allonge pour former une altère donnant l'apparence d'un anneau sur frottis coloré (**Langreth et al., 1978**). Après 20-24h, l'anneau subit une forte croissance pour donner le trophozoïte caractérisé par un cytoplasme plus volumineux.

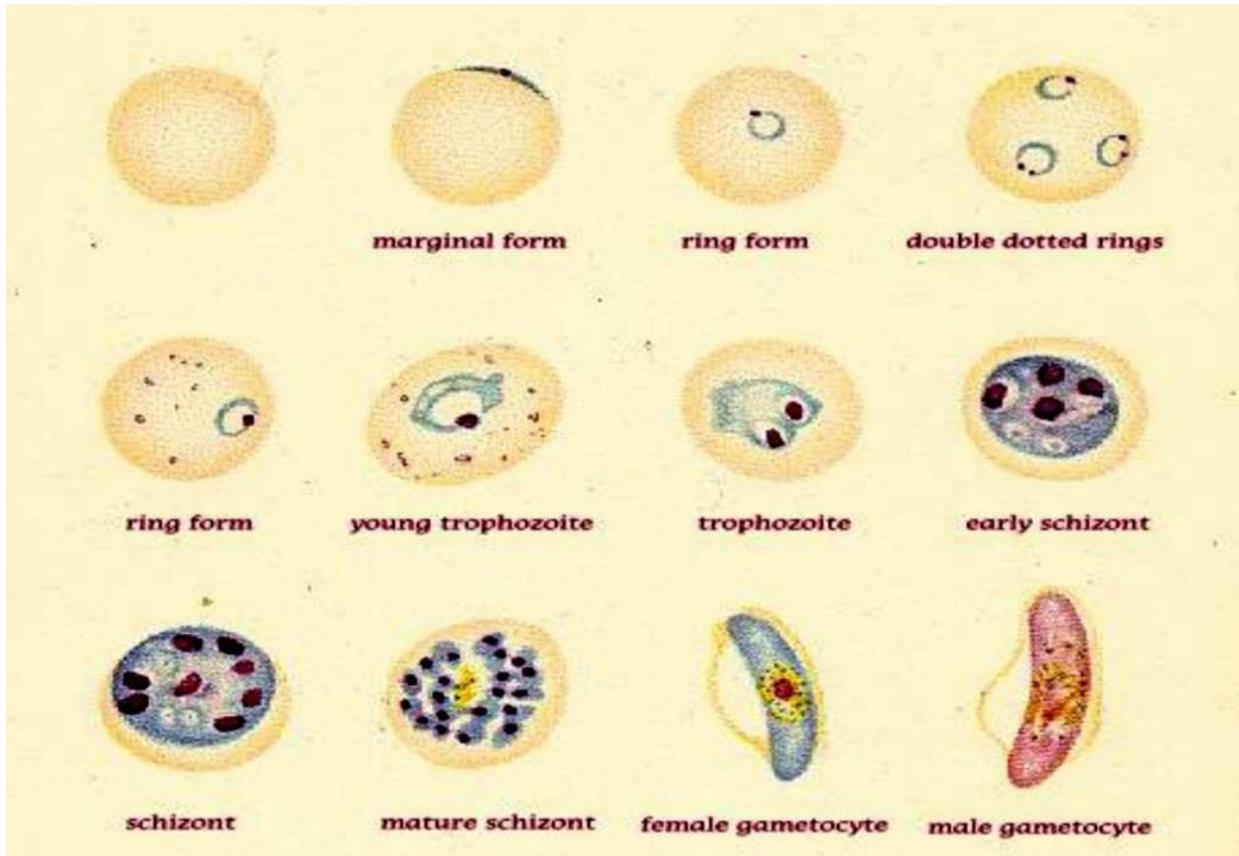
Le noyau du parasite subit alors au moins quatre mitoses pour produire environ 16 noyaux : c'est le stade schizonte. Le schizonte se charge d'un pigment appelé pigment malarique issu de la dégradation de l'hémoglobine.

Dans les schizontes mûres ou corps en rosace, s'individualisent les mérozoïtes qui seront libérés lors de l'éclatement de l'hématie. Cet éclatement survient toutes les 48 heures (durée d'un cycle érythrocytaire) et provoque un accès thermique clinique : on parle de fièvre tierce

maligne. L'hémoglobine libérée est phagocytée par les polynucléaires ou les mononucléaires. Après plusieurs cycles schizogoniques, apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexué : ce sont les gamétocytes qui seront prélevés par le moustique lors de son repas sanguin. Les figures 2 et 3 illustrent le cycle évolutif complet ainsi que les différentes formes sanguines du parasite.



**Figure 2 :** Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* (Ménard *et al.*, 2013)



**Figure 3 :** Formes sanguines de *Plasmodium falciparum* (Flamand, 2005)

### I-1-5- Signes cliniques du paludisme

Le paludisme présente des symptômes qui sont disparates dans leur expression et leur gravité. Ces symptômes dépendent non seulement de l'espèce plasmodiale et de la densité parasitaire, mais aussi de la réceptivité génétique et de l'état immunitaire de l'hôte (Gentilini *et al.*, 1993). On distingue le paludisme simple et le paludisme grave.

#### I-1-5-1- Paludisme simple

Le paludisme simple se manifeste par :

- Une fièvre ou un antécédent de fièvre égale ou supérieure à 37,5°C dans les dernières 72 heures ;
- La mise en évidence du *Plasmodium* dans le sang par un examen microscopique ou par un test de diagnostic rapide (TDR) ;
- Une absence de signe de gravité.

Les accès palustres simples comprennent le paludisme simple de primo-invasion et le paludisme simple du sujet immun.

### **I-1-5-1-1- Paludisme simple de primo-invasion**

Par définition, il apparaît chez un sujet non immun, c'est-à-dire chez l'enfant de 4 mois à 4 ans vivant dans une zone endémique, mais aussi à tout âge surtout chez l'adulte naïf visitant une zone d'endémie. La phase d'incubation dure au moins 7 jours, et est cliniquement muette. La phase d'invasion est caractérisée par l'apparition d'une fièvre continue. Le tableau clinique est celui de troubles gastriques fébriles, associés à des céphalées et à des myalgies.

### **I-1-5-1-2- Paludisme simple du sujet immun**

Il est caractérisé par des accès thermiques à des rythmes plus ou moins réguliers et des signes accompagnateurs. Il commence brutalement en fin de journée, ou la nuit. Cet accès est accompagné d'une splénomégalie et d'une anémie. Il dure une dizaine d'heures durant lesquelles se succèdent trois stades : un stade de frissons, un stade de chaleur et un stade de transpiration.

- **Stade de frissons** : Agité de violents frissons, le malade se plaint d'une sensation de froid intense, quelle que soit la température extérieure. On observe une fièvre à 39°C, une hypertrophie de la rate et une baisse de la pression artérielle. Ce stade dure une heure.
- **Stade de chaleur** : Les frissons cessent, la peau devient sèche et brûlante ; la température atteint 40 à 41°C. La rate, toujours palpable, diminue de volume. Ce stade peut durer 3 à 4 heures.
- **Stade de transpiration** : A ce stade, on observe une transpiration abondante, une baisse brusque de la température avec une phase d'hypothermie et une normalisation de la pression artérielle. Ce stade dure 2 à 4 heures et est parfois suivi d'une singulière sensation d'euphorie ou de bien-être.

### **I-1-5-2- Paludisme grave**

Le paludisme grave regroupe tous les signes du paludisme simple, auxquels s'ajoutent des signes de gravité. Il se définit comme un cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* avec au moins un des signes cliniques ou biologiques suivants :

#### **❖ Signes cliniques :**

Comme signes cliniques, on peut citer :

Les troubles de la conscience ou léthargie, les convulsions répétées, la prostration, la détresse respiratoire, l'œdème aigu du poumon (OAP), le choc ou collapsus cardio-vasculaire

(hypotension, tachycardie, refroidissement des extrémités), l'hémoglobinurie (Urines foncées ou coca cola), l'ictère franc, l'hémorragie spontanée et l'Oligo-anurie. La diurèse est 400 mL/24 heures chez l'adulte et supérieure 12 mL/kg/24 heures chez l'enfant.

#### ❖ **Signes biologiques :**

Comme signes biologiques, on peut citer :

L'hypoglycémie ( $< 2,2$  mmol/L), hyperlactatémie ( $> 5$  mmol/L), l'insuffisance rénale avec une créatinémie  $> 265$   $\mu$ mol/L chez l'adulte, et  $>$  à la valeur normale pour l'âge chez l'enfant, la parasitémie  $> 4\%$  chez les sujets non immuns et  $>20\%$  chez les sujets immuns, l'anémie grave (taux d'hémoglobine  $< 5$  g/dL ou taux d'hématocrite  $< 15\%$ ), et l'acidose métabolique (bicarbonates  $< 15$  mmol/L).

### **I-1-6- Diagnostic du paludisme**

Le diagnostic du paludisme est à la fois clinique et biologique.

Le diagnostic clinique est basé sur la reconnaissance des signes cliniques du paludisme. En Côte d'Ivoire, il existe un algorithme de diagnostic du paludisme fondé uniquement sur l'observation des signes cliniques car les moyens de diagnostic biologique ne sont pas toujours disponibles. Cependant, du fait de la non-spécificité des symptômes du paludisme, il peut constituer un diagnostic de présomption. Quant au diagnostic biologique, il consiste à détecter, quantifier et identifier l'espèce plasmodiale présente dans le sang du malade. Le sang est prélevé au niveau de la pulpe du doigt ou par ponction veineuse au niveau du pli du coude. Il existe diverses techniques pour le diagnostic biologique du paludisme : il s'agit du test microscopique et des tests indirects qui sont intéressants pour notre étude.

#### **I-1-6-1- Microscopie**

Le *Plasmodium* est mis en évidence par observation au microscope d'un frottis sanguin fixé au méthanol et coloré au Giemsa et d'une goutte épaisse colorée au Giemsa.

##### **I-1-6-1-1- Goutte épaisse**

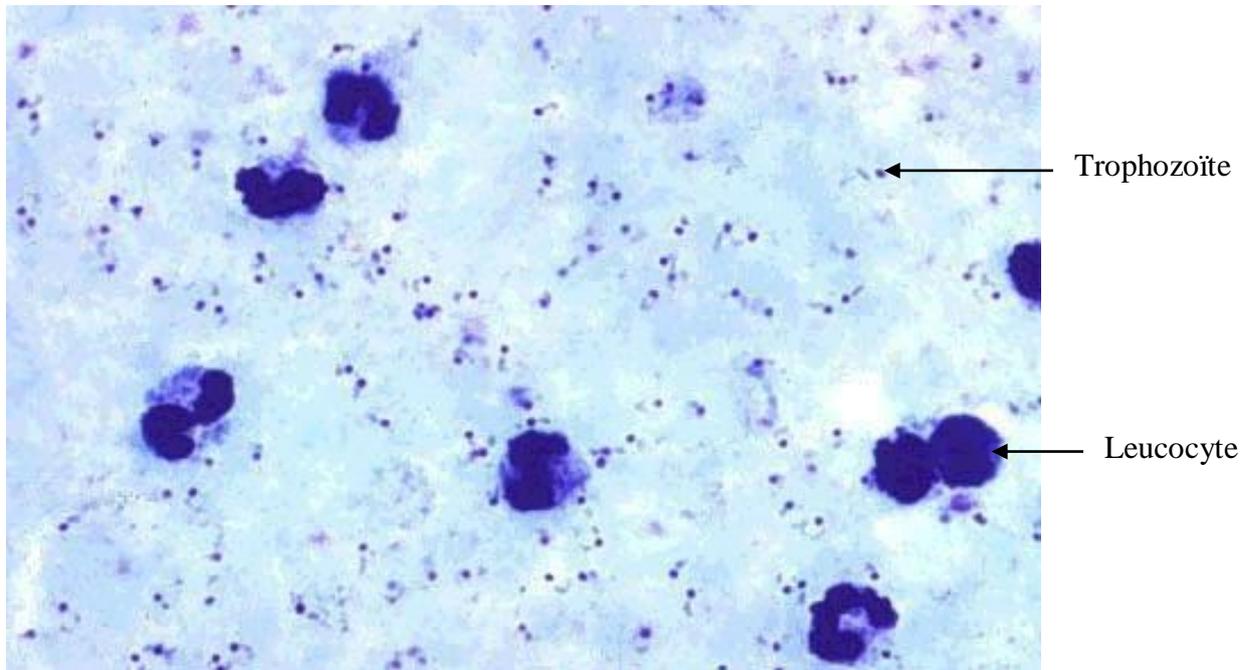
La réalisation de la goutte épaisse consiste à déposer une goutte de sang sur une lame porte-objet. Ce sang sera défibriné immédiatement par un mouvement en spirale à l'aide d'un coin d'une autre lame. Ce mouvement aura aussi pour effet d'étaler le sang sur une surface d'environ un centimètre de diamètre. La goutte est ensuite séchée puis colorée, sans fixation préalable, à l'aide d'une solution aqueuse de Giemsa qui aura une double action de déshémoglobinations et de coloration. La goutte épaisse constitue le test de référence dans le

diagnostic biologique du paludisme. Elle permet ainsi de mettre en évidence les éléments parasitaires et les leucocytes, mais ne permet pas le diagnostic d'espèce. La densité parasitaire est évaluée par comptage simultané des parasites et des leucocytes, et exprimée en nombre de parasites par microlitre de sang.

$$\text{Densité Parasitaire (nombre de parasites}/\mu\text{L de sang)} = \frac{(N_1 * 8000)}{N_2}$$

I

Avec :  $N_1$  = nombre de parasites comptés ;  $N_2$  = nombre de leucocytes comptés (au moins 200) ;  
**8000** = nombre moyen usuel de leucocytes par microlitre de sang chez l'individu sain



**Figure 4 :** Trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* et leucocytes observés sur une goutte épaisse colorée au Giemsa (Le-Bras, 2006)

#### I-1-6-1-2- Frottis sanguin

Le frottis sanguin est réalisé en étalant une goutte de sang sur une lame porte-objet. Ce frottis est ensuite fixé au méthanol puis coloré avec une solution aqueuse de Giemsa. Le frottis sanguin permet l'identification de l'espèce plasmodiale.

La densité parasitaire peut s'exprimer en pourcentage d'hématies parasitées ou en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang.

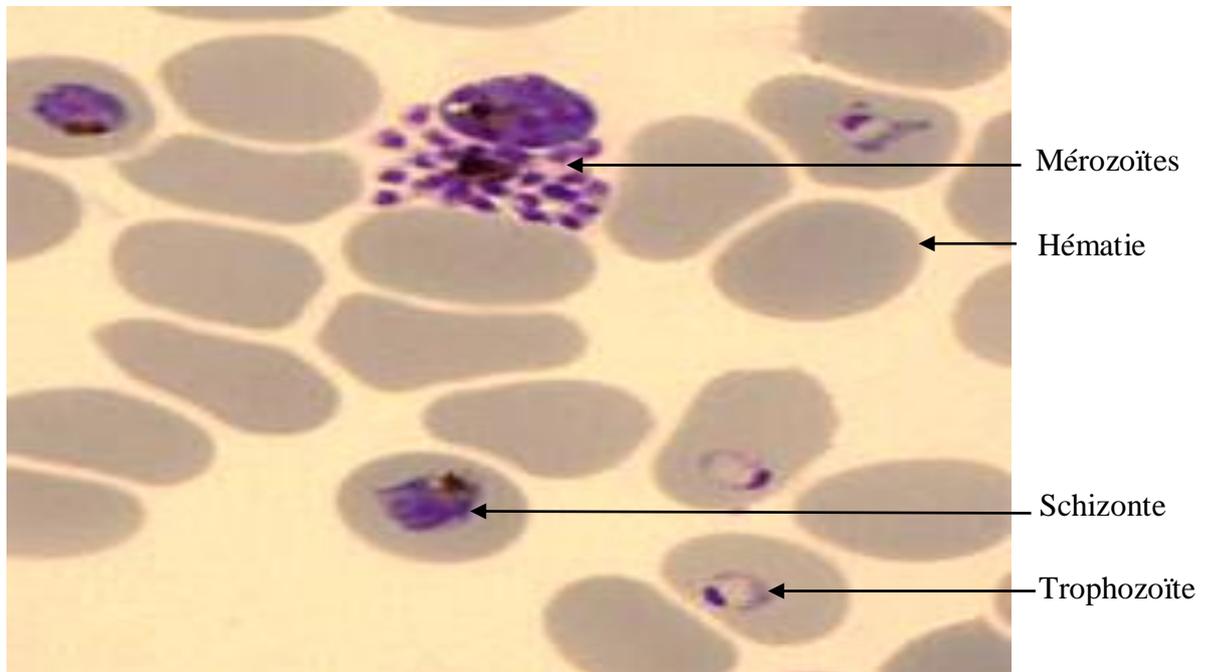
$$\text{Densité Parasitaire (nb parasites}/\mu\text{l de sang)} = \frac{(N_1 * 4500000)}{(N_2 * 200)}$$

II

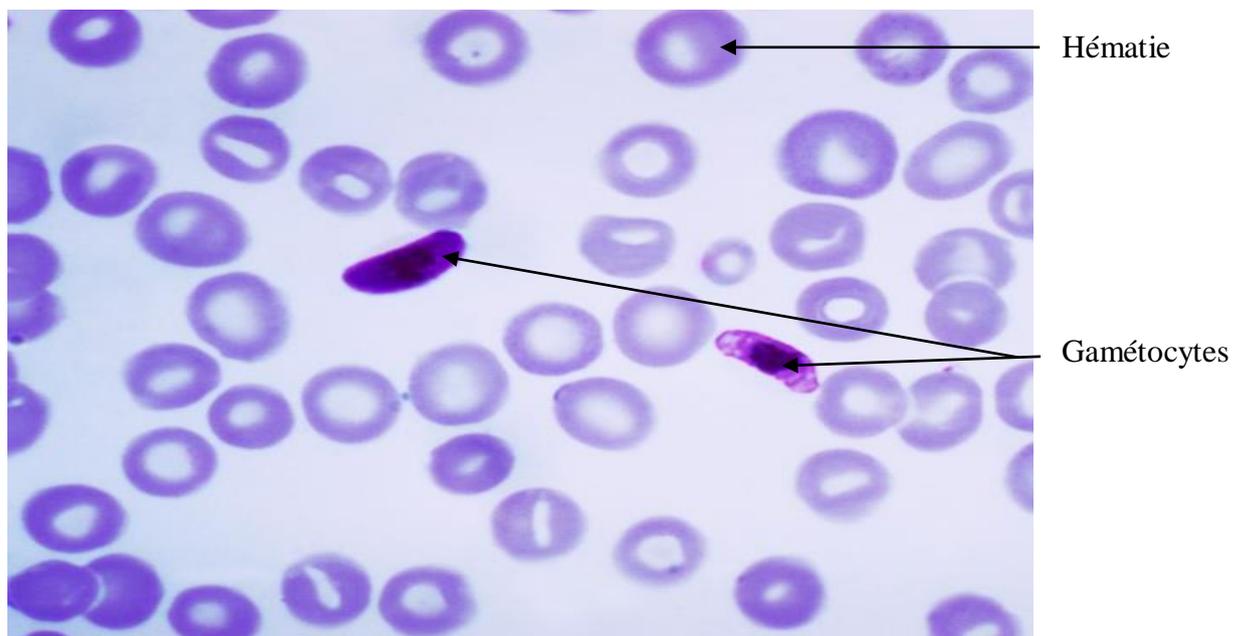
Avec :  $N_1$  = nombre de parasites comptés ;  $N_2$  = nombre de champs comptés ;

**4500000** = nombre moyen usuel d'hématies par microlitre chez l'individu sain ;

**200** = nombre moyen d'hématies par champ sur le frottis sanguin.



**Figure 5 :** Formes en anneau (Ring form), trophozoïtes et schizontes ayant libéré des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* coloré au Giemsa (Salery, 2007)



**Figure 6 :** Gamétocytes de *Plasmodium falciparum* observés sur un frottis sanguin fixé au méthanol et coloré au Giemsa (Salery, 2007)

## **I-1-6-2- Tests indirects**

### **I-1-6-2-1- Sérologie**

La sérologie n'a pas d'intérêt pour un diagnostic d'urgence. Elle est surtout utilisée sur le plan épidémiologique et pour le diagnostic de certaines formes cliniques de paludisme grave au cours desquelles le taux d'anticorps est très élevé.

La technique couramment utilisée est celle de l'immunofluorescence indirecte, en utilisant comme support des hématies parasitées.

### **I-1-6-2-2- Microscopie de fluorescence directe**

La technique la plus utilisée est le test QBC (Quantitative Buffy Coat). Le principe de ce test est basé sur l'utilisation de fluorochromes qui rendent fluorescents les acides nucléiques des parasites. Le sang est prélevé dans un tube micro-hématocrite contenant le fluorochrome (acridine orange) et un flotteur. Après centrifugation, le flotteur se trouvera dans la zone de densité correspondant à celle des hématies parasitées ; il ne laisse qu'un film d'hématies entre lui-même et la paroi du tube, ce qui permet d'examiner cette zone à l'aide d'un dispositif adapté (porte-tube, microscope à fluorescence ou adaptateur sur l'objectif).

La sensibilité de cette technique est de l'ordre de celle de la technique du frottis/goutte épaisse pour des infestations supérieures à 100 hématies parasitées par microlitre, mais cette sensibilité est moindre pour des parasitemies inférieures à ce taux. La microscopie de fluorescence permet de distinguer les différentes espèces mais l'appareillage et les réactifs nécessaires sont très coûteux.

### **I-1-6-2-3- Tests de diagnostic rapide (TDR) : recherche d'antigènes**

De nos jours, du fait de l'usage généralisé des CTA dans les pays d'endémie palustre, l'OMS recommande l'usage des tests de diagnostic rapide (TDR) avant l'instauration de tout traitement antipalustre. Ces tests reposent sur la mise en évidence de l'antigène (*histidine rich protein* II ou HRP II) et/ou d'enzyme (pLDH ou *Plasmodium* lactate déshydrogénase) plus ou moins spécifiques d'espèces plasmodiales. Cependant, si ces tests sont de réalisation facile et peuvent être utilisés sur le terrain dans des zones dépourvues d'électricité, certains d'entre eux (notamment ceux mettant en évidence la présence de HRP II spécifique de *P. falciparum*) peuvent se révéler positifs même après guérison (Yavo *et al.*, 2002). Aussi, la délétion du gène PfHRP2 a-t-elle récemment été observée au Pérou, empêchant la détection de *P. falciparum* par les TDR à HRP2 et induisant de faux négatifs (Maltha *et al.*, 2013). Il est à noter que la

réalisation d'un bon diagnostic biologique du paludisme revêt une importance capitale. En effet, une étude réalisée à Abidjan a montré que seulement un patient sur trois déclarés cliniquement souffrant de paludisme était porteur de *Plasmodium*. Ces erreurs de diagnostic sont à l'origine de l'augmentation du coût de la prise en charge du malade par la prescription inutile d'antipaludiques accentuant ainsi la pression médicamenteuse (**Menan et al., 2007**).

#### **I-1-6-2-4- Polymérase Chain Réaction (PCR)**

La PCR permet une différenciation de souches et est réservée essentiellement à l'étude des mutations et des gènes impliqués dans la résistance aux antipaludiques.

C'est la technique la plus sensible, mais elle n'est pas utilisable pour le diagnostic car très coûteuse, et nécessitant un équipement lourd et des compétences particulières. Elle est utilisée presque exclusivement dans le domaine de la recherche.

#### **I-1-7- Traitement**

Le traitement du paludisme commence par une prise en charge et cette prise en charge a pour objectifs de :

- Guérir une infestation déjà existante (prévenir la progression vers une forme grave)
- Sauver le patient en cas de paludisme grave et compliqué

Ainsi pour le traitement du paludisme, il existe un nombre important de molécules antipaludiques. Cependant, les résistances développées par le parasite sont à la base de l'inactivité d'un grand nombre d'entre elles. Pour remédier à cela, l'OMS conseille l'utilisation des molécules en bithérapie et développe constamment de nouvelles stratégies de lutte contre cette pathologie.

#### **I-1-7-1- Antipaludiques**

Un antipaludique est un composé naturel ou de synthèse qui, administré par voie orale, parentérale ou rectale, à dose unique ou répétée, permet de détruire le parasite ou de bloquer sa croissance dans le but de prévenir ou de guérir le paludisme (**Gentilini et al., 1993**). Les principaux antipaludiques utilisés en thérapeutique sont :

##### **I-1-7-1-1- Schizonticides naturels**

###### **❖ Alcaloïdes de Quinquina : la quinine**

La quinine est un antipaludique d'origine naturelle, exerçant une activité schizonticide sur toutes les espèces plasmodiales.

Elle traverse la membrane de l'hématie parasitée et se concentre fortement dans les vacuoles digestives des schizontes qui assurent la dégradation de l'hémoglobine, il en résulte une accumulation de molécules d'hème qui provoque la lyse du parasite.

#### **I-1-7-1-2- Schizonticides hémissynthétiques**

##### **❖ Lactones sesquiterpéniques de *Artemisia annua* : les dérivés de l'artémisinine**

Les dérivés de l'artémisinine exercent une action à la fois schizonticide et gamétocytocide. Ils sont actifs sur les souches de *Plasmodium* résistants aux autres antipaludéens. L'artémisinine et ses dérivés sont plus actifs contre le parasite que les autres antipaludéens. En présence de fer, le pont peroxyde intramoléculaire de ces molécules donne des radicaux libres qui détruisent le parasite intraérythrocytaire.

#### **I-1-7-1-3- Schizonticides synthétiques**

##### **❖ Amino-alcools : la luméfantine et l'halofantine**

La luméfantine est un schizonticide de synthèse qui agit en bloquant la synthèse des acides nucléiques et des protéines parasitaires. C'est une molécule active sur *Plasmodium* chloroquinorésistant.

##### **❖ Amino-4-quinoléines : Amodiaquine et la chloroquine**

Les mécanismes d'action de l'amodiaquine et de la chloroquine sont similaires à celui de la quinine. L'amodiaquine se fixe également à l'ADN du parasite et inhibe ainsi la synthèse d'ADN et/ou d'ARN.

##### **❖ Sulfonamides**

La sulfadoxine est retrouvée associée avec la pyriméthamine dans la spécialité FANSIDAR®. La sulfadoxine inhibe la dihydroptéroate synthétase qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide folique. Elle inhibe ainsi la synthèse d'acide folique nécessaire à la croissance des bactéries et des parasites. Elle exerce une activité schizonticide lente et sa demi-vie d'élimination est de 7 à 8 jours.

La dapsonne (DISULONE® 100 mg comprimés) est un sulfone habituellement utilisé dans le traitement de la lèpre, et présentant une activité schizonticide comparable à celle de la sulfadoxine. Elle est toujours utilisée en association avec un autre antimalarique. La demi-vie d'élimination est d'environ 28 jours.

#### **I-1-7-1-4- Schizonticides antibiotiques : la doxycycline**

L'antibiotique le plus utilisé dans la chimioprophylaxie antipalustre est la doxycycline qui est une molécule appartenant à la famille des cyclines. Les cyclines sont des schizonticides actifs sur les souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux quinoléines. Mais le mécanisme d'action de la doxycycline en tant qu'antipaludéen est encore méconnu.

La biodisponibilité de la doxycycline après absorption par voie orale est d'environ 100% et le temps de demi-vie est de 18 à 22 heures. Elle est éliminée sous forme inchangée par les urines.

#### **I-1-7-2- Combinaisons thérapeutiques antipaludiques**

Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques ont été mises au point dans le but de réduire les risques d'apparition de résistance des parasites vis-à-vis des molécules actuellement utilisées pour le traitement du paludisme.

Ce sont des formulations constituées de deux ou plusieurs schizonticides ayant des modes d'action indépendants, et donc des cibles biochimiques différentes. Les molécules associées doivent avoir des demi-vies d'élimination complémentaires ou coordonnées, de sorte à avoir une action rapide et efficace sur le *Plasmodium* et une bonne tolérance.

Ces combinaisons permettent d'améliorer l'efficacité des molécules associées, et de retarder l'apparition de résistance vis-à-vis des molécules de l'association.

Les combinaisons thérapeutiques sont indiquées pour le traitement du paludisme simple, et les plus utilisées sont celles à base de l'artémisinine ou de ses dérivés (ACT = Artemisinin based Combined Therapy). Les dérivés de l'artémisinine ont une demi-vie courte et une action rapide induisant une forte réduction de la parasitémie, tandis que les molécules auxquelles ils sont associés persistent plus longtemps, permettant l'élimination des plasmodies résiduelles.

Les ACT recommandées par l'OMS sont :

- Artéméther + Luméfantrine
- Artésunate + Amodiaquine
- Artésunate + Méfloquine
- Artésunate + Sulfadoxine-Pyriméthamine
- Dihydroartémisinine + Pipéraquine

Le schéma thérapeutique de prise en charge du paludisme en Côte d'Ivoire se présente comme suit :

❖ **Pour le paludisme non compliqué ou simple,**

On utilise l'Artésunate + Amodiaquine et Artéméther + Luméfantrine.

En cas d'échec thérapeutique ou contre-indication aux deux ACT, on utilise la Quinine par voie orale. En cas d'indisponibilité de ASAQ, AL, on peut utiliser : DHA+PPQ et AS+MF.

❖ **Pour le paludisme compliqué ou grave,**

On utilise l'Artésunate, l'Artéméther injectable et la Quinine.

### **I-1-8- Résistance aux antipaludiques**

Selon l'OMS, la chimiorésistance, a été définie comme la « capacité d'une souche de parasite à survivre et / ou à se multiplier malgré l'administration d'un médicament à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées, mais en respectant la tolérance du sujet (OMS, 1973).

#### **I-1-8-1- Mécanismes de résistance aux antipaludiques**

Il s'agit d'un ensemble de marqueurs impliqués dans les mécanismes moléculaires de résistance. Pertinents et spécifiques pour prédire le niveau de résistance d'une population parasitaire aux antipaludiques (Ménard *et al.*, 2013). En général, la résistance semble se produire à travers des mutations spontanées qui confèrent une sensibilité réduite à un médicament donné ou à une classe de médicaments. Pour certains médicaments, une seule mutation ponctuelle est requise pour conférer une résistance, alors que pour d'autres médicaments, des mutations multiples semblent être nécessaires (Thaithong, 1983).

❖ **Antifoliques**

Les antifoliques (sulfamides et sulfones) et les antifoliniques (pyriméthamine et proguanil) inhibent de façon séquentielle la voie métabolique de synthèse de l'acide folique du parasite, qui ne peut pas utiliser l'acide folique de l'hôte.

*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (Pfdhfr). Ce gène, situé sur le chromosome 4, code pour une enzyme intervenant dans la voie de synthèse des folates (Foote et Cowman, 1994). Elle est la cible des médicaments anti-folates (Pyriméthamine, par exemple) qui, en inhibant son activité enzymatique, entraînent le blocage de la synthèse des pyrimidines et la réplication de l'ADN parasitaire (Sibley *et al.*, 2001). L'accumulation de plusieurs mutations spécifiques au sein de cette protéine (codons 50N→R, 51C→I, 108S→N et 164I→L) entraînent la résistance clinique des parasites à l'action des anti-folates. La dihydroptéroate synthase (DHPS) est une autre enzyme intervenant dans la synthèse des folates (le gène correspondant

est situé sur le chromosome 8). Elle est inhibée par les sulfamides. Les mutations se situant au niveau des codons 436 (S→A/F), 437 (K→G), 540 (K→E), 581 (A→G), 613 (A→S/T) confèrent une résistance à la sulfadoxine (**Gregson et Plowe, 2005**).

#### ❖ Amino-4-quinoléines

Le parasite détoxifie l'hème par la formation d'un pigment malarique appelé l'hémozoïne. Le rôle des amino-4-quinoléines dont le chef de file est la chloroquine (CQ), inhibe la détoxification de l'hème, entraînant son accumulation dans la vacuole digestive du parasite et causant sa mort (**Lim et al., 2009**). *Plasmodium falciparum* Chloroquine transporté (Pfcr), gène situé sur le chromosome 7 code pour un transporteur membranaire de la vacuole digestive. La mutation sur le codon 76 (K→T), associée à sept autres points de mutation (**Sidhu et al., 2002**), tout comme le gène Pfmdr1 codant pour la protéine Pgh1 (P-glycoprotéine1) permet au parasite de limiter l'accumulation de Chloroquine dans sa vacuole digestive dans la résistance à la CQ (**Sanchez et al., 2007**).

#### ❖ Résistance à l'artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine et ses dérivés, antipaludiques de choix dans le traitement du paludisme simple, agit comme une endopéroxydase qui se lie à l'hème par alkylation dans la vacuole digestive du parasite. Cette interaction « hème-artémisinine » provoquerait la libération des radicaux libres toxiques pour les constituants cellulaires du parasite. Ce complexe en fin de compte, inhibe l'enzyme PfATPase, essentielle pour le pompage du calcium indispensable à la survie du parasite (**Jambou et al., 2005; Woodrow et Krishna, 2006**).

### I-1-8-2- Bases génétiques de la pharmaco-résistance

La résistance aux médicaments chez les parasites du paludisme est associée à des mutations génétiques dans les gènes codant pour les protéines cibles, ce qui peut entraîner une expression et un pliage inhabituels de cette protéine, modifiant ainsi le site de liaison habituel du médicament. Cette modification conduirait à l'inefficacité et à l'apparition du phénotype de résistance. Chez *Plasmodium*, la résistance aux médicaments est médiée par deux processus : le premier étant la vitesse à laquelle les mutations *de novo* conférant une résistance sont sélectionnées et le second concerne la propagation de ces allèles résistants (**Klein, 2013**). Le changement de phénotype du parasite peut être médié par des mutations ponctuelles, des altérations multiples ou des duplications de gènes qui modifient le phénotype du parasite (**White, 2004**).

### **I-1-8-3- Causes de la pharmaco-résistance**

#### **I-1-8-3-1- Pauvreté**

Dans les pays en voie de développement, touchés par le paludisme, la pauvreté a été associée à la difficulté d'éradiquer le paludisme, car les populations pauvres n'ont pas les moyens financiers pour prévenir ou traiter la maladie. Aussi, dans ces pays, les médicaments antipaludéens peuvent être achetés dans de nombreuses pharmacies locales sans l'avis d'un médecin. Malheureusement, les individus qui pratiquent l'automédication sont exposés à des médicaments contrefaits, qui sont généralement moins chers. Ces médicaments contrefaits peuvent contenir des quantités moindres des principes actifs, ou aucun, ou ne peuvent pas être bioabsorbés par l'organisme. De plus, ils peuvent contenir des ingrédients qui ne sont pas sur l'étiquette et qui peuvent être nocifs. Cela peut aboutir à des concentrations sous-thérapeutiques du médicament *in vivo*, contribuent grandement à la sélection des parasites résistants pour les populations vulnérables. Tout cela est compromettant pour les progrès dans la lutte contre le paludisme (**White, 2009**).

#### **I-1-8-3-2- Prévalence des infections asymptomatiques**

Bien que, beaucoup ait été fait pour prévenir et réduire au minimum la propagation du paludisme, la gestion des infections asymptomatiques reste un domaine encore ouvert à de nombreuses pistes de recherche. En général, la prévalence du paludisme asymptomatique est en corrélation avec le taux de parasite et le niveau de transmission. Un individu asymptomatique héberge des parasites circulants et ne présente pas de symptômes évidents de la maladie. Chez un tel individu, un réservoir de parasite n'est habituellement pas détectable par microscopie, mais détectable par des techniques moléculaires, Les parasites circulants peuvent généralement conduire à la formation de gamétocytes abritant des mutations génomiques conférant une résistance aux médicaments (**Sutherland et al., 2002**).

#### **I-1-9- Plantes comme remèdes antipaludiques**

La médecine par les plantes est la forme la plus ancienne des pratiques connues depuis la nuit des temps. En effet, les plantes médicinales ont été utilisées par toutes les peuples à travers l'histoire pour traiter les divers maux auxquels ils étaient confrontés eux et leur bétail. La plante entière ou parfois une partie de celle-ci comme les feuilles, racines ou l'écorce étaient utilisées pour faire des préparations (**Kokwaro, 2009**).

Les plantes sont une source riche en composées anti-malariques comme le démontre la quinine, un alcaloïde isolé de l'écorce du quinquina, qui a été employé pendant plus de 300 années pour traiter Le paludisme. Le développement des dérivés d'Artémisinine, qui est actuellement la première ligne de traitement contre le paludisme "malaria" est issu de *Artemisia annua*, a réaffirmé le potentiel des plantes à fournir des médicaments efficaces pour le traitement du paludisme (Muthaura *et al.*, 2011).

La Côte d'Ivoire, a l'instar des autres pays du monde possède une richesse floristique et des ressources génétiques diversifiées de plantes médicinales utilisées par les peuples autochtones pour traiter plusieurs maladies dont le paludisme (Nguta *et al.*, 2011). Quelques études ethnobotaniques ont été réalisées en Côte d'Ivoire et partout ailleurs dans le monde. En raison des succès passés obtenus avec les médicaments antipaludiques issus de plantes tel que la quinine et l'artémisinine, les approches ethno-pharmacologiques pourraient mener à la découverte de médicaments à fort potentiel anti-malariques (Pillay *et al.*, 2008).

#### **I-1-10- Étude de la résistance plasmodiale**

La lutte contre le paludisme dans les pays en développement commence par le contrôle de l'endémie palustre par les antipaludiques et cela 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-1-10-1- Test *in vivo***

C'est l'ensemble des méthodes de référence standardisées par l'OMS ; ces tests permettent d'évaluer l'efficacité clinique des schémas thérapeutiques recommandés pour traiter les accès palustres non compliqués.

L'efficacité du principe actif est déduite de la disparition de la parasitémie et de l'amélioration du tableau clinique du patient. Le suivi biologique et parasitologique, pendant 28 ou 42 jours, des patients traités permet de distinguer quatre types de réponse au traitement :

- L'échec thérapeutique précoce (ETP)
- L'échec parasitologique tardif (EPT),
- L'échec clinique tardif (ECT)
- Une réponse clinique et parasitologique adéquate (RCPA) qui caractérise un parasite sensible.

Ces études cliniques sont généralement coordonnées avec des tests *in vitro* et moléculaires.

### **I-1-10-2- Tests *ex vitro* et *in vitro***

Ils consistent à mettre en culture, soit directement (test *ex vivo*), soit après adaptation en culture continue (test *in vitro*), un isolat sauvage de *P. falciparum* en présence d'une concentration croissante d'un antipaludique (**Basco, 2006**). La mesure de la croissance des parasites (microscopique, isotopique, ELISA ou fluorimétrique) en fonction de la concentration d'un antipaludique permet de définir son niveau de sensibilité. Le résultat est objectivé par la concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>), valeur correspondante à la concentration d'antipaludique permettant d'inhiber la croissance de 50 % des parasites (par rapport au témoin sans drogue). Même si cette technique nécessite une logistique et un plateau technique de qualité, elle permet de tester plusieurs antipaludiques en parallèle et de s'affranchir des facteurs liés à l'hôte (immunité, variation individuelle de la concentration sérique en antipaludique) (**Ménard et al., 2013**).

Les méthodes utilisées sont :

- **Test isotopique** : c'est la méthode de référence. Ce test utilise l'hypoxanthine radiomarkée au tritium (**Desjardins et al., 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.
- **Test de l'OMS III** : ce test utilise le comptage microscopique des formes ayant atteint le stade schizonte après 24 heures de culture. Toutefois cette technique est très dépendante de l'opérateur.
- **Tests colorimétriques** : ces tests 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 Hinrichs, 1993**).
- **Test fluorimétrique** : c'est 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* (**Izumiya et al., 2009**) et *in vivo* (**Somsak et al., 2012**) et moins cher que toute autre test fluorimétrique et même colorimétrique.
- **Ring Stage-Survival Assay (RSA)** : Il s'agit d'une technique récente, développée par l'institut Pasteur du Cambodge en 2013. Sa particularité réside dans le fait qu'elle

mesure la résistance des formes jeunes de *Plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine. On expose les parasites à la DHA pendant 6 heures. Après 72 heures, le taux de survie des parasites est évalué (Witkowski *et al.*, 2013).

## I-2- Généralités sur les plantes étudiées

### I-2-1- *Azadirachta indica*

#### I-2-1-1- Description de la plante

*Azadirachta indica*, de son nom vernaculaire Djêkouadjo-brou en malinké est une plante appartenant à la famille des Meliaceae. C'est un arbre que l'on retrouve dans toutes les régions tropicales du monde. Il pousse sur presque tous les type de sols et croît bien dans les zones où les précipitations annuelles sont comprises entre 250 mm et 2000 mm (Adjanooun *et al.*, 1979). *Azadirachta indica* est une essence à usage multiple qui fournit plusieurs produits et sa plantation est fortement recommandée en reboisement dans l'agroforesterie.

La classification systématique et les noms vernaculaires de cette plante sont consignés respectivement dans les tableaux II et III.

**Tableau II:** Position systématique de *Azadirachta indica*

<b>Plantes</b>	<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Meliaceae
Genre	<i>Azadirachta</i>
Espèce	<i>Indica</i>
Drogue	Feuilles

**Tableau III:** Noms vernaculaires de *Azadirachta indica* de quelques pays

<b>Pays (langue)</b>	<b>Noms vernaculaires</b>
Français	Magousier
Anglais	Neem
Espagnol	Paraiso
Cote d'Ivoire (Dioula)	Djêkouadjo - brou
Sénégal (Wolof)	Nim

### **I-2-1-2- Origine et répartition géographique**

*Azadirachta indica* a fait l'objet de plusieurs études. Selon plusieurs auteurs, cette plante est originaire soit de la forêt de Karnaba au sud de l'Inde, soit de l'intérieur de la forêt de Buma Myanmar (**Vartak et Ghate, 1990**) Mais pour d'autres auteurs, *Azadirachta indica* proviendrait de la forêt de Chivalik (**Puri, 1999**).

Cependant, certaines littératures situent son origine dans les forêts sud et sud-est de l'Asie, y compris le Pakistan, le Sri Lanka, la Thaïlande, la Malaisie et l'Indonésie (**National, 1992**). Cette plante s'adapte bien aux climats chauds et secs ; de ce fait, elle est devenue une espèce très communément plantée dans les régions tropicales sèches et subtropicales d'Océanie (les îles Fidji, Polynésie, Australie), d'Asie (Bangladesh, Inde, Pakistan, Arabie Saoudite), d'Afrique (Somalie, Kenya, Tanzanie, Egypte, bassin du lac Tchad, Nigeria, Niger, Bénin, Togo, Burkina Faso, Ghana, Côte d'Ivoire, Mali, Mauritanie, Gambie, Guinée, Sierra Leone, Sénégal) et d'Amérique (Miami, Floride, Californie, Arizona, Oklahoma, Nicaragua, Honduras, Mexique, Guatemala, Salvador, Costa Rica, Panama, Colombie, Venezuela, Bolivie et Equateur) (**Forster et Moser, 2000**).

### **I-2-1-3- Aspect botanique**

*Azadirachta indica* est un arbre à croissance rapide qui peut atteindre 15 à 20 m de hauteur, souvent 20 à 30 m et plus rarement 35 à 40 m (**Schmutterer et Ascher, 1987**).

C'est un arbre à feuillage persistant ; mais dans des zones très sèches, les jeunes arbres peuvent parfois perdre la plupart ou la totalité de leurs feuilles pendant un temps relativement court, et de nouvelles feuilles de couleurs généralement rosâtres à vertes peuvent réapparaître durant les mois de mars et d'avril (**Puri, 1999**).

Le tronc de l'arbre est relativement court, habituellement droit ; il peut atteindre 1,5 à 3,5 m de diamètre (**National, 1992**).

Les feuilles sont disposées de manière alternée sur un long et mince pétiole (Figure 7). La face dorsale d'une feuille de *Azadirachta indica* a une couleur vert foncé alors que la face ventrale est plus claire. Elles mesurent entre 20 et 40 cm de long et sont plus denses à l'extrémité des branches.

Le système racinaire de *Azadirachta indica* est constitué d'une forte racine pivotante et d'un ensemble de racines latérales bien développées. La surface latérale des racines peut aller jusqu'à plus de 18 m. Elles pénètrent le sol profondément et produisent des surgeons; c'est ce qui permet à l'arbre de résister dans les zones sèches (**Benge, 1989**).

Les fleurs de *Azadirachta indica* sont petites, blanches, et soutenues par un faisceau auxiliaire qui peut aller jusqu'à 25 cm de long. Elles contiennent une sève qui dégage une odeur qui attire les abeilles.

Son fruit est lisse, et de forme ellipsoïdale. Il mesure 1,4 à 2,8 cm de long et 1,0 à 1,5 cm de large (Schmutterer et Ascher, 1987).



**Figure 7 :** Les feuilles de *Azadirachta indica* (Herbal, 2018)

#### **I-2-1-4- Usages thérapeutiques traditionnels**

*Azadirachta indica* est traditionnellement utilisé dans les pays d'origine pour traiter les infections, la douleur, la fièvre, purifier la peau et résoudre les inflammations et les infections séborrhéiques, nettoyer et désinfecter les dents. C'était la coutume de mâcher quelques feuilles comme purificateur et de boire le thé de *Azadirachta indica* comme tonique. Dans un but préventif, le jus des feuilles est utilisé en usage externe à but dermatologique.

En Inde les feuilles de *Azadirachta indica* sont également utilisées pour éloigner les insectes, en disposant certaines dans les armoires, entre les pages des livres, dans la literie, dans des conteneurs (Mr. Plantes, 2014 ). Elles sont également utilisées pour le traitement de la diarrhée et le choléra (Thakurta *et al.*, 2007).

En Afrique, *Azadirachta indica* est abondamment planté en alignement dans les villes et villages comme arbre d'avenue et d'ombrage (Adjanohoun *et al.*, 1979). Au Mali, la solution

obtenue après la décoction des feuilles de *Azadirachta indica* est prise par voie orale et bain corporel pour traiter le paludisme (Sangaré, 2003).

#### **I-2-1-5- Données Phytochimiques**

*Azadirachta indica* est une plante bien connue, tant en Afrique que dans le monde. Cette plante a fait l'objet de nombreux travaux phytochimiques. Les investigations chimiques sur les constituants de *Azadirachta indica* révèle la présence des flavonoïdes (la quercétine), des saponines, des polyphénols, des tanins, des triterpènes (Abalaka *et al.*, 2012) et des limonoïdes. Une autre étude réalisée par Otache et Agbajor. (2017) a montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Azadirachta indica* contenait des tanins, des saponines, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des hydrogénocynures. Des travaux ont également montrés que les feuilles de *Azadirachta indica* renfermeraient des Saponines, des Alcaloïdes, des Tanins et des Flavonoïdes (Eleazu *et al.*, 2012) et des Polyphénols (Atangwho *et al.*, 2009).

Au niveau de la caractérisation phytochimique des feuilles de cette plante, on peut citer la gédunine (Mondal, 2012) et l'azadirachtine (Lucantoni *et al.*, 2010).

Quant à l'activité antioxydante, les études réalisées par Akinmalodun *et al.* (2007) ; Eleazu *et al.* (2011) ont montrés une activité antioxydante des feuilles de *Azadirachta indica*. Selon ces auteurs, cette activité serait due aux flavonoïdes contenus dans cette plante.

#### **I-2-1-6- Données Pharmacologiques**

Du point de vue biologique, (Ekanem, 1978) a montré que la décoction des feuilles de *Azadirachta indica* présente une activité antipaludique contre *Plasmodium berghei* sensible à la chloroquine. Ade (1982) a montré que l'extrait des feuilles de cette plante exerce un effet inhibant la croissance de *Plasmodium falciparum*. Isah *et al.* (2003) ont montré également que les extraits aqueux des plantes de *Azadirachta indica* présente une activité antiplasmodiale *in vivo* contre *Plasmodium yoelii nigeriensis* chez des souris. La littérature rapporte également que les feuilles de cette plante possèdent des activités antioxydantes (Sithisarn *et al.*, 2005), anti-inflammatoire (Sithisarn *et al.*, 2006), antibactérien ; antiviral (Rao, 1987); antiseptique (Schmutterer, 1995) et antidiabétique (Oluwole *et al.*, 2011).

#### **I-2-1-7- Données Toxicologiques**

Au niveau de la toxicologie, les travaux de Achi *et al.* (2018) ont montré que l'extrait aqueux des feuilles de plante de *Azadirachta indica* est considéré comme non toxique avec une DL<sub>50</sub> supérieur à 5000 mg/kg de poids corporel chez les rats Wistar mâles infectés par le

paludisme. **Isah et al. (2003)** ont également montré que l'extrait aqueux de *Azadirachta indica* administré par jour à une dose inférieure ou égale à 800 mg/kg chez un rat de model murin est non toxique. Cependant à forte dose, cet extrait pourrait être toxique.

Les résultats des travaux de **Wang et al. (2013)** n'ont pas montré de variation des paramètres hépatorénales après 30 jours de traitement à l'huile essentielle des graines d'*Azadirachta indica* à la dose de 1600 mg/Kg de poids corporel. Cependant, une autre étude visant à évaluer les conséquences toxiques de l'extrait éthanolique d'écorce de tige d'*Azadirachta indica* a montré que cet extrait, aux doses de 50, 100, 200, et 300 mg/kg de poids corporel peut ne pas être sans danger en tant que remède en prise oral et doit se refaire avec prudence si cela est absolument nécessaire (**Ashafa et al., 2012**).

## **I-2-2- *Cymbopogon citratus***

### **I-2-2-1- Description de la plante**

*Cymbopogon citratus* communément appelé « Thé » en Côte d'Ivoire est une herbe appartenant à la famille des Poaceae. La plupart des espèces se trouve en régions tempérées et tropicales chaudes du monde. Elles proviennent également du sud-ouest de l'Asie et elles se développent maintenant spontanément dans le monde, principalement dans les régions tropicales (**Gupta et Jain, 1978**). *Cymbopogon citratus* pousse bien sous une pluviosité de 600 à 4100 mm et une température moyenne de 21 à 27 °C (**Van, 2001**).

La classification systématique et quelques noms vernaculaires de cette plante sont consignés respectivement dans le tableau IV et V.

**Tableau IV** : Position systématique de *Cymbopogon citratus*

<b>Plantes</b>	<b><i>Cymbopogon citratus</i> (Poaceae)</b>
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Commelinidae
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Genre	<i>Cymbopogon</i>
Espèce	<i>Citratus</i>
Drogue	Feuilles

**Tableau V:** Noms vernaculaires de *Cymbopogon citratus* de quelques pays

<b>Pays (langue)</b>	<b>Noms vernaculaires</b>
Français	Citronnelle
Anglais	lemon grass
Espagnol	Pasto limón
Allemand	Westindisches zitrongras
Cote d'Ivoire (Dioula)	Thé
Mali (Bambara)	Ce kala

### **I-2-2-2- Répartition géographique**

*Cymbopogon citratus* est originaire de l'Inde. Cette espèce se rencontre dans de nombreux pays tropicaux, en Caraïbe, en Amérique centrale, en Afrique, en Australie et en Indochine (Van, 2001). Elle est répandue en Afrique notamment à Madagascar, au Congo, au Sénégal, au Kenya, aux Comores, en Côte d'Ivoire, au Ghana et au Cameroun. Cultivée essentiellement dans le monde tropical, la citronnelle se rencontre aussi bien dans les zones tropicales humides et sèches que dans les régions subtropicales sèches (Larousse, 1986).

### **I-2-2-3- Aspect Botanique**

*Cymbopogon citratus* enregistré sous le numéro n°ITIS 41613 (Côte d'Ivoire) est une herbe aromatique vivace sans ramification à odeur de citron poussant en touffes denses. Ces feuilles peuvent atteindre 90 cm de longueur et 1,25 cm de largeur (Figure 14). Elles sont isolées, vert-claires, fortement parfumées, longues, effilées et réunies en gaines sur une certaine portion de leurs longueurs. Aussi, le bord des feuilles est hyalin formé de nombreuses petites dents dirigées vers le sommet de la plante. La partie souterraine du *Cymbopogon citratus* est constituée par un bulbe en rhizome. Bien que cette plante fleurisse rarement, elle possède une hampe florale pouvant atteindre 60 cm de longueur à nombreuses ramifications terminées par des épis agglomérés de couleur verdâtre. *Cymbopogon citratus* se reproduit par rhizomes et se cultive bien dans les régions semitropicales et tropicales (Kouame et al., 2015a).



**Figure 8 :***Cymbopogon citratus* (Côte d’Ivoire) (Kouame *et al.*, 2015)

#### **I-2-2-4- Usages thérapeutiques traditionnels**

*Cymbopogon citratus* est beaucoup utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuses infections en Afrique car elle possède plusieurs propriétés thérapeutiques.

L’infusion ou la décoction des parties de cette plante est utilisée comme antimicrobien, anti-inflammatoire et sédatif. Le décocté des feuilles est utilisé pour traiter les douleurs gastro-intestinales, la toux, l’herpès, la fièvre, les céphalées, les troubles cardiaques, la drépanocytose, les flatulences, les vomissements, la dyspepsie, l’ictère, l’insomnie, la morsure de serpent, la coqueluche, l’éléphantiasis et la dépression (Adjanhoun *et al.*, 1989).

En Côte d’Ivoire, les populations Abbey et Krobou administrent par voie orale le décocté des feuilles séchées de cette plante pour traiter l’hypertension artérielle (Die-Kacou *et al.*, 2009).

Au Nigeria, au Ghana puis en Côte d’Ivoire, l’infusion ou la décoction des feuilles de *Cymbopogon citratus* seul ou associé au *Cassia occidentalis* et au *Citrus aurantifolia* est utilisée dans les cas de paludisme surtout pendant la grossesse. Ces populations boivent une tasse de la décoction par jour jusqu’à leur rétablissement (Asase *et al.*, 2010).

### **I-2-2-5- Données Phytochimiques**

*Cymbopogon Citratus*, est une plante bien connue, tant en Afrique surtout pour son usage traditionnel que dans le monde. De nombreuses études phytochimiques, nutritionnelles et biologiques ont été réalisées sur les extraits de cette espèce et révèlent : la présence des terpènes, des flavonoïdes, des composés phénoliques, des alcaloïdes, des antraquinones, des glycosides et hydrodrates de carbone, des tanins, et des saponosides à l'état de trace (**Figueirinha et al., 2008**). Des activités antioxydantes de *Cymbopogon Citratus* ont été également rapportées. Selon les travaux de **Tiwari et al. (2010)**, l'extrait éthanolique de *Cymbopogon Citratus* (5 à 10 µg/mL) provoque une inhibition significative des marqueurs du stress oxydatif tels que les Reactive oxygen species (ROS) et la malondialdéhyde (MDA), et une augmentation significative de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) et du taux de glutathion réduit (GHS). Cette activité antiradicalaire du *Cymbopogon Citratus* contre les ROS serait due aux flavonoïdes composés à 84% de C-glycosylflavones (**Figueirinha et al., 2010**). Aussi, les études réalisées par **Cheel et al. (2005)** ont montrés que l'extrait aqueux, l'extrait méthanolique, l'infusion et la décoction de *C. citratus* inhibent l'enzyme xanthine oxydase et la peroxydation lipidique dans les érythrocytes humains.

### **I-2-2-6- Données Pharmacologiques**

**Okere et al. (2014)** ont montré dans une étude que l'extrait aqueux des feuilles du *Cymbopogon citratus* a une activité antiplasmodique.

**Tarkang et al. (2014)** ont montré que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Cymbopogon citratus* récoltés dans la période de juillet et août au Cameroun ont obtenu une activité antiplasmodiale sur des souches de références 3D7 et Dd2. Les valeurs des CI<sub>50</sub> de 723,30±0,01 µg/ml et 28±0,04 µg/ml pour l'extrait aqueux et une CI<sub>50</sub> de 141±0,07 µg/ml et 54,8±0,14 µg/ml pour l'extrait éthanolique respectivement sur les souches 3D7 et Dd2.

La littérature rapporte également les activités suivantes : anti-inflammatoire (**Figueirinha et al., 2010**); antibactérien (**Danlami et al., 2011**); antidiabétique (**Adeneye et Agbaje, 2007**) antioxydante (**Garg et al., 2012**). On attribue aussi à cette plante des propriétés antispasmodiques, expectorantes, carminatives, diurétiques et antipyrétiques (**Wuththitum, 1994**).

### **I-2-2-7- Données Toxicologiques**

Du point de vue toxicologique, l'extrait aqueux du *Cymbopogon citratus* exerce des effets cytotoxiques et génotoxiques sur le bulbe d'*Allium cepa* (oignon) avec des doses variant de 1 à 20 % (v/v) (Akinboro *et al.*, 2007). Chez *Lactuca sativa* (laitue), cet extrait (5 ; 10 ; 20 et 30 mg/mL) a induit des anomalies chromosomiques et la mort cellulaire de la racine. Les concentrations élevées (20-30 mg/mL) ont provoqué la réduction de l'index mitotique, de la germination des graines et du développement de la racine (Sousa *et al.*, 2010). Les DL<sub>50</sub> du *Cymbopogon citratus* déterminée chez la larve de crevette (*Artemia salina* L.) et chez la souris Swiss albinos sont respectivement de 9,83 µg/mL et de 460 µg/mL (Lagarto *et al.*, 2001). La toxicité aigüe a été observée à 2000 et 3000 mg/kg avec des symptômes tels que la torpeur, les saignements du nez et de la paupière chez les rats Wistar. L'examen histologique a révélé une atrophie de la muqueuse de l'estomac et une nécrose des hépatocytes. La DL<sub>50</sub> est de 3250 et de 3500 mg/kg respectivement chez le rat et la souris male Swiss (Costa *et al.*, 2011). La toxicité du *Cymbopogon citratus* serait attribuée au citral et au β-myrcène qui seraient embryofœtotoxique respectivement aux doses supérieures à 125 mg/kg et 1200 mg/kg. Un retard de la croissance, une fréquence plus élevée d'anomalies mineures du squelette ainsi qu'une augmentation de poids de la rate fœtale ont été observés chez le fœtus (Nogueira *et al.*, 1995 ; Santin *et al.*, 2009). Par contre le β-myrcène est non toxique pour les lymphocytes humains à des doses en deçà de 1 mg/mL (Kauderer *et al.*, 1991). Chez l'homme, le limonène est faiblement toxique à une dose unique de 100 mg/kg avec des effets tels que les nausées, vomissements et diarrhées sans dysfonctionnement hépatique, rénale et pancréatique (Vigushin *et al.*, 1998 ; Crowell *et al.*, 1994).

### **I-2-3- *Psidium guajava***

#### **I-2-3-1- Description de la plante**

*Psidium guajava* s'adapte parfaitement à tous les climats chauds et humides n'excédant pas 2000 mm de précipitations. Il est assez résistant à la sécheresse et supporte des températures allant jusqu'à 45°C, d'où la possibilité de sa culture en régions arides (Lucky *et al.*, 2010).

La classification systématique et quelques noms vernaculaires de cette plante sont consignés respectivement dans les tableaux VI et VII.

**Tableau VI** : Position systématique de *Psidium guajava*

<b>Plantes</b>	<b>Psidium guajava (Myrtaceae)</b>
Règne	Végétal
Sous-règne	Viridaeplantae (plante verte)
Division	Tracheophyton (plante vasculaire)
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	<u>Myrtales</u>
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Psidium</i>
Espèce	<i>Guajava</i>
Drogue	Feuilles

**Tableau VII**: Noms vernaculaires de *Psidium Guajava* de quelques pays

<b>Pays (langue)</b>	<b>Noms vernaculaires</b>
Français	Goyavier
Anglais	Guava
Espagnol	Guayaba
Cote d'Ivoire (Bété)	Goyave-kpè
Mali (Bambara)	Bauky

### I-2-3-2- Répartition géographique

*Psidium guajava* est originaire de l'Amérique tropicale. Cette espèce se rencontre essentiellement dans les régions équatoriales, subtropicales, tropicales voire tempérées (**Kerharo et Adam, 1974**). Les espèces de cette famille présentent un large éventail d'habitats notamment le bassin méditerranéen, l'Amérique du sud et l'Australie où la partie tempérée de ce continent abrite une grande diversité d'espèces.

Cette espèce est également rencontrée dans toute l'Afrique occidentale notamment au Sénégal, en Côte d'Ivoire, au Congo (**Bois, 1928**).

### I-2-3-3- Aspect Botanique

*Psidium guajava* est un grand arbuste dicotylédone avec des feuilles persistantes, généralement entre 3 à 10 m de hauteur avec beaucoup de branches (**Sohafy et al., 2009**). Les tiges sont tordues et l'écorce est légère à brun, mince rougeâtre, lisse et sans interruption

s'écaillant. Le système de racine est généralement superficiel et très étendu, fréquemment se prolongeant bien au-delà de la verrière.

Les feuilles, de 5 à 10 cm de long sur 2,5 à 5 cm de large, sont opposées, entières, sans stipules. Le limbe elliptique ou ovale lancéolé, coriace, est porté par un pétiole très court. Il est ponctué de points translucides. La face inférieure, de couleur jaunâtre, est couverte de poils très fins. Les nervures secondaires sont parallèles et très apparentes. Les feuilles sont très aromatisantes lorsqu'on les froisse. Les rameaux florifères sont tétragones (**Nundkumar et Ojewole, 2002**).

Les fleurs blanches, odorantes, sont solitaires ou groupées par deux ou trois et disposées à l'aisselle des feuilles. Elles comptent 4 ou 5 pétales et de très nombreuses étamines. Elles apparaissent pratiquement durant toute l'année, comme les fruits d'ailleurs.

Le fruit est une grosse baie couronnée par le calice persistant. On rencontre différentes formes selon les variétés, rondes, ovoïdes ou encore piriformes, très odorantes à maturité, de 3 à 10 cm de longueur, de couleur généralement jaune. La chair, rosâtre ou jaunâtre, contient un grand nombre de petites graines réniformes et dures. Elle est sucrée, aromatique, rappelant l'odeur et le goût de la fraise (**Tra-Bi et al., 2008**).



**Figure 9** : Les feuilles de *Psidium guajava* (**Laborpresse.net, 2014**)

#### **I-2-3-4- Usages thérapeutiques traditionnels**

*Psidium Guajava* est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de nombreuses maladies telles que les lésions, les ulcères, la diarrhée, le choléra, l'hypertension, l'obésité et le diabète (**Nikiema et al., 2010**). Les feuilles de *Psidium guajava* ont été beaucoup utilisées par la médecine traditionnelle pour le traitement de la diarrhée (**Nicolas, 2012**), de l'infection (**Olajide et al., 1999**), de la douleur et de l'inflammation bactérienne (**Hanif et al., 2009**).

A Madagascar, la décoction des feuilles de *Psidium guajava* est également utilisée dans les traitements de la diarrhée (**Sanches et al., 2005**).

Au Bangladesh les feuilles de *Psidium guajava* sont utilisées pour soigner les plaies, la toux, les problèmes respiratoires et les rhumes (**Rojas et al., 2006**).

Au Nigeria les feuilles de *Psidium guajava* sont utilisées en cas de palustre (**Perera et al., 2014**).

#### **I-2-3-5- Données Phytochimiques**

Les feuilles de *Psidium guajava* contiennent des polyphénols, des alcaloïdes, des tannins, des flavonoïdes (myricétine, quercétine, lutéoline et kaempferol) (**Gutiérrez et al., 2008**). En plus des tanins et des flavonoïdes, les feuilles de *Psidium guajava* contiennent des phénols, des saponines et des terpenoïdes (**Biswas et al., 2013a**). Les travaux de **Tensaout et Gaoua, (2018)**, ont également montré que les feuilles *Psidium guajava* renferment les composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tanins, caroténoïdes, vitamine C.

Quant aux autres organes de *Psidium guajava*, la littérature rapporte la présence des Alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait aqueux d'écorces de la tige (**Gbogbo et al., 2013**). Aussi, les travaux **Andrianarison et al. (2015)** ont montré que la pulpe de goyave renferme des leucoanthocyanes, des stérols insaturés, des stérols lactoniques, des triterpènes, des stéroïdes, des tanins, des cardénolides et d'autres composés phénoliques.

S'agissant de l'activité antioxydante, Les feuilles de *Psidium guajava* révèlent une activité antioxydante très élevée. Les principes actifs sont : la quercétine, quercétine-3-O-glucopyranoside, acide ascorbique, caroténoïdes et les composés phénoliques (**Wilberg et Rodriguez-Amaya, 1995 ; Okwu et Ekeke, 2003**). L'activité antioxydante, évaluée par le pouvoir réducteur DPPH et le test de phosphomolybdate, montrent une bonne capacité de piégeage du radical DPPH par l'extrait des feuilles avec une  $CI_{50}$  de 0,15 mg/mL (**Tensaout et Gaoua, 2018**). L'activité antioxydante de la pulpe de fruit de *Psidium guajava* provient de leucoanthocyanes, de tanins condensés, des stéroïdes, des terpenoïdes. La pulpe de fruit de

*Psidium guajava* détient un fort pouvoir antioxydant avec sa concentration  $CI_{50}$  de 14,97 $\mu$ g/mL (Andrianarison *et al.*, 2015).

#### I-2-3-6- Données Pharmacologiques

Ene *et al.* (2010) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Psidium guajava* a une activité antipaludique. Tarkang *et al.* (2014) ont également montré que les extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Psidium guajava* récoltés dans la période de Juillet et Aout au Cameroun ont obtenu une activité antiplasmodiale sur des souches de références 3D7 et Dd2 respectivement avec une  $CI_{50}$  de 47,02 $\pm$ 0,03  $\mu$ g/mL et 25,79 $\pm$ 0,03  $\mu$ g/mL pour l'extrait aqueux et une  $CI_{50}$  de 37,28 $\pm$ 0,02  $\mu$ g/mL et 23 $\pm$ 0,03  $\mu$ g/mL pour l'extrait éthanolique. La littérature rapporte également les activités suivantes: anti-inflammatoire (Dutta et Das, 2009), antimicrobienne (Biswas *et al.*, 2013b), antidiarrhéique (Salgado *et al.*, 2006) et antioxydante (Ramasamy et Arumugam, 2016 ).

#### I-2-3-7- Données Toxicologiques

Du point de vue toxicologique, les travaux de Ashraf *et al.* (2016), les feuilles de *Psidium guajava* ne présentent pas d'effets indésirables. Selon ces travaux, la plante est dénuée de toxicité aux doses préconisées. Il est cependant vivement conseillé de filtrer correctement la tisane afin d'éviter l'irritation de l'œsophage par les micro-poils présents sur la feuille. Pour cela, on recommande de n'utiliser que la partie claire à la base des feuilles.

D'autres travaux ont été réalisés par Hermione *et al.* (2019) sur l'évaluation des toxicités aiguës et subaiguës de l'extrait méthanolique d'écorce de *Psidium guajava*. Selon l'étude de la toxicité aiguë, la dose létale 50 ( $DL_{50}$ ) de l'extrait de l'écorce de *Psidium guajava* était supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel. Pour l'étude de la toxicité subaiguë, des variations significatives du poids corporel, du poids relatif des organes et des paramètres biochimiques ont été observés chez les animaux traités à différentes doses d'extraits végétal par rapport aux animaux témoins. Aussi des analyses histopathologies réalisées lors de cette étude ont montré une légère inflammation du foie chez le rat wistar à la dose de 1000 mg/kg de poids corporel. Les résultats de cette étude suggèrent que la prise d'une seule dose élevée d'extrait d'écorce de cette plante n'est pas toxique. Cependant, une administration répétée pourrait présenter une légère toxicité pour les organes (Hermione *et al.*, 2019).

### I-3- Etude de la biotolérance

#### I-3-1- Notion de toxicité

La toxicité d'une substance est sa capacité de produire des effets nocifs à un organisme vivant. Elle varie selon la dose, la fréquence, la durée d'exposition, et le temps d'apparition des signes cliniques. Toute substance destinée à être mise sur le marché que ce soit un médicament ou autre produit chimique doit subir des essais de trois types de toxicité pour bien évaluer sa nocivité. On distingue cliniquement trois formes essentielles de toxicité illustrées dans le tableau VIII :

- ✓ La toxicité aiguë,
- ✓ La toxicité à court terme (subaiguë ou subchronique),
- ✓ La toxicité à long terme (chronique).

**Tableau VIII** : Les différentes formes de toxicité

<b>Forme</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Durée</b>
<b>Aiguë</b>	Unique	< 24 Heures
<b>Subaiguë</b>	Répétée	1 ≤ Mois
<b>Subchronique</b>	Répétée	De 1 à 3 mois
<b>Chronique</b>	Répétée	> 3 mois

#### I-3-2- Toxicité aiguë

##### I-3-2-1- Définition

La toxicité aiguë est une forme de toxicité qui résulte d'une exposition de courte durée suite à une absorption rapide du toxique par dose unique ou multiple ne dépassant pas 24 heures (**LeBlanc, 2010**). Les manifestations cliniques se développent rapidement en général, la mort ou la guérison survient sans retard. C'est le premier test qu'un toxicologiste effectue sur un nouveau composé destiné à être utilisé comme médicament (**Ruckebush, 1981**). L'étude de la toxicité aiguë vise surtout à déterminer un paramètre toxicologique qui est la dose létale 50.

##### I-3-2-2- Dose létale 50

La dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Cet indicateur mesure la dose d'une substance qui cause la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.

(Lapointe, 2004). Elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme de poids de l'animal. Plus cette valeur est petite, plus la substance est toxique.

La détermination de la DL<sub>50</sub> est nécessaire dans le cadre légal. Elle permet la classification des produits chimiques selon leurs toxicités (**Tableau IX**). La détermination de la DL<sub>50</sub> permet aussi l'évaluation du danger en cas de surdosage ainsi que la programmation des études de toxicité subaiguë et chronique chez les animaux et des essais thérapeutiques chez l'homme. Elle a également pour rôle de faciliter le contrôle de qualité des produits chimiques, de l'index thérapeutique ou de la marge de sécurité qui est une valeur représentant le rapport entre la dose létale 50 et la dose efficace 50 (DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>). Cependant, la DL<sub>50</sub> a une valeur très limitée, car elle ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes réactionnels en jeu et la nature des lésions causées. Il s'agit donc d'une appréciation grossière et préliminaire, qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels l'espèce animale, le sexe, l'âge, le temps, etc. (Lapointe, 2004).

**Tableau IX** : Exemple de classification de la toxicité : cas de la toxicité orale aiguë chez le rat (Lauwerys *et al.*, 2007).

Catégorie	DL <sub>50</sub> Dose unique en mg/kg	Exemples
Extrêmement toxique	< 1	Fluoroacétate de sodium
Hautement toxique	< 50	Fluorure de sodium, parthion
Modérément toxique	<500	Dichloro-diphényle-trichloroéthane
Légèrement toxique	< 5 000	Acétanilide
Pratiquement non toxique	< 15 000	Acétone
Relativement atoxique	> 15 000	Glycérol

### I-3-3- Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est la mise en évidence d'effets nocifs survenant chez des animaux après une exposition répétée, quotidienne ou fréquente d'une ou plusieurs doses d'une substance à tester durant une période de 28 jours. Chaque jour, au cours de cette période, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité (OCDE, 2008). L'étude de la toxicité subaiguë permet de définir le seuil de toxicité d'un produit et de reconnaître les

principaux sites et éventuellement les mécanismes d'action du toxique (**Laroche et al., 1986; Schordelet et al., 1992**).

#### **I-3-4- Toxicité subchronique**

La toxicité subchronique est la toxicité induite chez des animaux par une exposition répétée, quotidienne ou continue d'une ou plusieurs doses d'un produit pendant une période allant de 28 à 90 jours (plus de 28 jours et moins de 90 jours) (**Lauwerys et al., 2007**). Cette exposition permet d'apprécier la toxicité d'un produit et de mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomo-histopathologiques suite à l'administration de ce produit (**Laroche et al., 1986**).

#### **I-3-5- Toxicité chronique**

La toxicité chronique est la mise en évidence d'effets toxiques après l'administration répétée, quotidienne ou fréquente d'une dose d'un produit pendant plus de 90 jours (**Lauwerys et al., 2007**). Cette durée peut aller jusqu'à 18 mois chez les rongeurs et jusqu'à 12 ou 24 mois voire plus chez les non rongeurs. Ce type d'exposition permet aussi d'apprécier la toxicité d'un produit et de mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomo-histopathologiques consécutives à l'administration de ce produit (**Laroche et al., 1986**). Ces études, qualifiées de pluridisciplinaires, sont généralement effectuées par plusieurs chercheurs spécialisés dans différents aspects de la toxicologie, par exemple l'immunotoxicologie et la cancérogénicité. Elles supposent généralement la collaboration de chercheurs de divers domaines scientifiques comme la chimie, la biochimie, la biologie et la médecine.

# **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES**

## II-1- Matériel

### II-1-1- Produit expérimental et matériel végétal

#### II-1-1-1- Produit expérimental

Le produit expérimental étudié, est une recette locale de « Djahakro », un village de la commune de Yamoussoukro, élaborée par un tradithérapeute appelé Monsieur Ahoutou. La recette est un décocté à base de feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava* (Figure 10). C'est une solution fluide de couleur brune et de goût amer. Cette recette a été dénommée « Ahoutou » dans la présente étude en hommage à son concepteur.



**Figure 10:** Bouteille en plastique contenant une solution de « Ahoutou »

#### II-1-1-2- Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de trois plantes de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava* Linn. Les feuilles ont été récoltées dans le mois de mars 2018 à Yamoussoukro (Côte d'Ivoire) et séchées à l'abri du soleil. Après 10 jours de séchage, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et réduites en poudre.

Leur identification botanique a été réalisée par M. N'Guessan Amani, taxonomiste au laboratoire de botanique du département Agriculture et Ressources Animales (ARA) de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro (INP-HB). Les feuilles de *Azadirachta indica*, de *Cymbopogon citratus* et celle de *Psidium guajava* ont été cueillies sur le site de l'INP-HB Centre. Toutes ces feuilles (Figure 11) ont été ensuite acheminées au Laboratoire de Procédés Industriels, de Synthèses et de l'Environnement (LAPISEN) de l'INP-HB de Yamoussoukro pour y être séchées.



**Figure 11 :** Matériel végétal (*Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*)

## II-1-2- Matériel animal

Des rats femelles de souche Wistar de l'espèce *Rattus norvegicus* (Figure 12), pesant entre 99-135 g, provenant du vivarium de l'École Normale Supérieure (Abidjan, Côte d'Ivoire), ont été acclimatés pendant une semaine avant leur utilisation expérimentale. Ils ont été marqués pour permettre une identification individuelle.



**Figure 12 :** Rat mâle de souche Wistar, âgé de 11 semaines

## II-1-3- Souches de plasmodies

Pour cette étude, une souche de référence de *Plasmodium* et des isolats cliniques ont été utilisés. Il s'agit notamment de la souche de référence de *Plasmodium falciparum* Dd2 (ATCC MRA-156, ATCC ®Manassas, Virginie) résistante à la chloroquine. Aussi, quatre isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* provenant de patients atteints de paludisme simple ont été obtenus à la formation sanitaire d'Anonkoua-Kouté situés dans la commune d'Abobo (Abidjan, Côte d'Ivoire). Ce sont notamment, ANK137, ANK138, ANK139 et ANK140.

## II-1-4- Globules rouges sains

Du sang provenant de sujets sains non porteurs du *Plasmodium* (donneurs volontaires) de groupe O et de Rhésus positif a été utilisé.

## **II-1-5- Matériel et réactifs**

### **II-1-5-1- Matériel technique et réactifs pour les tests phytochimiques et antioxydants**

Le matériel technique utilisé est essentiellement constitué d'un broyeur mécanique (Retsch, M6951), d'un agitateur magnétique (IKAMAG RCT), d'un mixeur (Blender Bruon H-999A), d'une étuve Memmert-Germany, d'une balance de précision (Sartorius), d'un Rotavapor (Büchi), d'un bain marie, d'un four et d'un spectrophotomètre Jasco V-530 (JASCO, Japon).

Les réactifs utilisés sont principalement constitués du réactif de Folin-Ciocalteu (Panreac quimica), de la vanilline (Sigma Chemical Co, USA), du carbonate de sodium (Merck), 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 [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (Prolabo), de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (Sigma Chemical Co, USA), de l'acide trichloroacétique (TCA) (Prolabo). L'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine (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-1-5-2- Matériel technique, milieux de culture et réactifs pour les tests *in vitro***

Le matériel technique utilisé est principalement constitué, de microscope Leica<sup>®</sup> DM500, de microplaques 96 puits (Costar<sup>™</sup> 96), d'une hotte à flux laminaire (STERILGUARD) d'un incubateur, d'un spectrofluorimètre (BIOTEK FLX 800), d'un vortex (Lab dancer VWR), des filtres millipores 0,22 µm (Stericup Durapore<sup>®</sup>), d'un aspirateur (Vacum pump XF54), d'une centrifugeuse (Eppendorf, Centrifuge 5702), de cloches à bougie (Bilups-Rothenber inc.). Les Bombonnes d'azote liquide (Taylor wharton 35 VHC) sont utilisées pour la conservation des souches de référence.

Pour la réalisation du test de maturation du *Plasmodium falciparum* (culture *in vitro*), nous avons utilisé du RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologie, UK), du bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma Chemical Co, USA), du NaCl (Sigma Chemical Co, USA), de l'HEPES (Sigma Chemical Co, USA), de l'hypoxanthine (Sigma Chemical Co, USA), du glycérol (Sigma Chemical Co, USA), du D-sorbitol (Sigma Chemical Co, USA) et de Albumax I

utilisé en remplacement du sérum humain et est préparé à 5% dans de l'eau distillée) (Gibco<sup>®</sup>, 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 Gentamycine (Sigma Chemical Co, USA).

Nous avons également utilisé comme molécule de référence le Dihydroartémisinine (DHA).

### **II-1-5-3- Matériel technique et réactifs pour les tests de toxicologies**

Le matériel technique est constitué d'un microtome (REICHERT-ULTRACUT) pour la réalisation des coupes histologiques de foie et de reins de rats, de sonde à gavage (Drencher), d'un automate compteur analyseur (Syxmex KX21N), d'un automate (ROCHE/HITACHI 902), de tubes collecteurs contenant de l'EDTA (Dmi) et de tubes secs (Dmi).

Quant aux réactifs, ils sont constitués de formol 10% (Grosseron), d'hématoxyline éosine (Merck) trichromique de Masson (RAL), de toluène (Merck) et de baume d'Eukitt (Novolab).

### **II-1-5-4- Matériel technique et réactifs pour l'identification des composés par la méthode HPLC**

Le matériel technique est constitué d'un HPLC Shimadzu SPD20A, d'un spectrophotomètre UV-visible Jenway 6705 (Barloworld, France) équipé d'un enregistreur de spectres (180-880 nm) pour la quantification des polyphénols et des alcaloïdes, d'une pompe Water 600 Pump équipée d'une boucle d'injection de 20 $\mu$ L, d'une colonne Alltech Intersil (ODS-5,46 nm), d'un détecteur de type Waters 486 Tunable et d'une membrane millipore (0,45  $\mu$ m).

Quant aux réactifs, ils sont constitués de dihydrogénophosphate de sodium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) de marque Sigma-Aldrich, d'acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN) et d'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) qui ont servi de système d'éluant.

## **II-2- Méthodes**

### **II-2-1- Enquête ethnobotanique sur l'utilisation de la recette « Ahoutou »**

Pour la réalisation de cette enquête sur l'utilisation de la recette « Ahoutou », nous nous sommes entretenus avec 105 personnes de la commune de Yamoussoukro dans la région du Béliér. Les informations sur les utilisations de la recette « Ahoutou » ont été collectées à l'aide

d'un questionnaire distribué à 105 personnes. Certaines personnes choisies de façon aléatoires et d'autres venues acheter ou se faire traiter au domicile d'un guérisseur sur une période de 4 semaines. Les individus ayant acceptés de partager avec nous leur savoir ont été invités à donner leur connaissance au sujet des maladies pour lesquelles ils utilisaient cette recette et sur leur satisfaction par rapport à la recette « Ahoutou ». Les questionnaires utilisés pour cette circonstance se trouvent en Annexe 1.

Ces questionnaires ont été dépouillés en calculant les fréquences pour chaque information sollicitée :

$$Fréquence = \left( \frac{Reponses\ semblables\ obtenues}{Nombre\ de\ personnes\ interrogées} \right) \times 100$$

III

## II-2-2- Paramètres physico-chimiques de la recette « Ahoutou » et des plantes qui la composent

### II-2-2-1- Teneur en eau par la méthode gravimétrique

Une prise d'essai de 5 g d'échantillon est posée dans un creuset (propre et sec) de masse connue. Puis, le creuset contenant l'échantillon est placé à l'étuve réglée à  $105^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant une durée de 24 heures. Ensuite, le creuset est retiré de l'étuve et refroidi dans un dessiccateur. Enfin, l'ensemble (échantillon plus creuset) a été pesé. La teneur en eau est obtenue par le rapport de la masse d'eau sur celle de la prise d'essai multiplié par 100 :

$$\% \text{ eau} = \left( \frac{Masse\ d'eau(g)}{Masse\ de\ prise\ d'essai\ (g)} \right) \times 100$$

IV

### II-2-2-2- Teneur en matière sèche

Une masse d'essai de 5 g d'échantillon est posée et introduite dans un creuset dont la masse à vide est déterminée au préalable. L'ensemble est mis à l'étuve à  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Après étuvage puis refroidissement dans un dessiccateur, l'ensemble (échantillon + creuset) est pesé. Le calcul de la teneur en matière sèche en pourcentage de masse d'échantillon humide est :

$$\% \text{ Matière sèche} = 100 - \% \text{ eau}$$

V

### II-2-2-3- Teneur en cendre totales

Une prise d'essai de 5 g d'échantillon séché à l'étuve est pesée dans un creuset d'incinération en porcelaine de masse connue et placé dans un four à moufle puis incinérée à 600 °C pendant 06 heures. Après le retrait du creuset du four à moufle puis refroidissement dans un dessiccateur, celui-ci est de nouveau pesé. La teneur en cendres totales est obtenue par le rapport de la masse de cendres sur la masse de prise d'essai (précédente) multipliée par 100 :

$$\% \text{ Cendres} = \left( \frac{\text{Masse de cendres}}{\text{Masse de prise d'essai (g)}} \right) \times 100$$

VI

### II-2-3- Obtention de l'extrait sec de *Ahoutou*

Le « *Ahoutou* » a été fourni sous forme de décocté par un tradithérapeute qui le produit et le commercialise de façon artisanale. Le décocté se présente sous forme d'un liquide de couleur brune. Après filtration, le décocté a été concentré au rotavapor sous vide à 46°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé pour les différents tests.

### II-2-4- Extraction

Les extraits obtenus à partir de poudres ont été préparés selon les procédés classiques de préparation d'extraits utilisés en milieu villageois que sont l'infusion, la décoction et la macération. Cela a permis d'obtenir des extraits aqueux.

#### II-2-4-1- Décoction

Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée. L'ensemble a été maintenu en ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement, filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor sous vide à 46°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures (figure 13). Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé pour les différents tests.

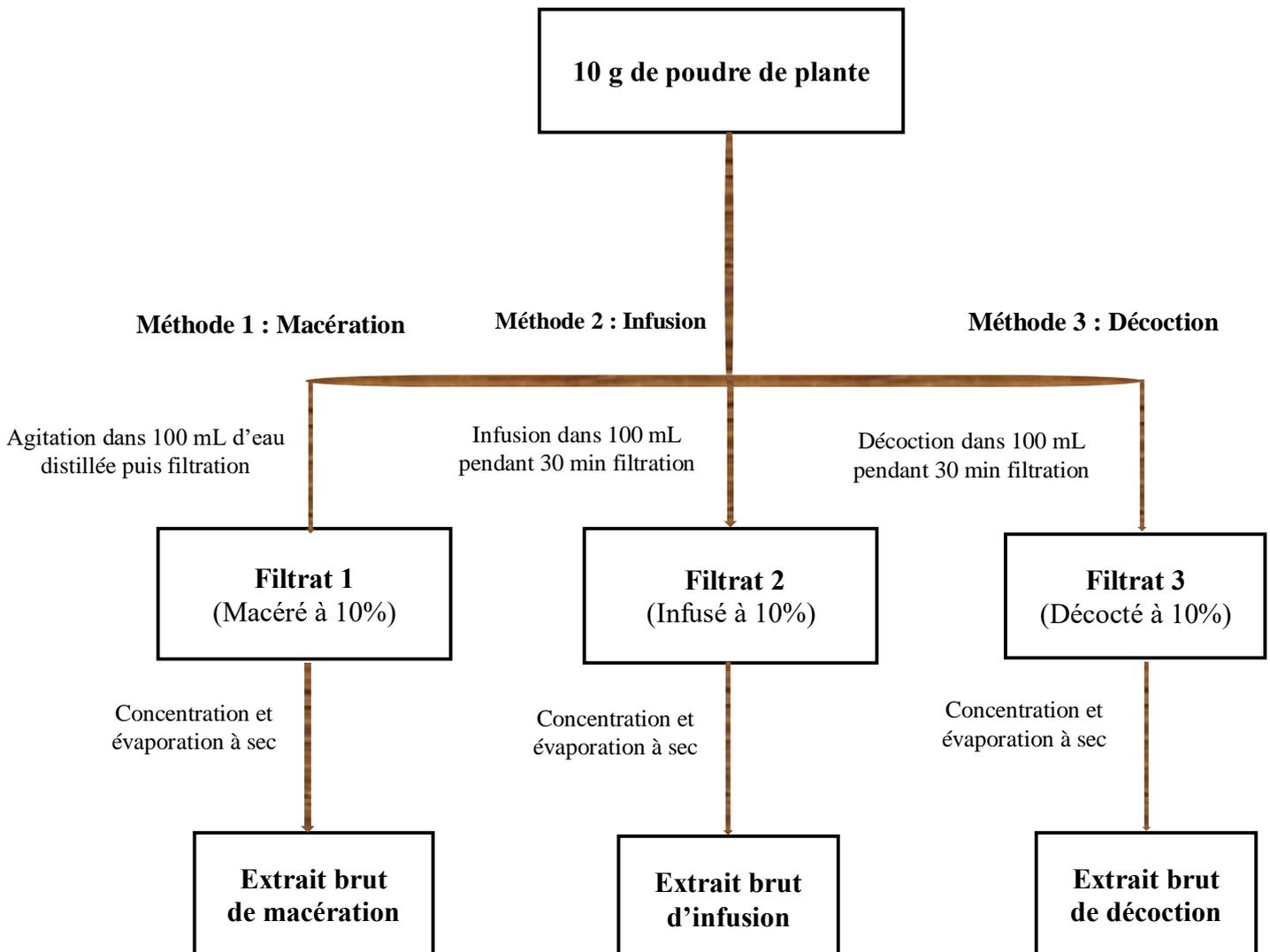
#### II-2-4-2- Infusion

Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée bouillante. L'ensemble a été refroidi pendant 30 minutes. Après filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor sous vide à 46°C. L'extrait a été ensuite

mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures (Figure 13). Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé pour les différents tests.

### II-2-4-3- Macération aqueuse

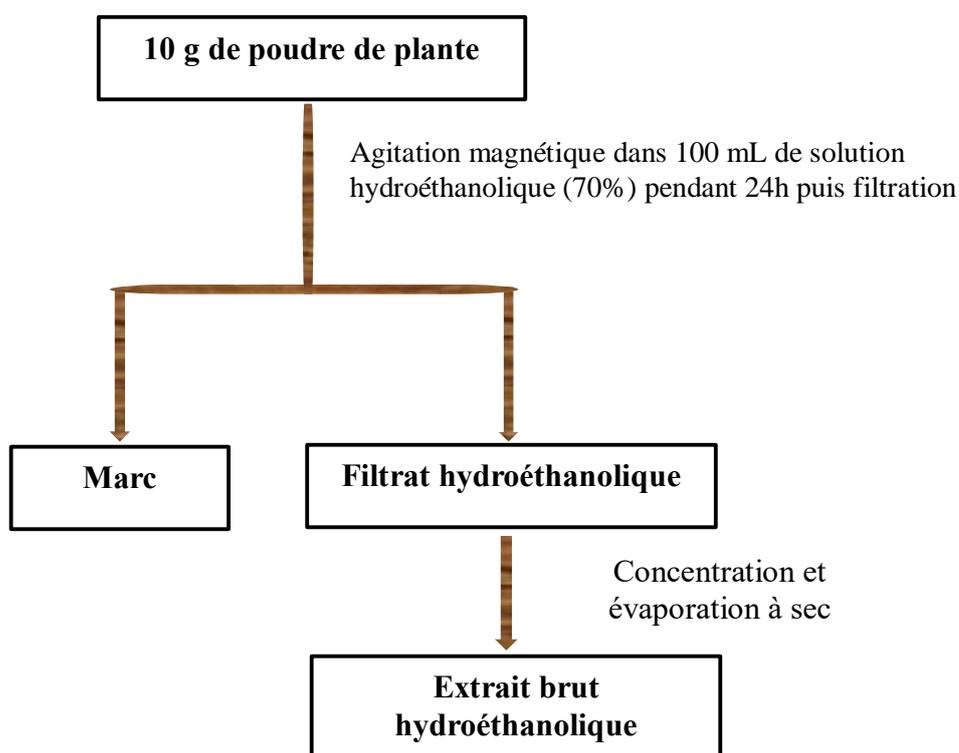
Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée. L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 24h à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor sous vide à 46°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures (Figure 13). Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé pour les différents tests.



**Figure 13** : Schéma d'extraction par macération, par infusion et par décoction dans l'eau

#### II-2-4-4- Macération hydroalcoolique

Une prise d'essai de 10 g de mélange de poudre des trois plantes a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'une solution hydroéthanolique (70/30 ; v/v). L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 24h à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor sous vide à 46°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures (Figure 14). Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé pour les différents tests.



**Figure 14 :** Schéma d'extraction à partir d'éthanol-eau (70/30 ; v/v)

#### II-2-5- Détermination du rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant le transfert du filtrat à évaporer) (Mohammedi, 2005). Le rendement d'extraction est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rendement} = \left( \frac{\text{Masse d'extrait sec}}{\text{Masse de la matière végétale}} \right) \times 100$$

VII

## II-2-6- Extraction des flavonoïdes totaux des extraits issus de la combinaison de trois plantes

### II-2-6-1- Paramètres d'études

Ce travail a consisté à déterminer un modèle mathématique du taux d'extraction des flavonoïdes totaux issus des trois plantes qui composent la recette *Ahoutou*. Les paramètres répertoriés susceptibles d'influencer la diffusion des flavonoïdes totaux sont : le mode d'extraction, le ratio, le temps d'extraction et la nature de la solution (**Koffi, 2014**).

Afin de mimer l'élaboration de la recette « Ahoutou » qui utilise l'eau et les feuilles, trois variables ont été prises en compte dans le cadre de notre étude, A savoir :

- Le temps :  $X_1$ , le temps d'extraction des flavonoïdes totaux (5 min, 25 min et 45 min)
- Le Ratio :  $X_2$ , les différentes permutations des proportions des trois plantes lors du mélange (10%, 20% et 70%)
- Mode d'extraction :  $X_3$ , les différents modes d'extractions classiques (Infusion, Décoction et Macération)

Ces trois facteurs ont l'avantage d'être facilement contrôlables, même à l'échelle artisanale.

### II-2-6-2- Traitement mathématique

Le taux d'extraction des flavonoïdes totaux ( $y$ = Teneurs en flavonoïdes totaux extraits dans 10 g de mélange de feuilles des trois plantes dans les proportions de 10%, 20% et 70%) dépend des facteurs principaux  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ , traduit mathématiquement par :

$$y = Y + \varepsilon \quad \text{VIII}$$

Avec  $Y$  la valeur vraie,  $\varepsilon$  l'erreur expérimentale et  $y$  la teneur théorique en flavonoïdes totaux extrait dans 10 g de mélange est un modèle de 1<sup>er</sup> degré exprimé par :

$$y=f(X_1, X_2, X_3) = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3 \quad \text{IX}$$

On a :

- $a_0$ , le coefficient constant
- $a_i$ , les coefficients des facteurs principaux  $X_i$
- $a_{ij}$ , les coefficients des facteurs d'interaction  $X_iX_j$

Les coefficients du modèle  $y$  ont été déterminés par une régression linéaire à l'aide de l'utilitaire d'analyse de Microsoft Excel. L'étude expérimentale consistera donc à mettre en évidence les effets des facteurs sur la réponse. Le plan de mélange à niveau mixte semble être adapté à la résolution de ce type de problème. L'extraction des flavonoïdes totaux de la combinaison des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*, lors de la préparation d'extraits par infusion, par macération et par décoction a permis de fixer les niveaux bas et haut de trois paramètres technologiques étudiés (le mode d'extraction, le ratio et le temps d'extraction) comme indiqué au tableau X. Pour le ratio, les différentes permutations des proportions (10%, 20% et 70%) des trois plantes permettent de réaliser six (6) mélanges ou ratios possibles. Dans ce travail, on a supposé (10% A+20% C+70% P) comme ratio le plus bas et (70% A+20% C+10% P) comme ratio le plus haut. Ainsi, les différents codes affectés aux facteurs principaux sont représentés dans le tableau XI.

**Tableau X** : Facteurs principaux et leurs domaines de variation

Facteur	Désignation	Niveau bas	Niveau haut
Temps	X <sub>1</sub>	5 min	45 min
Mode d'extraction	X <sub>2</sub>	Infusion	Décoction
Ratio	X <sub>3</sub>	10% A+20% C+70% P	70% A+20% C+10% P

**Tableau XI** : Les différents codes des paramètres technologiques

Temps d'extraction (min, X <sub>1</sub> )	Codes
5	-1
25	0
45	1
Ratio (proportion des broyats lors des mélanges, X <sub>2</sub> )	
70% A+20% C+10% P	1
70% A+10% C+20% P	0,6
20% A+70% C+10% P	0,2
20% A+10% C+70% P	-0,2
10% A+70% C+20% P	-0,6
10% A+20% C+70% P	-1
Mode d'extraction (X <sub>3</sub> )	
Infusion	-1
Macération	0
Décoction	1

### II-2-6-3- Caractéristiques du plan

Notre choix s'est porté sur un plan de mélange à niveau mixte. Ce plan nécessite 3x6x3 essais soit 54 essais pour les facteurs. Ces essais ont été réalisés en triple et la valeur moyenne du taux d'extraction des flavonoïdes totaux a été retenue comme la réponse y pour l'essai considéré. Les caractéristiques du plan sont regroupées dans le tableau XII et les différents essais de l'expérience sont représentés dans le tableau XIII.

**Tableau XII** : Caractéristiques du plan

<b>Objectif de l'étude</b>	<b>Étude dans le domaine expérimental</b>
Nombre de variables	3
Nombre d'essais	54
Nombre de coefficients	8
Nombre de réponses	1

**Tableau XIII : Les différents essais de l'expérience**

N° Essais	Niveaux des paramètres technologiques				N° Essais	Niveaux des paramètres technologiques			
	X1	X2	X3			X1	X2	X3	
1	5	70% A+20% C+10% P	Infusion		28	5	10% A+70% C+20% P	Macération	
2	25	70 A+20% C+10% P	Infusion		29	25	10% A+70% C+20% P	Macération	
3	45	70% A+20% C+10% P	Infusion		30	45	10% A+70% C+20% P	Macération	
4	5	70% A+10% C+20% P	Infusion		31	5	10% A+20% C+70% P	Macération	
5	25	70% A+10% C+20% P	Infusion		32	25	10% A+20% C+70% P	Macération	
6	45	70% A+10% C+20% P	Infusion		33	45	10% A+20% C+70% P	Macération	
7	5	20% A+70% C+10% P	Infusion		34	5	20% A+10% C+70% P	Macération	
8	25	20% A+70% C+10% P	Infusion		35	25	20% A+10% C+70% P	Macération	
9	45	20% A+70% C+10% P	Infusion		36	45	20% A+10% C+70% P	Macération	
10	5	10% A+70% C+20% P	Infusion		37	5	70% A+20% C+10% P	Décoction	
11	25	10% A+70% C+20% P	Infusion		38	25	70% A+20% C-10% P	Décoction	
12	45	10% A+70% C+20% P	Infusion		39	45	70% A+20% C-10% P	Décoction	
13	5	10% A+20% C+70% P	Infusion		40	5	70% A+10% C+20% P	Décoction	
14	25	10% A+20% C+70% P	Infusion		41	25	70% A+10% C+20% P	Décoction	
15	45	10% A+20% C+70% P	Infusion		42	45	70% A+10% C+20% P	Décoction	
16	5	20% A+10% C+70% P	Infusion		43	5	20% A+70% C+10% P	Décoction	
17	25	20% A+10% C+70% P	Infusion		44	25	20% A+70% C+10% P	Décoction	
18	45	20% A+10% C+70% P	Infusion		45	45	20% A+70% C+10% P	Décoction	
19	5	70% A+20% C+10% P	Macération		46	5	20% A+10% C+70% P	Décoction	
20	25	70% A+20% C-10% P	Macération		47	25	20% A+10% C+70% P	Décoction	
21	45	70% A+20% C-10% P	Macération		48	45	20% A+10% C+70% P	Décoction	
22	5	70% A+10% C+20% P	Macération		49	5	10% A+70% C+20% P	Décoction	
23	25	70% A+10% C+20% P	Macération		50	25	10% A+70% C+20% P	Décoction	
24	45	70% A+10% C+20% P	Macération		51	45	10% A+70% C+20% P	Décoction	
25	5	20% A+70% C+10% P	Macération		52	5	10% A+20% C+70% P	Décoction	
26	25	20% A+70% C+10% P	Macération		53	25	10% A+20% C+70% P	Décoction	
27	45	20% A+70% C+10% P	Macération		54	45	10% A+20% C+70% P	Décoction	

## II-2-7- Analyses qualitatives

### II-2-7-1- Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est réalisé sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. Il a porté sur les extraits aqueux et hydroéthanolique des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*. Les différents groupes chimiques ont été caractérisés selon les techniques décrites dans les travaux de **Békro et al. (2007)** et de **Bruneton (2009)**.

❖ **Mise en évidence des polyphénols (Réaction au chlorure ferrique)**

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**

Dans un tube contenant 3 mL de la solution d'extrait, quelques gouttes d'une solution de NaOH 10 % sont ajoutées. Une coloration jaune-orangée caractérise la présence des flavonoïdes.

❖ **Mise en évidence des alcaloïdes**

Après avoir évaporé à sec dans une capsule, 4 mL de chaque solution, le résidu est repris dans 4 mL d'alcool à 60 °C. La solution alcoolique est répartie dans 2 tubes à essais.

- Dans le premier tube, 2 gouttes de réactif de Bouchardat (réactif iodo-ioduré) sont ajoutées. L'observation d'un précipité de coloration brun-rougeâtre indique une réaction positive.
- Dans l'autre tube, sont ajoutés 2 gouttes de réactif de Dragendorff (solution aqueuse d'iodo-bismuth de potassium). L'apparition d'un précipité ou d'une coloration orangée indique la présence d'alcaloïdes.

❖ **Mise en évidence des tanins**

Dans un tube à essai contenant 1 mL de l'infusât, a été ajoutée 1 mL d'une solution aqueuse diluée de FeCl<sub>3</sub> à 1%. En présence de tannins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

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

Dans un tube à essai contenant 10 mL d'eau distillée est dissout 0,1 g d'extrait de plante. 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 stérols et polyterpènes (Réaction de Liebermann)**

Un extrait de 0,1 g est dissous à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique dans une capsule puis repris dans un tube à essai où sont coulés 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. L'apparition d'une coloration violette, qui vire au bleu puis au vert, révèle la présence de stérols et triterpènes.

## **II-2-7-2- Activité antiradicalaire : Test qualitatif du DPPH**

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 passe du violet au jaune (Blois, 1958).

Les plaques CCM ont été utilisées pour déceler l'activité antioxydante des extraits. Ces plaques sont en aluminium recouvertes de silice (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck). Sur ces plaques de silicagel, 10 µL d'une solution de concentration 1mg/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 (BAW) 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-2-7-3- Préparation des solutions**

Les extraits secs ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée afin d'avoir des solutions aqueuses d'une concentration de 1 mg/mL pour tous les échantillons.

### **II-2-8- Analyse quantitative**

#### **II-2-8-1- Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux**

La méthode de (Wood *et al.*, 2002) a été utilisée pour le dosage des polyphénols totaux. Un volume de 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1/10) a été ajouté à 30 µL d'extrait. Le mélange a été maintenu pendant 2 minutes dans l'obscurité à température ambiante, puis 2 mL de solution de carbonate de calcium (75 g.L<sup>-1</sup>) ont été ajoutés. Ensuite, le mélange a été placé pendant 15 minutes au bain-marie à 50°C, puis refroidi rapidement. L'absorbance a été mesurée à 760 nm, avec de l'eau distillée comme blanc. Une droite d'étalonnage a été réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations (Annexe 1). Les analyses ont été réalisées en triple et la concentration en polyphénols a été exprimée en gramme par litre d'extrait équivalent acide gallique (mg. Eq AG/mL).

### II-2-8-2- Dosage spectrophotométrie des flavonoïdes totaux

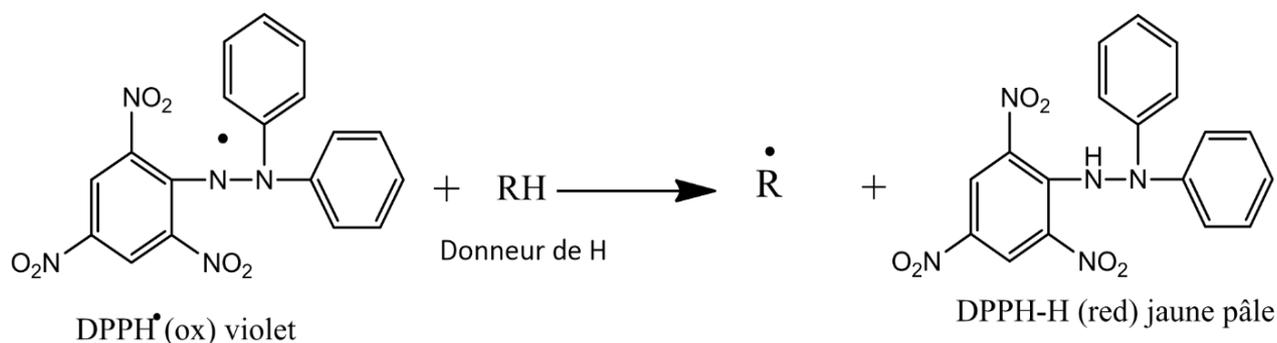
La méthode de (Marinova *et al.*, 2005) a été utilisée pour le dosage des flavonoïdes totaux. Dans une fiole de 25 mL, 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5% (m/v) a été ajouté à 2,5 mL d'extrait. Le mélange a été additionné de 0,75 mL de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10% (m/v), puis incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. Après l'incubation, 5 mL de soude (NaOH, 1N) ont été ajoutés puis le volume a été complété à 25 mL. Le mélange a été agité vigoureusement avant d'être dosé au spectrophotomètre Jasco V-530 (JASCO, Japon). La lecture a été faite à 510 nm. Les essais ont été réalisés en triple. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme par litre d'extrait équivalent quercétine (mg EQ /mL).

### II-2-8-3- Evaluation de l'activité antioxydante

Cette évaluation comporte plusieurs étapes qui sont la mesure du pouvoir antiradicalaire DPPH (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl) et du piégeage du ABTS (2,2'-azynobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]).

#### II-2-8-3-1- Mesure du pouvoir antiradicalaire : Test quantitatif du DPPH

La méthode de Blois *et al.* (1958) a été utilisée avec quelques modifications pour la détermination du potentiel antioxydant. Cette méthode consiste à mesurer l'activité antiradicalaire par la technique de piégeage du radical au DPPH (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl). Le DPPH, (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ; PM= 394,33), est un radical libre stable soluble dans le méthanol (ou éthanol). D'une couleur violette intense, il présente un maximum d'absorbance à 517 nm. Lorsqu'une molécule antioxydante réduit le radical DPPH, la couleur violette disparaît rapidement pour donner une couleur jaune pâle (Figure 15).



**Figure 15 :** Réaction de réduction du DPPH (Blois, 1958)

L'activité antioxydante des extraits *in vitro* a été effectuée selon les étapes suivantes :

### ❖ Préparation des extraits et de l'acide ascorbique

Les extraits aqueux secs et l'acide ascorbique (antioxydant de référence) dissous dans le méthanol à une concentration de 1 mg/mL ont été dilués à différentes concentrations croissantes (0,025-0,05-0,1-0,2-0,3 mg/mL).

### ❖ Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH a été solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution d'une concentration de  $6,34 \cdot 10^{-5}$  M (0,0025 g DPPH dans 100 mL méthanol). La solution obtenue a été conservée à l'abri de la lumière.

### ❖ Détermination du potentiel antioxydant

La détermination de pouvoir antioxydant est basée sur la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant. Le spectrophotomètre UV-Visible de marque Jasco V-530 (JASCO, Japon) a été calibré à l'aide d'un blanc constitué de méthanol pur à une longueur d'onde de 517 nm. Un volume de 1950  $\mu$ L de la solution du DPPH, a été ajouté à 50  $\mu$ L de chaque extrait et de l'acide ascorbique préparé dans les mêmes conditions que les extraits à tester. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à la température ambiante (25°C) dans le noir, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance des extraits testés a été lue à 517 nm contre celle d'un blanc qui ne contient que la solution méthanolique de DPPH. L'activité antiradicalaire des extraits testés correspondant au pourcentage d'inhibition (PI) du radical DPPH est calculée selon l'équation suivante :

$$PI(\%) = \left( \frac{(A_0(\text{Absorbance du blanc}) - A(\text{Absorbance de l'extrait}))}{(A_0(\text{Absorbance du blanc}))} \right) \times 100$$

X

Ou  $A_0$  est l'absorbance du témoin négatif ; ce dernier contient du DPPH et du méthanol sans extrait. La concentration  $CI_{50}$  (mg/mL) qui correspond à la concentration de l'extrait des feuilles où l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé.

### II-2-8-3-2- Piégeage du ABTS

Cette méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ . Le radical  $ABTS^{\bullet+}$ , en contact avec un donneur de  $H\bullet$  conduit à l' $ABTS^+$  et à la décoloration à 734 nm de la solution (Re *et al.*, 1999). La

capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester. Le test a été réalisé selon la méthode décrite par **Choong et al. (2007)**.

Le radical-cation ABTS<sup>o+</sup> a été produit par réaction de 8 mM ABTS (87,7 mg dans 20 mL d'eau distillée) et 3 mM de persulfate de potassium (0,0162 g dans 20 mL eau distillée) dans un ratio 1 :1 (v/v). Le mélange a été ensuite incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 12-16 heures. Cette solution d'ABTS<sup>o+</sup> a été diluée avec du méthanol de sorte à obtenir une solution dont l'absorbance est de 0,7±0,02 à 734 nm. Ainsi, une prise d'essai de 3,9 mL de cette solution diluée d'ABTS<sup>o+</sup> ont été ajoutés à 100 µL du composé à tester. Après Agitation, le mélange a été incubé pendant 6 minutes à l'obscurité (T=30±2°C). L'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>o+</sup> a été ensuite mesurée à 734 nm au spectrophotomètre UV-visible et devrait être comprise entre 20%-80% de l'absorbance du blanc.

Les essais ont été réalisés en triple et les résultats ont été exprimés en µmol Trolox équivalent par litre d'extrait (µmol/L TE).

L'activité des composés est exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace. Les concentrations suivantes de trolox: 3,75; 5; 6,25; 10; 11,25, 13,75 et 15.10<sup>-4</sup> mM, ont été préparées et le taux d'inhibition (%I) de l'ABTS<sup>o+</sup> a été exprimé comme suit:

$$(\%)I = \left( \frac{(A_0(\text{Absorbance du blanc}) - A (\text{Absorbance de l'extrait}))}{(A_0(\text{Absorbance du blanc}))} \right) \times 100$$

XI

- Absorbance du contrôle = absorbance ABTS dilué,
- Absorbance de l'extrait = absorbance ABTS dilué + échantillon

## II-2-9- Détermination du profil en polyphénols et en alcaloïdes de Ahoutou et des extraits optimisés par HPLC

### II-2-9-1- Détermination des composés par dosage HPLC

L'analyse des composés phénoliques et des alcaloïdes dans la recette Ahoutou et des extraits optimisés (formulations) a été faite par HPLC avec un système de marque Shimadzu SPD 20 A (Figure 16), qui permet l'identification et la quantification des molécules.



**Figure 16 : HPLC SHIMADZU SPD 20 A**

### **II-2-9-2- Principe**

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide sous pression environ 70 bar (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins.

Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR)

Les polyphénols et les alcaloïdes contenus dans chaque extrait analysé sont identifiés par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux des témoins (tableau XIV).

### **II-2-9-3- Conditions d'analyse des polyphénols**

Nous avons utilisé la méthode HPLC pour analyser les extraits bruts. Ce travail nous permet de déterminer le profil des composés polyphénols et des alcaloïdes contenus dans chaque extrait. L'identification des composés a été analysée par une comparaison avec les témoins existant au laboratoire.

Les mesures ont été réalisées à la longueur d'onde 280 nm. Les éluants ont été dégazés ; les extraits et les standards ont été filtrés sur membrane millipore (0,45 µm) pour éviter d'endommager la colonne et limiter les interférences dues aux impuretés. Le système d'éluant est celui utilisé par **Nakatani *et al.* (2000)** et se compose de :

A : 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à pH 2,6

B : 80 % acétonitrile, 20 % A

C : 200 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (acide phosphorique) à pH 1,5 ; (v /v/v ) suivant un mode gradient pendant 60 min selon les proportions suivantes (tableau XV).

**Tableau XIV:** Table du gradient d'éluant des extraits en HPLC

Gradient Instants (min)	%A	%B	%C
0 – 4	100	0	0
4 – 10	92	8	0
10 - 22,5	0	14	86
22,5 - 27,5	0	16,5	83,5
27,5 – 50	0	25	75
50 – 55	0	80	20
55 – 60	100	0	0

**Tableau XV:** Temps de rétention des composés phénoliques standards

Standards	Temps de rétention (min)
Acide gallique	3,264
Glycoside	3,66
Acide caféique	4,365
Kaempferol	4,610
Myricétine	5,248
Quercétine	5,443
Génistéine	5,687
Resvératrol	6,482
Naringénine	7,011
Catéchine	8,263
Epicatéchine	8,593
Cyanidine	10,464
Quinine	17,080
Codéine	20,904
Morphine	21,703
Atropine	24,951
Cortisol	27,109

## II-2-10- Tests réalisés sur *Plasmodium falciparum*

### II-2-10-1- Préparation des milieux de cultures

#### ❖ Préparation du milieu de lavage

Un volume de 312,5 µL de gentamycine (40 mg/mL) et 12,60 mL de tampon HEPES (1 M) ont été ajoutés à 500 mL de milieu RPMI 1640 et le mélange a été homogénéisé et conservé au réfrigérateur à 4 °C. Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire (STERILGUARD).

#### ❖ Préparation du milieu stock

Un volume de 100 mL d'hypoxanthine est ajouté à 450 mL du milieu RPMI 1640 et 25 g d'Albumax y sont dissouts. Le volume est ajusté à 500 mL et après homogénéisation, la solution est filtrée sur filtre millipore de 0,22 µm à l'aide d'un sterilcup (GP Millipore, 0,22 µm) puis conservée à 4 °C. Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire (STERILGUARD).

#### ❖ Préparation du milieu complet

Un volume de 12,60 mL de tampon HEPES (25 µM, Eurobio) et 3,14 mL L-glutamine (2 mM, Eurobio) sont ajoutés au milieu RPMI 1640 (Eurobio). Après homogénéisation du milieu, 60 mL du volume sont retirés, puis 10 mL de sérum humain décomplémenté et 50 mL de la solution stock sont ajoutés ; 1 g de glucose (20 g/L, Wagtech) et 312,5 µL de gentamycine (40 mg/mL, Eurobio) sont aussi ajoutés au mélange. Après homogénéisation, le milieu est filtré sur filtre millipore de 0,22 µm à l'aide d'un sterilcup (GP Millipore, 0,22 µm) puis conservé à 4 °C. Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire (STERILGUARD).



**Figure 17 : Milieux de culture**

**A** : Milieu complet et **B** : Milieu RPMI 1640

## II-2-10-2- Culture continue

### II-2-10-2-1- Décongélation des souches de *Plasmodium falciparum* (Basco, 2007)

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 de 15 mL stérile. Après 5 minutes de centrifugation à 3000 tr/min, le surnageant est retiré et un volume (égal au volume initial dans le cryotube) d'une solution de 3,5% de NaCl est ajouté goutte à goutte en agitant doucement le tube. Le mélange est laissé au repos pendant 1 minute à température ambiante avant d'être centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Puis 12 mL de RPMI (préchauffé à 37 °C) sont ajoutés, mélangés légèrement, avant d'être centrifugés à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Après cette dernière centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot repris dans 8 mL du milieu complet.

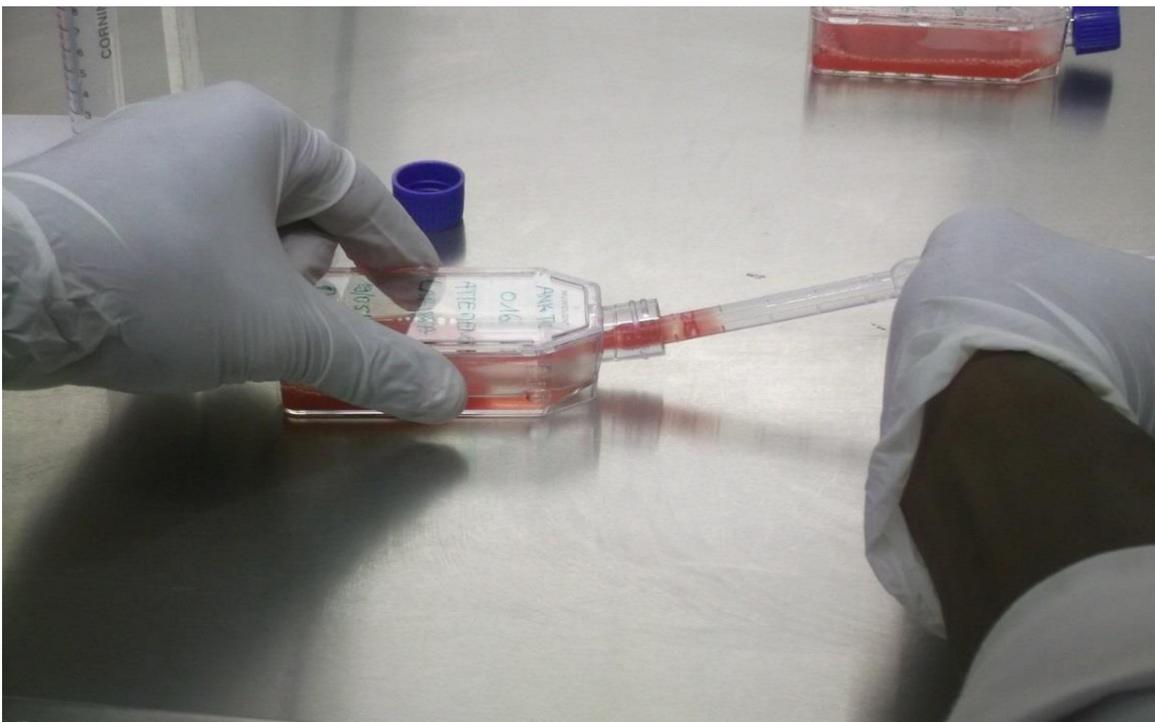
### II-2-10-2-2- Préparation des hématies saines

Le sang de groupe O, Rhésus positif, est prélevé chez des personnes non porteuses de *Plasmodium*. 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 5 minutes pour éliminer le plasma et les globules blancs. Les globules rouges sains ont été conservés à + 4 °C.

#### **II-2-10-2-3- Mise en culture de *Plasmodium falciparum***

La culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* est effectuée selon la méthode décrite par (Basco, 2007). En effet, les trophozoïtes (jeunes et âgés) de *Plasmodium falciparum* sont mis en culture dans des boîtes de culture cellulaire stériles (Nunc WVR) de 25 mL avec le milieu complet et des érythrocytes sains afin d'atteindre un hémocrite de 2 % (figure 18). Les globules rouges utilisés sont du groupe O Rhésus positif, pour une bonne compatibilité sérique. La culture est ensuite confinée dans une cloche à bougie et placée dans un incubateur maintenu à 37 °C. La parasitémie est maintenue à 0,3 % par dilution quotidienne pour permettre un développement du parasite dans les conditions optimales. La parasitémie est alors déterminée au moyen d'un frottis sanguin mince par comptage visuel au microscope optique à immersion (LEICA®) au grossissement (×100).



**Figure 18 :** Mise en Culture de *Plasmodium falciparum* dans des flasques à culture

#### **II-2-10-2-4- Entretien quotidien de la culture et contrôle de la parasitémie**

La boîte de culture est sortie de l'étuve et secouée tout doucement. Une fois homogénéisée, la culture est retirée de la boîte à l'aide d'une pipette stérile et mise dans un

tube Falcon de 15 mL. Le contenu est ensuite centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes, puis le surnageant est retiré.

Dix (10)  $\mu$ L du culot globulaire a été utilisé pour réaliser un frottis sanguin et une goutte épaisse afin d'évaluer la parasitémie de la culture. Après cela, des hématies saines ont été ajoutées au culot dans le but de ramener la parasitémie à 0,3 %.

La parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope (x 100) à partir d'un frottis sanguin, coloré au Giemsa.

#### **II-2-10-2-5- La synchronisation**

Le parasite 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 D-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.

Pour réaliser la synchronisation décrite par **Lambros et Vanderberg (1979)**, la culture doit nécessairement avoir une parasitémie supérieure à 5 %. Ainsi, la culture est centrifugée à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Le volume de surnageant est ensuite remplacé par un même volume d'une solution de D-sorbitol 5 % (dans l'eau distillée stérile) et le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée et le culot est lavé 3 fois avec du milieu de lavage. Le culot est par la suite ajusté avec le milieu de culture pour obtenir un hémocrite de 2 % avant sa remise en culture.

#### **II-2-10-3- Culture *ex-vivo***

##### **II-2-10-3-1- Collecte des échantillons**

Les patients venus en consultation à la Formation Sanitaire Urbaine et Communautaire de Abobo Anonkoua Kouté, après un diagnostic clinique du paludisme simple ont été orientés au laboratoire d'analyse pour le diagnostic biologique par Test de Diagnostic Rapide (TDR). Les patients présentant un TDR positif pour la mono infection à *Plasmodium falciparum* 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 contenant de l'EDTA préalablement identifiés. Les échantillons sanguins sont ensuite acheminés au Laboratoire de paludologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

### **II-2-10-3-2- Préparation des globules rouges parasités**

Les isolats de *Plasmodium falciparum* ont été prélevés dans des conditions stériles dans des tubes contenant de l'EDTA chez des personnes souffrant de paludisme simple puis acheminés au laboratoire. Le sang parasité est lavé trois fois avec du RPMI par centrifugation à 3000 tours par minute pendant 5 minutes pour éliminer le plasma et les globules blancs. Parallèlement, des gouttes épaisses et frottis sanguins ont été réalisés en duplicat afin d'évaluer la parasitémie des échantillons. Les parasitémies supérieures à 0,3 % ont été diluées dans des hématies saines du groupe O Rhésus positif pour obtenir des parasitémies inférieures à 0,3 %.

### **II-2-10-3-3- Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé à partir du culot globulaire parasité et du milieu complet. Quatre isolats cliniques ANK137, ANK138, ANK139 et ANK140 dont les parasitémies étaient inférieures à 0,3%, neuf plaques de 96 puits ont été utilisées à raison de 3 plaques par isolats cliniques. Pour chaque plaque, un volume d'inoculum de 12 mL a été préparé. Ainsi les volumes des différents constituants de l'inoculum étaient de 11,76 mL du milieu complet et de 240 µL de GRP pour un hémocrite de 2%.

### **II-2-10-3-4- Préparation de la gamme de concentration**

Les solutions mères des extraits bruts à tester ont été préparées à la concentration de 1 mg/mL. Pour ce faire, 10 mg d'extrait ont été dissout dans 10 mL d'eau distillée. Une agitation au vortex pendant au moins 10 minutes a été effectuée afin de dissoudre complètement l'extrait. La solution obtenue a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes selon la méthode décrite par **Bolou et al. (2011)**. Dans le premier puits (témoin de croissance parasitaire, donc sans produit), 100 µL de milieu complet + 100 µL de suspension globulaire parasité ont été ajoutés. Dans le second puits (puits test), 100 µL de l'extrait à tester + 100 µL de suspension globulaire parasité ont été mis. Dans les autres puits, 100 µL du milieu complet ont été ajoutés (tableau XVI). A partir des puits test contenant les solutions mères de concentration 100 µL/mg de l'extrait ou 800 ng/mL pour la Dihydroartémisinine (DHA), des dilutions successives au demi (1/2) ont été réalisées. Ensuite, après homogénéisation, 100 µL de solution mère (second puits) sont prélevés et ajoutés au puits suivant et ainsi de suite. Après homogénéisation du dernier puits, 100 µL sont prélevés puis jetés.

**Tableau XVI** : Plan de plaque des isolats cliniques et de la souche de référence de *Plasmodium falciparum*

T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
DHA:C1	DHA:C1	E3:C1	E3:C1	E6:C1	E6:C1	E9:C1	E9:C1	E13:C1	E13:C1	E14:C1	E14:C1
DHA:C2	DHA:C2	E3:C2	E3:C2	E6:C2	E6:C2	E9:C2	E9:C2	E13:C2	E13:C2	E14:C2	E14:C2
DHA:C3	DHA:C3	E3:C3	E3:C3	E6:C3	E6:C3	E9:C3	E9:C3	E13:C3	E13:C3	E14:C3	E14:C3
DHA:C4	DHA:C4	E3:C4	E3:C4	E6:C4	E6:C4	E9:C4	E9:C4	E13:C4	E13:C4	E14:C4	E14:C4
DHA:C5	DHA:C5	E3:C5	E3:C5	E6:C5	E6:C5	E9:C5	E9:C5	E13:C5	E13:C5	E14:C5	E14:C5
DHA:C6	DHA:C6	E3:C6	E3:C6	E6:C6	E6:C6	E9:C6	E9:C6	E13:C6	E13:C6	E14:C6	E14:C6
DHA:C7	DHA:C7	E3:C7	E3:C7	E6:C7	E6:C7	E9:C7	E9:C7	E13:C7	E13:C7	E14:C7	E14:C7

T	T										
E16:C1	E16:C1										
E16:C2	E16:C2										
E16:C3	E16:C3										
E16:C4	E16:C4										
E16:C5	E16:C5										
E16:C6	E16:C6										
E16:C7	E16:C7										

DHA : Dihydroartémisinine

E3 : Extrait Décocté d'*Azadirachta indica*,

E6 : Extrait Décocté de *Cymbopogon citratus*

E9 : Extrait Décocté de *Psidium guajava*,

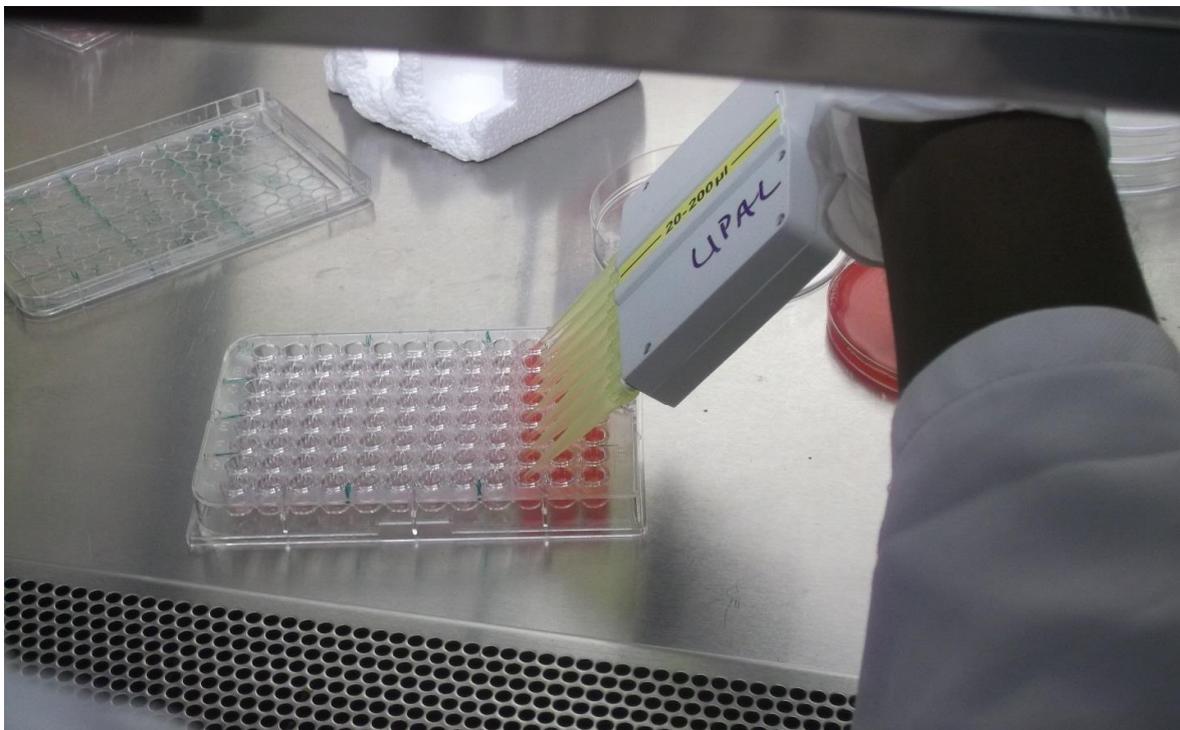
E13 : Ahoutou

E14 : Extrait Décocté combinaison ( A<sub>10</sub>+C<sub>20</sub>+P<sub>70</sub>),

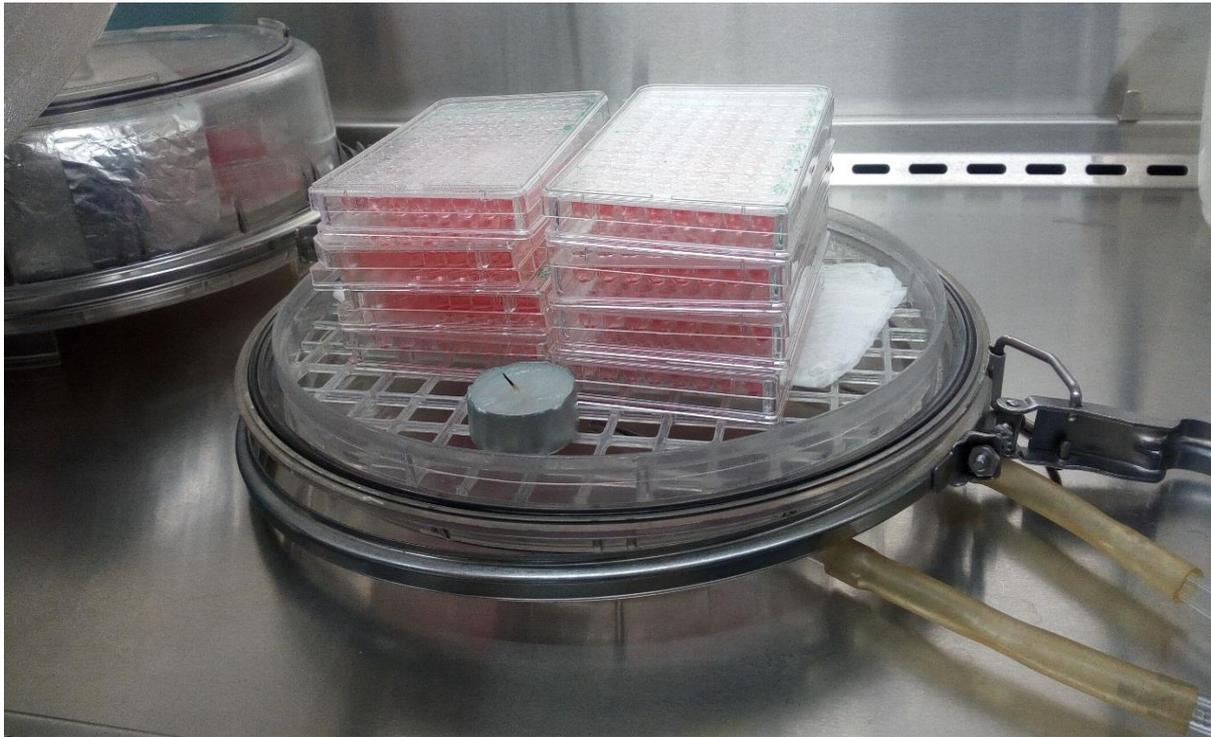
E16 : Extrait hydroéthanolique combinaison ( A<sub>10</sub>+C<sub>20</sub>+P<sub>70</sub>)

Par la suite, 100  $\mu\text{L}$  de l'inoculum sont ajoutés dans les puits contenant les extraits de plantes et la chloroquine. Ce qui a permis d'obtenir la gamme de concentration de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les extraits bruts.

Quant à la molécule de référence notamment la Dihydroartémisinine (DHA), une gamme de concentration de 800 nM ; 400 nM ; 200 nM ; 100 nM ; 50 nM ; 25 nM ; 12,5 nM a été obtenue (Figure 19). Les plaques de culture sont ensuite confinées dans une cloche à bougie et placées dans un incubateur maintenu à 37 °C (Figure 20). Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire (STERILGUARD).



**Figure 19** : Ajout de l'inoculum dans une Plaque à 96 puits contenant les Extraits



**Figure 20** : Plaques de culture à 96 puits

#### **II-2-10-3-5- Incubation et lecture**

##### **❖ Préparation du tampon de lyse**

Un tampon de lyse est 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  $\mu$ L de Triton X-100 sont ajoutés. Le volume a été ajusté à 500 mL avec de l'eau distillée.

La solution obtenue est filtrée avec un filtre millipore 0,22  $\mu$ m (Stericup Durapore®) et a été stockée à température ambiante (**Tuo, 2015**).

##### **❖ Mise en œuvre de la méthode au 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 des 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 tout 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. La fluorescence du complexe ADN-SYBR Green I est proportionnelle à la quantité d'ADN, qui est elle-même proportionnelle au nombre de parasites. La fluorescence

est alors évaluée à l'aide d'un spectrofluorimètre permettant ainsi de suivre la croissance parasitaire.

#### ❖ Lecture et détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>)

Les plaques de culture ont été mises à l'incubateur à 37 °C pendant 72 heures. La parasitémie a ensuite été évaluée par la méthode du SYBR Green. Un mix contenant 0,2 µL de SYBR Green par mL de tampon de lyse a été préparé. La lyse a été effectuée en transférant 100 µL de mix (tampon de lyse + SYBR Green) dans une plaque vierge.

A ces 100 µL de mix, 100 µL de la culture parasitaire ont été ajoutés. La plaque a été ensuite incubée pendant une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. Puis la lecture a été faite au spectrofluorimètre (BIOTEK, FLX 800) (Figure 21) à 528 nm après une excitation préalable à 485 nm. Les CI<sub>50</sub> (concentration d'extrait qui inhibe 50 % de la croissance parasitaire) et les coefficients de corrélation correspondants ont été déterminés graphiquement, en utilisant le logiciel IVART (*In Vitro* Analysis and Reporting Tool) du WWARN (**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)**.



**Figure 21** : Spectrofluorimètre, BIOTEK FLX 800 couplé à un ordinateur utilisé pour la mesure de l'activité antiplasmodiale

### II-2-10-3-6- Expression des résultats

L'activité antiplasmodiale des extraits végétaux et des composés purs a été classifiée selon **Bero *et al.* (2009)** et rapportée par **Beourou *et al.* (2017)** sur la base des  $CI_{50}$  comme suit:

**Tableau XVII:** Classification de l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes et des composés purs isolés (**Bero *et al.*, 2009; Beourou *et al.*, 2017**).

Extraits	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{M}$ )	Classification
Extraits bruts ( $\mu\text{g/mL}$ )	$>50$	Inactif
	$15 < CI_{50} < 50$	Effet modéré
	$5 < CI_{50} < 15$	Effet prometteur
	$< 5$	Effet puissant
Composés purs ( $\mu\text{M}$ )	$> 50$	Inactif
	$11 < CI_{50} < 50$	Composé peu actif
	$2 < CI_{50} < 11$	Composé actif
	$< 1$	Composé très actif (lead compound)

### II-2-11- Dosage quantitatif des minéraux

#### II-2-11-1- Préparation de l'échantillon

Les extraits étudiés (Ahoutou, décoction aqueux et hydroéthanolique optimisés) ont été séchés pendant 24 heures dans une étuve Memmert-Germany à  $60^{\circ}\text{C}$  minimum. Ils ont été ensuite conservés dans des fioles en plastique ou en verre.

A l'aide d'une balance de type Sartorius analytic (Angleterre), 0,3 g de poudre du matériel végétal séché à l'étuve à  $46^{\circ}\text{C}$  dans un creuset en porcelaine de 30 mL. Cette prise d'essai a été placée dans le four à moufle (Naberthem-Germany) réglé à  $600^{\circ}\text{C}$  pendant 5 heures. Après refroidissement, 2 mL d'acide chlorhydrique 0,5 N ont été ajoutés à la cendre obtenue puis porté à évaporation totale sur un bain de sable. Le résidu final récupéré, a été filtré dans une fiole jaugée de 100 mL et l'on a complété avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Pour ces analyses, Cinq (5) mL de cette solution ont été prélevé pour le dosage des minéraux : Fe, Na, Mg, Ca, Zn, Mn et K par Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (SAA).

Cinq (5) mL de l'échantillon ont été prélevés dans une fiole de 50 mL ; deux (2) mL de Lanthane à 5 % y ont été ajoutés avant de compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

## II-2-11-2- Préparation des réactifs

### II-2-11-2-1- Réactif de Lanthane

Une masse de 58,65 g de Lanthane ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) est mouillée avec 50 mL d'eau distillée. Sous la hotte, on a ajouté 250 mL d'acide chlorhydrique à 25 % concentré et on agite délicatement jusqu'à dilution complète du Lanthane à 5 %. La solution a été ensuite complétée à un litre avec l'eau distillée. Avant toute lecture, le spectrophotomètre d'absorption atomique doit être calibré. Pour ce faire, l'on prépare une solution étalon de 100 ppm à partir d'une solution commerciale dénommée multiélément de 1000 ppm. Cette préparation s'effectue comme suit : 2,5 mL de la solution mère (1000 ppm) sont introduits dans une fiole de 25 mL et complété avec de l'acide nitrique concentré jusqu'au trait de jauge. Cette solution a servi à préparer les gammes d'étalon.

### II-2-11-2-2- Réactif d'étalon

Des dilutions ont été réalisées à partir de solutions standard de chaque minéral (100 mg/L) en complétant les différents volumes initiaux à 50 mL avec de l'eau distillée, de sorte à obtenir une gamme de concentration précise pour chaque minéral. Ces solutions d'étalonnage ont été ensuite utilisées pour le calibrage du spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme. Les résultats des densités optiques (D.O.) lues à la longueur d'onde correspondant à chaque minéral ont permis de déterminer les quantités de minéraux contenus dans les échantillons. Les résultats ont été exprimés selon la formule suivante de **Clement et Francoise (2003)**.

$$T = \frac{C_{\text{ess}} - C_{\text{bl}}}{P_{\text{ess}}} \times V$$

XII

**Avec, C<sub>ess</sub>** : Concentration de l'essai (mg/mL), **C<sub>bl</sub>** : Concentration des éléments contenus dans la solution d'extraction (blanc) en mg/mL, **P<sub>ess</sub>** : Poids de l'essai (Kg), **V** : Volume de récupération de l'essai (mL), **T** : Teneur ( $\mu\text{g/g}$  ou  $\text{mg/Kg}$ )

**NB** : Les lectures au spectrophotomètre d'absorption atomique se font à 248,3 nm (Fe) ; 279,5 nm (Mn) ; 589 nm (Na) ; 258 nm (Zn) ; 285,2 nm (Mg) ; 766,5 nm (K) et 422,7 nm (Ca).

## **II-2-12- Eude des toxicités**

### **II-2-12-1- Evaluation de la toxicité aiguë d'Ahoutou et des extraits optimisés**

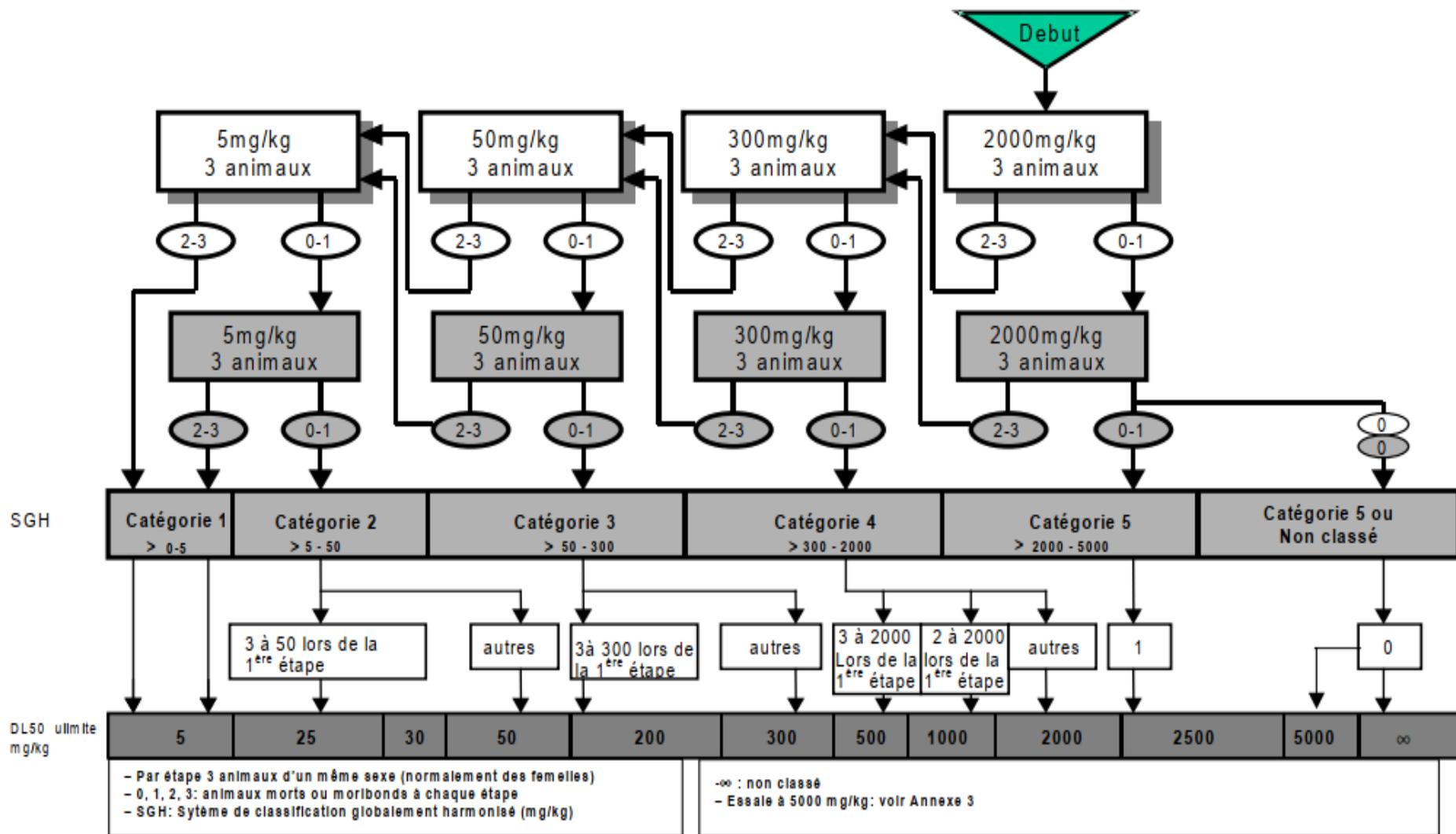
La toxicité aiguë des trois extraits a été évaluée selon la ligne directrice de l'OCDE 423 (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) pour les essais des produits chimiques. Cette méthode utilise des doses prédéterminées et donne des résultats qui permettent le classement des substances dans le système de classification globale harmonisé (SGH) de substances pour la toxicité aiguë.

#### **II-2-12-1-1- Principe**

La méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL<sub>50</sub>. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un même sexe préférentiellement de sexe femelle (OCDE, 1998) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante. Lorsqu'il y a mortalité et/ou un état moribond des animaux deux à quatre étapes sont en moyenne nécessaires pour évaluer la toxicité aiguë de la substance. La méthode permet de déterminer un intervalle de doses dans lequel se trouve la DL<sub>50</sub> (Figures 22). Les différentes catégories de classe de toxicité aiguë sont résumées dans le tableau XVIII.

#### **II-2-12-1-2- Conduite de l'expérimentation**

Après une semaine d'acclimatation, un total de douze rats préalablement mis à jeun pendant 4 h mais recevant de l'eau (OCDE 423, 2001) ont été regroupés dans des cages différentes par lot de trois pour chaque extrait et un lot de trois rats comme lot témoin. Les extraits ont été repris avec de l'eau distillée et administré en dose unique aux rats par gavage avec un volume de 1 mL de la solution. Le lot 1 (témoin) composé de trois rats a reçu 1 mL d'eau distillée pendant toute la durée de l'expérimentation. Les lots 2, 3 et 4 ont été utilisés respectivement pour l'administration du Ahoutou et deux autres extraits obtenus par optimisation notamment les extraits E<sub>14</sub> et E<sub>16</sub> à la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel (PC). Lorsqu'aucun mort ou état moribond n'est observé au bout de deux jours, trois autres rats sont utilisés dans une seconde étape pour l'essai confirmatoire. Si au bout de deux jours les mêmes résultats sont observés, alors la dose supérieure est utilisée suivant la même méthode. Pendant les deux semaines, les rats ont été observés afin d'examiner leur comportement général, les signes de toxicité, les manifestations nerveuses et la mortalité.



**Figure 22 :** Schéma d'essai avec une dose initiale de 2000 mg/kg

**Tableau XVIII:** Différentes catégories de classe de toxicité aiguë

Catégories	Classe de toxicité
$DL_{50} \leq 5 \text{ mg/kg.pc}$	Très toxique
$5 \leq DL_{50} \leq 50 \text{ mg/kg.pc}$	Toxique
$50 \leq DL_{50} \leq 300 \text{ mg/kg.pc}$	Peu toxique
$300 \leq DL_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg.pc}$	Nocif
$DL_{50} > 2000 \text{ mg/kg.pc}$	Aucun effet

### **II-2-12-2- Evaluation de la toxicité subaiguë**

L'étude de la toxicité subaiguë a consisté à évaluer les effets à long terme de l'utilisation de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et deux autres extraits obtenus par optimisation notamment les extraits E<sub>14</sub> et E<sub>16</sub>, chez le rat Wistar. Pour ce faire l'extrait sec de *Ahoutou* et les deux autres extraits à la dose thérapeutique de *Ahoutou* pris comme faible dose et trois fois la dose thérapeutique pris comme forte dose ont été administrés par gavage de façon répétitive à des rats (femelles) pendant un mois conformément aux lignes directrices 407 de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 2008) pour les essais de produits chimiques et aux lignes directrices 19 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2000). Les substances à tester sont administrées quotidiennement par voie orale aux différentes doses aux rats à raison des doses par groupe, pendant une période de 28 jours.

#### **II-2-12-2-1- Détermination de la dose thérapeutique de la recette « Ahoutou »**

La posologie du Tradithérapeute est de 2 verres par jour pour un adulte. Le verre utilisé a un volume de 180 mL, ce qui correspond à un volume total de 360 mL de la solution consommée par jour. Ce volume total de Ahoutou au rotavapor et à l'étuve donne 3,56 g d'extrait sec, ce qui correspond à la dose journalière d'un homme de 60kg. La dose thérapeutique quotidienne est donc de 60 mg/kg de poids corporel.

Pour l'étude, nous avons retenu comme dose faible, la dose thérapeutique qui est de 60 mg/kg, et deux à trois fois cette dose notamment 120 mg/kg et 180 mg/kg.

#### **II-2-12-2-1-1- Mode opératoire**

Les différentes étapes du protocole sont les suivantes :

### II-2-12-2-1-2- Répartition des rats en lots :

Les rats ont été répartis selon leur poids sur 4 Lots de 12 rats chacun. Chaque lot est reparti en 3 groupes et reçoit les différentes doses à raison d'un niveau de dose par groupe.

- **Lot I** (lot témoin) : les rats ont reçu uniquement de l'eau distillée
- **Lot II** (lot traité) : ce groupe de rats ont reçu l'extrait E<sub>13</sub> avec des doses de **60, 120** et **180 mg/kg** ;
- **Lot III** (lot traité) : les rats ont reçu l'extrait E<sub>14</sub> avec des doses de **60, 120** et **180 mg/kg** ;
- **Lot IV** (lot traité) : les rats ont reçu l'extrait E<sub>16</sub> avec des doses de **60, 120** et **180 mg/kg**.

### II-2-12-2-2- Administration des extraits

Lors de cette étude, les rats ont été laissés à jeun la veille du test. L'administration des extraits E<sub>13</sub>, E<sub>14</sub> et E<sub>16</sub> a été effectuée quotidiennement sur 7 jours par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (Figure 23), sur une période de 28 jours.



**Figure 23** : Administration des extraits par gavage

### II-2-12-2-3- Evaluation de la masse pondérale des animaux

Tous les animaux sont pesés avant l'expérimentation et une fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude. Ceci dans le but d'observer d'éventuelles variations de la masse corporelle des

animaux au cours du traitement. La masse corporelle des animaux d'expérimentation est mesurée à l'aide d'une balance (Roberval). Le gain de poids des animaux est calculé en pourcentage et exprimé selon la formule suivante :

$$\%GP = \frac{(PF - PI) * 100}{PI}$$

XIII

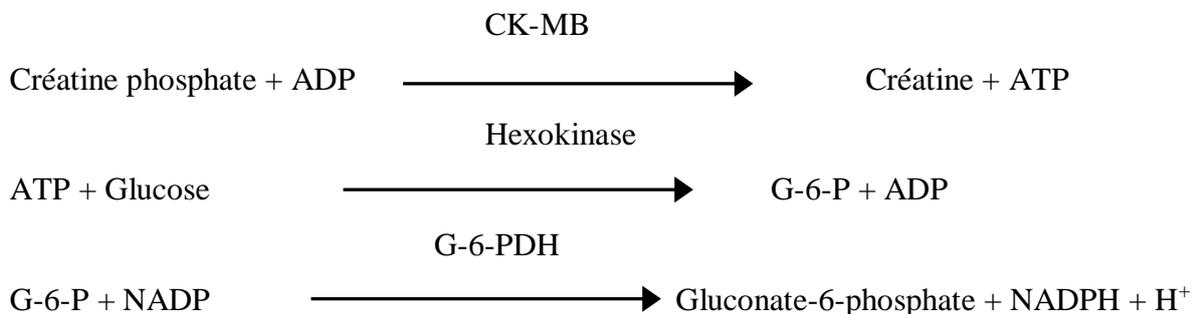
Avec, **GP** : Gain de poids, **PF** : Poids final et **PI** : Poids initial

#### II-2-12-2-4- Evaluation des paramètres biochimiques

Les biomarqueurs ont été dosés sur un analyseur automatique (Roche/INTEGRA) à l'aide de kits commerciaux (COBAS INTEGRA) selon les méthodes décrites par les fabricants.

##### II-2-12-2-4-1- Dosage de la créatine kinase MB (CK-MB)

L'activité catalytique de la CK-MB est déterminée en mesurant la vitesse d'apparition du NADPH à la longueur d'onde de 340 nm au spectrophotomètre (Valdiguie, 2000).



A 1 mL du milieu réactionnel constitué de tampon imidazole acétate (100 mmol/L; pH 6,7), de glucose (20 mmol/L), de la N-acétyl cystéine (20 mmol/L), de la créatine phosphate (30 mmol/L), de l'ADP (5 mmol/L), de l'AMP (5mmol/L), de la NADP (2 mmol/L), de la diadénosine pentaphosphate (10 µmol/L), de l'hexokinase (2500 UI/L) et de la glucose-6 phosphate déshydrogénase (1500 UI/L), est ajouté 40 µL de sérum à doser. Il s'agit du sérum contrôle ou les échantillons. Après agitation et incubation à 25 °C pendant 2 min, les densités optiques sont mesurées toutes les minutes pendant 3 min au spectrophotomètre à 340 nm. L'activité enzymatique de la CK-MB ( $F_x = 4130$ ) exprimée en UI/L est déterminée de la manière suivante :

$$\mathbf{AE(CK - MB) = \frac{\Delta DO * 4130}{t(\text{min})}}$$

XIV

Avec, **AE** : Activité enzymatique de la CK-MB, **ΔDO** : Densité Optique, **4130** = constante pour la CK-MB donnée par le fabricant et **t** : temps en minutes

#### II-2-12-2-4-2- Mesure de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase sérique (ASAT)

En présence de déshydrogénase malique (MDH) et de NADH, l'oxalo-acétate est réduit au fur et à mesure de sa formation en malate (**Desjarlais, 2006**).



L'activité catalytique de l'ASAT est déterminée en mesurant la vitesse de disparition du NADH à la longueur d'onde de 340 nm au spectrophotomètre.

Ainsi, 0,5 mL du milieu réactionnel contenant du tampon Tris HCl (80 mM ; pH 7,8), le L-aspartate (200 M), l'α- cétooglutarate (12 mM), le NADH (0,18 mM), le MDH (≥ 500 UI/L), le LDH (≥ 500 UI/L) et l'azide de sodium 0,9 % est incubé au préalable au bain-marie à 37°C pendant 2 à 3 min. Un volume de 0,05 mL de sérum des rats des différents lots est ensuite ajouté à ce mélange réactionnel. Après agitation, les densités optiques sont mesurées toutes les minutes pendant 3 min au spectrophotomètre à 340 nm.

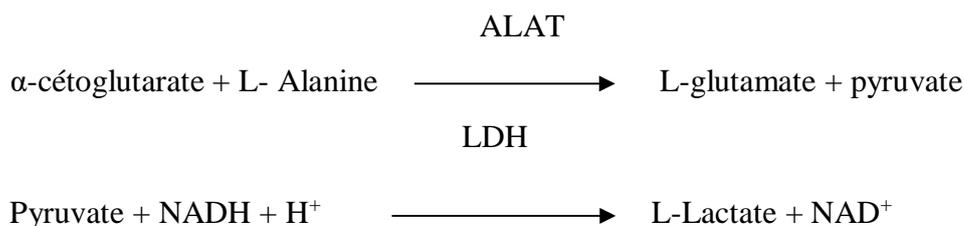
L'activité enzymatique de l'ASAT ( $F_x = 1745$ ) exprimée en UI/L est déterminée comme suite :

$$\mathbf{AE(ASAT) = \frac{\Delta DO * 1745}{t(\text{min})}}$$

XV

#### II-2-12-2-4-3- Mesure de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase sérique (ALAT)

En présence de déshydrogénase lactique (LDH) et de NADH, le pyruvate est réduit au fur et à mesure de sa formation en lactate (**Valdiguie, 2000**).



L'activité catalytique de l'ALAT est déterminée en mesurant la vitesse de disparition du NADH à la longueur d'onde de 340 nm au spectrophotomètre. Pour ce faire, 0,5 mL de milieu réactionnel contenant du tampon Tris HCl (100 mM; pH 7,8), la L-alanine (500 mM), l' $\alpha$ -cétoglutarate (15 mM), le NADH (0,1 mM), le LDH ( $\geq 1428$  UI/L) et l'azide de sodium 0,9 %, est incubé au préalable au bain-marie à 37°C pendant 2 à 3 min. Un volume de 0,05 mL de sérum des rats des différents lots est ensuite ajouté à cette préparation. Après agitation, la densité optique est mesurée toutes les minutes pendant 3 min au spectrophotomètre à 340 nm. L'activité enzymatique de l'ALAT ( $F_x = 1745$ ) exprimée en UI/L est déterminée de la manière suivante :

$$\text{AE(ALAT)} = \frac{\Delta \text{DO} * 1745}{t(\text{min})} \quad \text{XVI}$$

#### II-2-12-2-4-4- Dosage de l'urée

Le mode opératoire du dosage de l'urée se présente comme suit :

0,5ml de réactif A contenant du salicylate de sodium (62 mmol/L), du nitroprussiate de sodium( 3,4 mmol/L ), du tampon phosphate pH 6,9 ( 20 mmol/L) et de l'uréase (>500 UI / mL) et de 0,5 ml de réactif B contenant de l'hydrochlorite de sodium (7 mmol/L) et de l'hydroxyde de sodium (150mmol/l) sont mélangés pour constituer 1 mL de milieu réactionnel . A ce milieu est ajouté 0,01 mL de produit à doser (étalon ou échantillons). Après une agitation automatique et une incubation à la température ambiante (16°C à 25°C) pendant 10 mn, la densité optique permet d'obtenir l'absorbance (Abs) du produit à doser en comparaison avec le blanc réactif au spectrophotomètre à une longueur d'onde  $\lambda$  égale à 500 nm. L'expression des résultats de ce dosage est donnée par la relation ci-dessous :

$$\text{Concentration de l'urée en g / L} = \frac{\text{Abs Echantillon} * 0,50}{\text{Abs Etalon}} \quad \text{XVII}$$

#### II-2-12-2-4-5- Dosage de la créatinine

Le mode opératoire se présente comme suit :

Pendant 10 mn le milieu réactionnel composé de 0,5 mL d'acide picrique (17,5 mmol/L) et de 0,5 mL d'hydroxyde de sodium (0,29 mol/L) est incubé à 37 °C. Ensuite 0,10 mL de produit à doser (étalon ou échantillons) est ajouté, puis agité. Après 30 et 90 secondes, les absorbances respectives A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> de l'ensemble du milieu sont obtenues à partir de la densité optique au spectrophotomètre à une longueur d'onde λ égale à 500 nm.

L'expression des résultats de ce dosage est donnée par la relation ci-dessous :

$$\text{Concentration de la créatinine en mg / L} = \frac{(A_2 - A_1) \text{ Echantillon} * 20}{(A_2 - A_1) \text{ Etalon}}$$

XVIII

#### II-2-13- Analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques des données et les représentations graphiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.0 (Microsoft, San Diego California, USA). Les résultats ont été exprimés par des moyennes ± écart type. Les variations des paramètres ont été observées en effectuant des tests de comparaison des moyennes par une analyse de variances (ANOVA 1). La différence entre deux valeurs est considérée comme significative à P < 0,05. Lorsqu'une différence significative est observée, le test post hoc de comparaison multiple de Tukey-kramer est effectué pour déterminer à quel niveau se situe les différences observées.

# **PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III-1- Enquête sur l'utilisation de Ahoutou

#### III-1-1- Résultats

Les résultats de l'enquête sont consignés dans le tableau XIX.

Selon les résultats de l'enquête, sur 105 personnes interrogées, 46 d'entre elles ne connaissent pas la recette, ni les usages qu'elles pouvaient en faire soit un taux de 43,81%. Toutefois la recette Ahoutou est connue par plus de la moitié des personnes interrogées avec un taux de 56,19%. Elle est utilisée par la population de cette localité comme médicament pour des besoins en santé. Dans cette frange de la population, notre enquête a montré que la principale maladie traitée par la recette Ahoutou était le paludisme avec un taux de 91,53%. L'hypertension artérielle est également citée comme la seconde maladie traitée par la recette avec un taux de 8,47%. Parmi les personnes ayant utilisées cette recette pour soigner le paludisme, il ressort que 86,44% des personnes soignées ont été guéries. La recette se trouve sous forme de décocté, la posologie est de 1 verre deux fois par jour et la durée du traitement est de 7 jours.

Aussi, des échanges avec le tradipraticien qui a élaboré cette recette, ont permis de savoir que Ahoutou est constitué d'un mélange de feuilles de trois plantes que sont *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*.

**Tableau XIX:** Résultats de l'enquête sur la recette Ahoutou

Questions	Réponse la plus récurrente	Fréquence (%)
Connaissez-vous la recette Ahoutou ?	Oui	56,19
A quoi sert-elle ?	Médicament	100
Avez-vous déjà utilisé cette recette ?	Oui	90,51
Pour traiter quelle maladie ?	Paludisme	91,53
Quel a été le résultat du traitement ?	Guérit	86,44
Avez-vous été satisfait de cette recette ?	Oui	79,66
Sous quelle forme se trouvait la recette ?	Décocté	96,61
Quelle est la posologie de la recette ?	1 verre x2/j	88,14
Quelle est la durée du traitement ?	7 jours	55,18

### III-1-2- Discussion

La littérature rapporte que chacune de ces plantes a déjà été utilisée dans le traitement du paludisme. En effet des enquêtes ethnologiques réalisées dans la région des lagunes par **Tra Bi et al. (2008)** ont révélé que les extraits des feuilles de *Azadirachta indica* ont été utilisées pour traiter le paludisme. De plus les travaux réalisés par **Die-Kacou (2009)** ont montré les propriétés antipaludiques de *Cymbopogon citratus*. Enfin au Mali, une étude réalisée par **Maiga (2014)** a confirmé les propriétés antipaludiques des feuilles de *Psidium guajava*.

Aussi, la revue bibliographique rapporte également que certaines plantes de la recette ont été utilisées en association pour traiter le paludisme.

En effet, face au développement croissant de résistances au médicament, l’OMS recommande la bi ou trithérapies et l’abandon progressif des monothérapies. Ainsi une étude réalisée par **Melariri et al. (2012)** rapporte l’efficacité de l’utilisation en combinaison de *Citrus limon* et de *Psidium guajava* dans le traitement du paludisme.

La combinaison des trois plantes dans la recette Ahoutou, pourrait justifier son utilisation dans le traitement du paludisme.

### Conclusion partielle

Les résultats de cette enquête ont montré que la recette Ahoutou est utilisée comme médicament par la population pour traiter le paludisme dans cette localité. Cette recette formulée à partir d’une combinaison de trois plantes (*Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava*) semble avoir une bonne opinion auprès de cette population et cela se traduit par un pourcentage de plus de 79,66% des taux de satisfaction. Toutefois une analyse physico-chimique de cette recette serait judicieuse pour mettre en évidence toutes ses propriétés bénéfiques.

### III-2- Propriétés physico-chimiques, phytochimie et activité antiplasmodiale

#### III-2-1- Résultats de la Recette Ahoutou

##### III-2-1-1- Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de la recette Ahoutou sont résumées dans le tableau XX. La matière sèche, la teneur en cendres et le pH de Ahoutou sont respectivement de 9,88± 0,12% (dans un litre de décocté), de 16,02 ± 1,02% et de 5,79±0,01%.

**Tableau XX:** Propriétés physico-chimiques de la recette Ahoutou

Paramètres	Ahoutou
Matière sèche (%)	9,88± 0,12
Cendres (%)	16,02 ± 1,02
pH	5,79±0,01

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± écart type

### III-2-1-2- Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique qualitatif réalisé sur Ahoutou a permis d'identifier les grands groupes chimiques qu'elle contient (tableau XXI).

L'analyse colorimétrique montre que la recette Ahoutou contient des polyphénols, des flavonoïdes, de saponines, des tannins, des stérols et de terpènes. Par contre, elle contient très faiblement des alcaloïdes.

**Tableau XXI :** Caractérisation phytochimique de Ahoutou

Plantes (feuilles)	Composés					
	Polyphénols	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Alcaloïdes	Stérols-terpènes
Ahoutou	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence ; (-) : Absence

### III-2-1-3- Teneurs en composés phénoliques

Les composés phénoliques dont la teneur a été évaluée sont les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux. L'analyse quantitative des flavonoïdes totaux de *Ahoutou* a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'équation  $y = 0,2716x + 0,0004$  avec  $R^2 = 0,96$  établie avec des concentrations croissantes en quercétine. Ces concentrations sont exprimées en mg d'équivalent de quercétine par mL d'extrait sec. Quant à l'analyse quantitative des polyphénols totaux, elle a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'équation  $y = 1,129x + 0,05437$  avec  $R^2 = 0,9935$  établie avec des concentrations croissantes en acide gallique. Les concentrations sont exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de l'extrait sec. Les résultats du dosage en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux sont indiqués dans le tableau XXII.

Les teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de la recette Ahoutou lorsqu'elle est encore liquide (avant l'étuvage) sont respectivement  $0,65 \pm 0,03$  mg. EQ/ mL et  $3,2 \pm 0,06$  mg. EAG/ mL. Après concentration au rotavapor, les teneurs en flavonoïdes totaux

et en polyphénols totaux de l'extrait sec de Ahoutou, sont de  $1,30 \pm 0,10$  mg. EQ/ mL et  $7,70 \pm 0,82$  mg. EAG/ mL respectivement. Les résultats montrent également que les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols dans l'extrait sec de Ahoutou sont plus élevés

**Tableau XXII :** Teneur en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux de Ahoutou

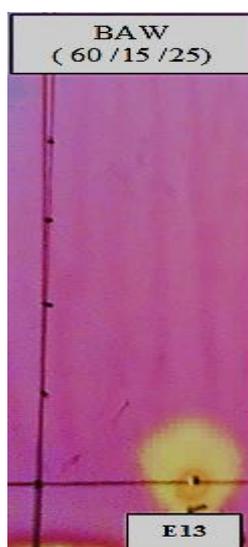
Recette	Teneur en flavonoïdes (mg. EQ / mL)	Teneur en polyphénols (mg. EAG / mL)
Ahoutou	Décocté	$0,65 \pm 0,03$
	Extrait sec	$1,30 \pm 0,10$

Les résultats des rendements sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, n=3 pour chaque extrait

### III-2-1-4- Activités antioxydantes

#### III-2-1-4-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM

L'extrait brut de Ahoutou a été révéler au DPPH après avoir migré sur une plaque de silicagel avec comme système de solvant butanol-acide acétique-eau (60 /15 /25). Le chromatographe l'extrait testé de Ahoutou a présenté une bande jaune sur un fond violet ce qui indique que Ahoutou est capable de réduire le radical DPPH (Figure 24).



**Figure 24 :** Tache jaune sur fond violet indiquant l'activité antiradicalaire de l'extrait de Ahoutou

#### III-2-1-4-2- Test quantitatif : Pouvoir antiradicalaire

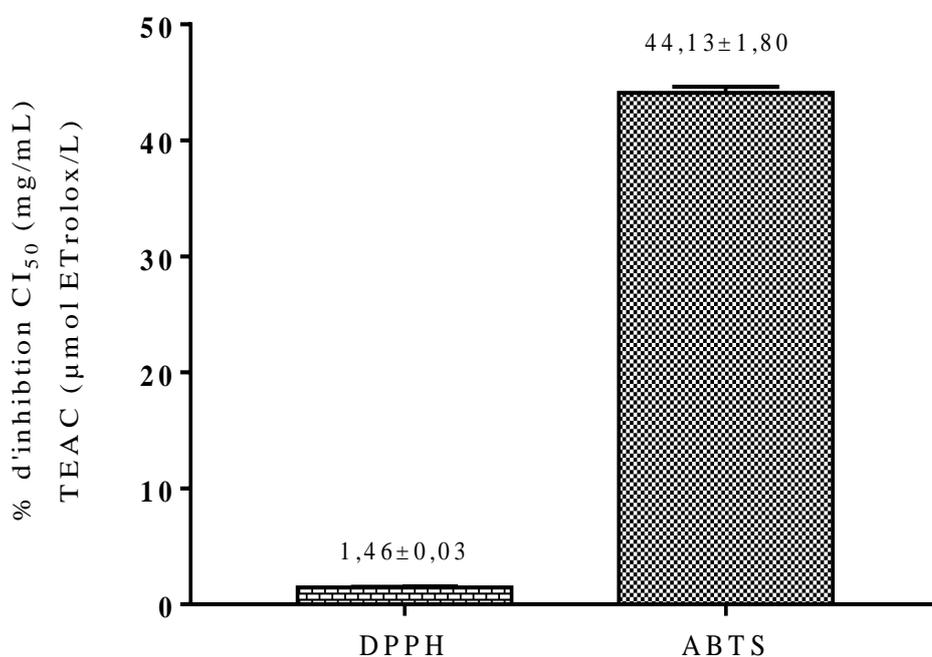
##### ❖ Réduction du DPPH

Le test de l'activité antioxydante a été effectué par la méthode de DPPH. L'activité antiradicalaire en fonction de la concentration est présentée en Annexe 2 (A2.1).

La détermination de la concentration de Ahoutou et de l'acide ascorbique nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres de DPPH (CI<sub>50</sub>) à partir des courbes a permis d'obtenir les valeurs de  $1,46 \pm 0,03$  mg/mL pour l'extrait de Ahoutou (Annexe 2 (A2.2)) et de 0,25 mg/mL pour l'acide ascorbique.

#### ❖ Piégeage du radical ABTS

La méthode de l'ABTS a été utilisée pour mesurer le potentiel antioxydant de Ahoutou. L'activité antioxydante de Ahoutou a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'équation  $Y=4,9901X$  avec  $R^2 = 0,9961$  établie avec des concentrations croissantes de Trolox (Figure 29). Ahoutou présente une activité antioxydante qui s'élève à  $44,13 \pm 1,80$   $\mu\text{mol ETrolox/L}$  présenté à la figure 25.



**Figure 25 :** Capacité antioxydante de Ahoutou selon les tests au DPPH et d'ABTS

#### III-2-1-5- Activités antiplasmodiales

L'activité antiplasmodiale des extraits de Ahoutou a été exprimée en concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>).

La figure 26 illustre un exemple de courbe d'activité des différentes drogues (extraits de plantes et molécule de référence) sur la croissance des souches de *Plasmodium falciparum*.



**Tableau XXIII** : Activité antiplasmodiale de Ahoutou sur les isolats cliniques et la souche de référence Dd2

Extraits	CI <sub>50</sub> (µg/mL)				Souche de référence Dd2
	Isolats cliniques				
	ANK137	ANK138	ANK139	ANK140	
<b>Ahoutou</b>	12,86	23,55	22,72	18,92	23,42
<b>DHA (nM)</b>	0,59	0,22	0,66	5,59	2,31

### III-2-1-6- Discussion partielle

Les données des teneurs nous révèlent que Ahoutou est riche en substances minérales totales avec un taux en cendres qui s'élève à 16,02%. Quant à la teneur de la matière sèche, elle nous permet de déterminer la dose thérapeutique de Ahoutou. Le pH de cette recette nous indique que Ahoutou est acide avec un pH de valeur 5,79. Cette valeur est comprise entre l'intervalle du pH obtenu par **Sanogo et al. (2014)** avec les sirops antipaludiques "SUMAFURA" à 10% et 20% dont les pH varient entre 5-6.

Il ressort des résultats obtenus du criblage phytochimique que l'extrait de cette recette contient des flavonoïdes, des polyphénols, des tanins, des saponines, des stérols et terpènes. Les screenings phytochimiques effectués par **Abalaka et al. (2012)** sur *Azadirachta indica* ont révélés la présence des flavonoïdes (quercétine), des saponines, des polyphénols, des tanins et des triterpènes. Il a été mis en évidence la présence des alcaloïdes, des glycosides, les hydrates de carbones, de saponines à l'état de traces, puis des terpènes, des tanins, des flavonoïdes et composés phénoliques dans *Cymbopogon citratus* (**Figueirinha et al., 2008**), puis dans *Psidium guajava*, **Biswas et al. (2013)** ont montré que l'extrait aqueux de feuilles de *Psidium guajava* pouvait contenir des phénols, des tanins, des saponines, des terpenoïdes, des flavonoïdes et des glycosides.

La présence des différents groupes chimiques dans la recette Ahoutou explique donc l'utilisation de ces plantes dans l'élaboration de Ahoutou. Par ailleurs, les résultats semblent indiquer une faible présence des phénols et flavonoïdes totaux dans la recette Ahoutou.

Il ressort des résultats obtenus des quantifications des flavonoïdes totaux, des polyphénols totaux que la recette Ahoutou est moins riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux comme le présageait le screening phytochimique. La plupart des molécules

antioxydantes sont des composés phénoliques (**Hsu et al., 2007**). Du fait de l'implication de différents facteurs tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser différents tests pour confirmer une activité antioxydante (**Miguel et al., 2010**). Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de deux tests chimiques différents que sont les tests du DPPH et du ABTS. Selon **Re et al. (1999)**, la méthode de piégeage du radical ABTS est une excellente méthode pour déterminer l'activité antioxydante pour une large diversité des substances. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* a montré que la recette Ahoutou était capable de réduire les radicaux libres de DPPH et ABTS. Ce pouvoir réducteur et antiradicalaire repose sur la teneur en composés phénoliques de la recette Ahoutou. En effet, les polyphénols sont des composés possédant un pouvoir antioxydant dû à leurs propriétés redox (**Zeng et Wang, 2001**). Ces propriétés permettent de neutraliser les radicaux libres par don d'électrons ou de protons (**Chen et Ho, 1995**), de bloquer la chaîne de réaction des radicaux libres par transfert d'atomes d'hydrogènes (**Meir et al., 1995**). Cette activité antioxydante des polyphénols est souvent exploitée dans le but de prévenir et traiter les maladies liées au stress "oxydant". Selon (**Han et al., 2007**), les composés phénoliques possèdent des propriétés veinotoniques et vasculoprotectrices qui pourraient être bénéfiques dans la prévention des atteintes vasculaires susceptibles de survenir chez le malade hypertendu.

L'activité antiplasmodiale de Ahoutou et la molécule de référence actuelle dans le traitement du paludisme à savoir la Dihydroartémisinine (DHA) a été évaluée *in vitro* sur des isolats cliniques et sur la souche de référence Dd2 de *Plasmodium falciparum* résistante à la chloroquine en utilisant le test de SYBR green I basé sur la fluorescence. La méthode de fluorimétrie donne des résultats comparables à d'autres méthodes telles que PfHRP2 (**Co et al., 2009**) ; isotopique (**Rason et al., 2008**). Cette méthode représente une approche bon marché et relativement simple d'un point de vue technique (**Bacon et al., 2009**). Le choix porté sur des isolats cliniques, est motivé par le souci de travailler sur les souches présentes dans la population cible. Mais aussi du fait que la détermination de l'activité antipaludique sur des souches de référence de *Plasmodium 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 est apparu intéressant d'évaluer l'activité des extraits en général et en particulier Ahoutou et de la molécule de référence sur des isolats de patients impaludés.

Nos résultats ont montré que Ahoutou possède une activité sur les souches chloroquinorésistantes selon l'échelle de classification des substances naturelles établies par **Bero et al. (2009)** et de **Beourou et al. (2017)**. Car selon ces auteurs, un extrait de plante est

dit à effet promoteur si la  $CI_{50}$  est comprise entre  $5\mu\text{g/mL}$  et  $15\mu\text{g/mL}$  ( $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$ ) et à effet modéré si sa  $CI_{50}$  est comprise  $15\mu\text{g/mL}$  et  $50\mu\text{g/mL}$  ( $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ). Ainsi la recette Ahoutou a manifesté un effet promoteur sur un isolat ( $12,86\mu\text{g/mL}$ ) et un effet modéré sur trois isolats cliniques ( $23,55 \mu\text{g/mL}$ ,  $22,72 \mu\text{g/mL}$  et de  $18,92 \mu\text{g/mL}$ ) puis sur la souche de référence Dd2 ( $23,42 \mu\text{g/mL}$ ). Aussi, le screening phytochimique de Ahoutou a montré la présence non négligeable des polyphénols, de flavonoïdes et des traces en alcaloïdes. En effet, la présence cumulative des composés tels que les polyphénols et les alcaloïdes dans la recette Ahoutou (mélange des trois plantes) pourrait avoir un effet synergique sur le *Plasmodium falciparum* (Nassirou *et al.*, 2015).

### III-2-2- Résultats des feuilles de *Azadirachta indica*, de *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava*

#### III-2-2-1- Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* sont résumés dans le tableau XXIV.

D'après les résultats obtenus, la teneur en humidité des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* sont de  $8,63 \pm 0,96\%$  ;  $7,3 \pm 1,27\%$  et  $8,56 \pm 0,83\%$  respectivement. La teneur en cendres des trois feuilles est comprise entre 8% et 11%, avec une valeur de  $10,32 \pm 0,79\%$  pour les feuilles d'*Azadirachta indica*,  $9,22 \pm 0,94\%$  pour les feuilles de *Cymbopogon citratus* et de  $8,20 \pm 1,79\%$  pour les feuilles de *Psidium guajava*.

**Tableau XXIV** : Propriétés physico-chimiques des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava*

Paramètres	<i>Azadirachta indica</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Psidium guajava</i>
Humidité (%)	$8,63 \pm 0,96^a$	$7,3 \pm 1,27^a$	$8,56 \pm 0,83^a$
Cendres (%)	$10,32 \pm 0,79^a$	$9,22 \pm 0,94^a$	$8,20 \pm 1,79^a$

Les résultats des rendements sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, n=3 pour chaque extrait. Les lettres identiques sur la même ligne ne sont pas statistiquement significatives ( $p > 0,005$ )

#### III-2-2-2- Criblage phytochimique

La caractérisation phytochimique des constituants chimiques, réalisée sur les extraits aqueux des feuilles des trois plantes, a donné les résultats consignés dans le tableau XXV.

Les résultats obtenus, indiquent que la plupart des extraits de plantes contiennent des polyphénols, des flavonoïdes, saponines et des tanins. Par contre, certains de ces extraits ne contiennent pas tous des alcaloïdes, des stérols et terpènes.

**Tableau XXV** : Screening phytochimique des extraits aqueux des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*

Plantes (feuilles)	Mode d'extraction	Composés					
		Polyphénols	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Alcaloïdes	Stérois- terpènes
<i>A. indica</i>	Macération	+	+	+	+	+	-
	Infusion	+	+	+	+	+	-
	Décoction	+	+	+	+	+	+
<i>C. citratus</i>	Macération	+	+	+	+	-	+
	Infusion	+	+	+	+	-	-
	Décoction	+	+	+	+	+	-
<i>P. guajava</i>	Macération	+	+	+	+	+	+
	Infusion	+	+	+	+	+	-
	Décoction	+	+	+	+	+	+

(+) : Présence ; (-) : Absence

*A. indica* : *Azadirachta indica*, *C. citratus* : *Cymbopogon citratus* et *P. guajava* : *Psidium guajava*

### III-2-2-3- Rendements d'extraction

Les poudres des feuilles de chaque plante ont fait l'objet des extractions aqueuses. Il a été obtenu un total de neuf (9) extraits aqueux obtenus par macération, infusion et décoction (mode d'extraction classique). Les résultats de l'extraction sont consignés dans le tableau XXVI. Le rendement d'extraction des extraits varie en fonction de l'espèce végétale et du contenu de chaque espèce en métaboliques secondaire utilisé dans l'extraction. Les rendements ont donné en général pour ces extraits aqueux, un rendement moyen de 13,50% ( $\pm 0,24$ ) résultant de la moyenne de décoction 14,83 ( $\pm 0,26\%$ ), d'infusion 12,67 ( $\pm 0,24\%$ ) et de macération 13,0 ( $\pm 0,23\%$ ).

**Tableau XXVI** : Rendements d'extraction des extraits aqueux obtenus à partir des feuilles de *A. indica*, *C. citratus* et *P. guajava* à différents par décoction, par macération et par infusion

Extraits	Rendement d'extraction (%)		
	Décoction	Infusion	Macération
<i>Azadirachta indica</i>	16,30 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	14,30 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	15,10 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
<i>Cymbopogon citratus</i>	8,9 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	8,40 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>
<i>Psidium guajava</i>	19,30 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	15,90 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	15,50 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>

Les valeurs moyennes suivies de leurs écart-types (moyenne  $\pm$  SD, n=3), affectées de lettres différentes sur la même ligne sont statistiquement différentes (p<0,05).

### III-2-2-4- Teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux

#### ❖ Teneurs en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine. Ces extraits sont aux nombres neuf (9) extraits aqueux obtenus par macération, par infusion et par décoction. Les résultats du dosage de la teneur en flavonoïdes des extraits sont indiqués dans le tableau XXVII.

Pour *Azadirachta indica*, les résultats montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits aqueux des feuilles obtenues par deux des trois méthodes d'extraction à savoir la décoction et la macération ne présentent pas une différence significative ( $P > 0,05$ ). Toutefois la décoction semble être la meilleure méthode pour extraire les flavonoïdes totaux avec une moyenne de  $6,73 \pm 0,02$  mg EQ/mL contre  $6,67 \pm 0,04$  mg EQ/mL pour la macération suivie de l'infusion avec une moyenne de  $6,67 \pm 0,04$  mg EQ/mL.

S'agissant de *Cymbopogon citratus*, les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux des extraits aqueux des feuilles obtenues par deux des trois méthodes d'extraction à savoir la décoction et l'infusion ne relèvent pas une différence significative ( $P > 0,05$ ). Toutefois l'infusion semble être la meilleure méthode pour extraire les flavonoïdes totaux avec une moyenne de  $7,2 \pm 0,38$  mg EQ/mL contre  $6,9 \pm 0,12$  mg EQ/mL en moyenne pour la décoction suivie de la macération avec une moyenne de  $5,8 \pm 0,12$  mg EQ/mL.

Quant à *Psidium guajava*, les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux des extraits aqueux des feuilles obtenues par les trois modes d'extraction montrent que la décoction est préférable pour extraire les flavonoïdes dont la moyenne de  $8,10 \pm 0,02$  mg EQ/mL contre  $7,80$  mg EQ/mL en moyenne pour l'infusion suivie de la macération avec une moyenne de  $7,62 \pm 0,02$  mg EQ/mL. Statistiquement la différence en teneurs de flavonoïdes totaux en fonction des différentes méthodes d'extraction est hautement significative ( $P < 0,01$ )

#### ❖ Teneurs en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux des plantes de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* est indiquée le tableau XXVII.

Pour ce qui concerne les extraits aqueux, les résultats montrent que la décoction enregistre les teneurs les plus élevées en polyphénols quelques soient les plantes avec des valeurs de  $16,74 \pm 0,08$  mg EAG/mL,  $16,82 \pm 0,18$  mg EAG/mL et  $30,76 \pm 0,82$  mg EAG/mL pour *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* respectivement. Cependant *Psidium guajava* contient beaucoup plus de polyphénols ( $p < 0,001$ ) que les deux autres plantes. L'infusion vient en deuxième position chez *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*

respectivement avec des moyennes de 13,21±0,11 mg EAG/mL et 21,53±0,18 mg EAG/mL, suivie de la macération qui enregistre respectivement des teneurs non négligeables en polyphénols totaux avec des moyennes de 9,9±0,79 mg EAG/mL et 18,90±0,12 mg EAG/mL. Chez *Cymbopogon citratus*, les deux méthodes d'extraction à savoir l'infusion et la macération ne présentent pas une différence significative (P>0,05). Toutefois la macération semble être la meilleure méthode pour extraire les polyphénols totaux avec une moyenne de 13,05± 0,13 mg.EAG/mL contre 12,95±0,05 mg.EAG/mL en moyenne pour l'infusion.

**Tableau XXVII:** Teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux des extraits aqueux des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*

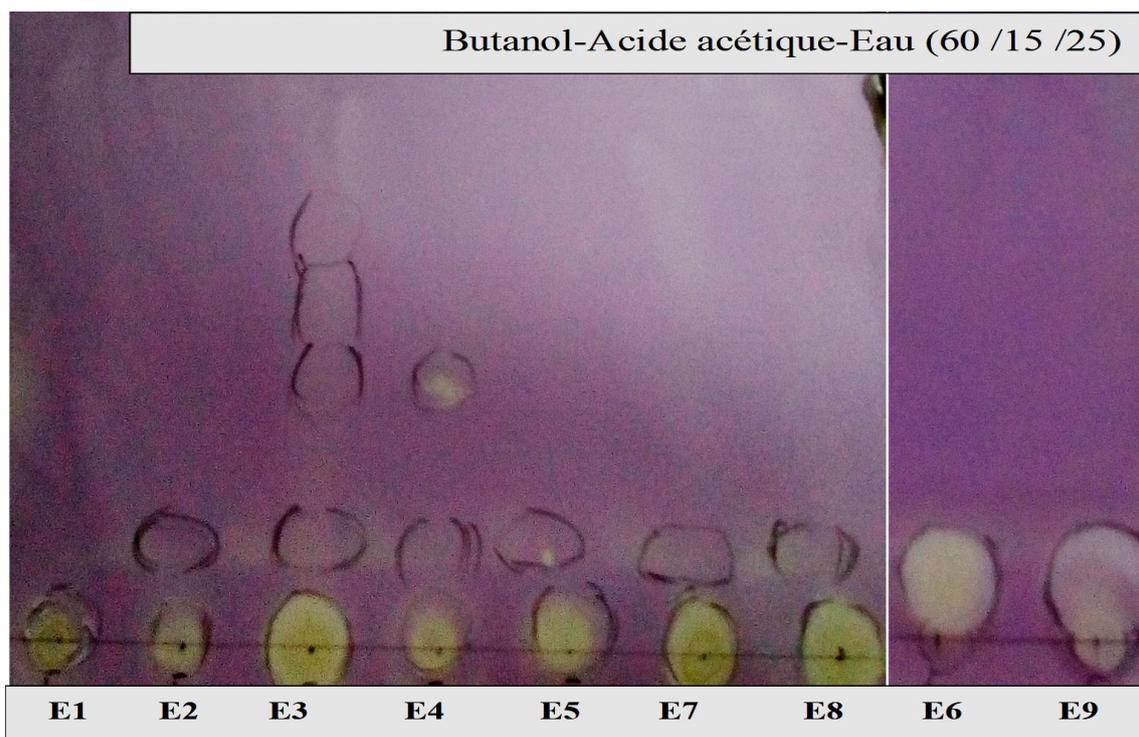
Plantes (feuilles)	Mode d'extraction	Teneur en flavonoïdes (mg EQ./mL)	Teneur en polyphénols (mg EAG / mL)
<i>Azadirachta indica</i>	Macération	6,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,90 ± 0,45 <sup>c</sup>
	Infusion	6,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	13,21± 0,06 <sup>b</sup>
	Décoction	6,73 ± 0,02 <sup>a</sup>	16,74 ± 0,04 <sup>a</sup>
<i>Cymbopogon citratus</i>	Macération	5,8± 0,12 <sup>b</sup>	13,05± 0,07 <sup>b</sup>
	Infusion	7,2± 0,38 <sup>a</sup>	12,95± 0,02 <sup>b</sup>
	Décoction	6,9 ± 0,12 <sup>a</sup>	16,82 ± 0,10 <sup>a</sup>
<i>Psidium guajava</i>	Macération	7,80 ± 0,01 <sup>c</sup>	21,53 ± 0,04 <sup>b</sup>
	Infusion	7,62 ± 0,02 <sup>b</sup>	18,30 ± 0,06 <sup>c</sup>
	Décoction	8,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	30,76 ± 0,34 <sup>a</sup>

Les valeurs moyennes suivies de leurs écart-types (moyenne ± SD, n=3), affectées de lettres différentes sur la même colonne par extraits sont statistiquement différentes (p<0,05).

### III-2-2-5- Activités antioxydantes

#### III-2-2-5-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM

Les extraits bruts étudiés suite à la migration sur une plaque de silicagel avec un mélange de solvant butanol-acide acétique-eau (60 /15 /25) ont été révélés au DPPH (Figure 27). Les résultats montrent que tous les extraits étudiés testés présentent des bandes jaunes sur un fond violet ce qui indique que ces substances sont capables de réduire le radical DPPH.



**Figure 27:** Screening de l'activité antioxydante par bioautographie des extraits bruts des plantes étudiées et de Ahoutou en utilisant le DPPH comme révélateur

**E<sub>1</sub>** : Macération *Azadirachta indica*, **E<sub>2</sub>** : Infusion *Azadirachta indica*, **E<sub>3</sub>** : Décoction *Azadirachta indica*,  
**E<sub>4</sub>** : Macération *Cymbopogon citratus*, **E<sub>5</sub>** : Infusion *Cymbopogon citratus*, **E<sub>6</sub>** : Décoction *Cymbopogon citratus*,  
**E<sub>7</sub>** : Macération *Psidium guajava*, **E<sub>8</sub>** : Infusion *Psidium guajava*, **E<sub>9</sub>** : Décoction *Psidium guajava*

### III-2-2-5-2- Test quantitatif du DPPH et ABTS

L'activité antioxydante des extraits aqueux des plantes de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava* obtenue par décoction, infusion et macération a été évaluée par la méthode de réduction du radical libre DPPH et par la méthode de piégeage du radical ABTS. Les résultats de la valeur des  $CI_{50}$  du DPPH déterminée à partir de la figure 32 et de la valeur du test de l'ABTS sont indiqués dans le tableau XXVIII.

Les résultats de cette activité ont été exprimés par le paramètre  $CI_{50}$  et l'extrait possédant la valeur de  $CI_{50}$  la plus basse, exerce l'activité antiradicalaire la plus élevée. Ainsi, selon les résultats obtenus, tous les extraits sont doués d'une activité antioxydante. Les activités varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. Les différences entre les extraits et molécule de référence (Acide ascorbique) sont statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) à l'exception de l'extrait de décoction de *Psidium guajava*.

*Psidium guajava* apparaît comme la plante la plus active sur le radical DPPH avec une  $CI_{50}$  de  $0,29 \pm 0,01$  mg/mL des extraits de décoction. Quant à la molécule de référence

(Vitamine C) elle affiche une  $CI_{50}$  de  $0,25 \pm 0,00$  mg/mL. Selon les résultats du test d'ABTS, les extraits de décoction aqueux ont manifesté une activité antioxydante élevées quelques soit la plante.

**Tableau XXVIII:** Valeurs des  $CI_{50}$  du test de DPPH et de l'ABTS des extraits aqueux

Plantes (feuilles)	Mode d'extraction	DPPH $CI_{50}$ (mg/mL)	ABTS ( $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{TE}$ )
<i>Azadirachta indica</i>	Macération	$0,63 \pm 0,01^c$	$35,8 \pm 3,2^c$
	Infusion	$1,09 \pm 0,02^b$	$66,3 \pm 4,30^b$
	Décoction	$0,48 \pm 0,01^a$	$106,6 \pm 1,5^a$
<i>Cymbopogon citratus</i>	Macération	$0,49 \pm 0,01^a$	$45,6 \pm 1,7^c$
	Infusion	$1,36 \pm 0,01^b$	$55,6 \pm 0,30^b$
	Décoction	$0,44 \pm 0,02^a$	$102,6 \pm 8,8^a$
<i>Psidium guajava</i>	Macération	$0,35 \pm 0,01^{bb}$	$62,0 \pm 7,8^c$
	Infusion	$0,34 \pm 0,00^{ab}$	$80,4 \pm 8,9^b$
	Décoction	$0,29 \pm 0,01^a$	$113,2 \pm 3,8^a$

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, n=3 pour chaque extrait. Les lettres identiques sur la même colonne de chaque plante ne sont pas statistiquement significatives ( $p > 0,005$ )

### III-2-2-6- Activités antiplasmodiales

Les extraits ayant montrés une bonne activité antioxydante, une meilleure teneur en flavonoïdes et en polyphénols ont été retenus pour les tests d'activité antiplasmodiale.

Ainsi les extraits de décoction ont été testés sur 4 isolats cliniques que sont les isolats cliniques ANK137, ANK138, ANK139 et ANK140 et sur la souche de référence Dd2 de *Plasmodium falciparum*. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XXIX.

**Tableau XXIX:**  $CI_{50}$  des extraits sur 4 isolats cliniques et la souche de référence Dd2

Extraits	Préparation	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )				Souche de référence
		ANK137	ANK138	ANK139	ANK140	
<i>Azadirachta indica</i>	Décoction	9,81	20,88	22,99	29,46	Dd2 14,81
<i>Cymbopogon citratus</i>	Décoction	12,4	10,90	-	27,13	26,87
<i>Psidium guajava</i>	Décoction	7,1	15,47	10,81	15,36	15,36
DHA (nM)		0,59	0,22	0,66	5,59	2,31

- : non déterminé

### III-2-2-7- Discussion partielle

Les données des teneurs nous révèlent que les feuilles des trois plantes étudiées sont riches en substances minérales et les poudres des drogues obtenues se prêteraient à une bonne conservation car les taux d'humidités des trois feuilles des plantes sont tous inférieures à 10%. En effet, les teneurs en eau des plantes donnent une indication de leur durée de conservation. Ainsi une faible teneur en eau étant une condition pour une longue durée de conservation. Les résultats obtenus sont différents avec ceux de **Mitra et Misra (1967)** pour les feuilles de *Azadirachta indica*. Ces auteurs ont trouvé une teneur humidité de 59,4% et un taux de cendre de 3,4%. Pour les feuilles de *Psidium guajava*, le résultat de la teneur en humidité est similaire à ceux de **Tensaout et Gaoua (2018)**. En effet ces auteurs ont trouvé un taux d'humidité de 8,08% après séchage à 105°C.

Le screening en tube nous révèle les différents groupes chimiques présents dans les drogues. Ainsi nous notons d'une façon générale, la présence de polyphénols, de flavonoïdes, de saponines et de tanins dans les extraits des trois plantes. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Abalaka et al. (2012)**, par **Figueirinha et al. (2008)** et par **Biswas et al. (2013)** dans les extraits aqueux des feuilles de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava* respectivement. Ces résultats prouvent que ces plantes renferment des principes actifs responsables de diverses propriétés pharmacologiques dont elles ont fait l'objet.

Le rendement des extractions par décoction, par macération et par infusion a montré que les meilleurs rendements ont été obtenus avec les extraits de décoction quel que soit les plantes étudiées. La détermination des rendements permet d'apprécier quantitativement des extraits qu'on peut tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude similaire, ce qui rendrait l'utilisation des plantes médicinales plus rationnelle (**Yéo, 2015**). Le choix des feuilles se justifie par le fait que les feuilles sont le siège par excellence de la biosynthèse et même du stockage des métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante (**Bitsindou, 1997**). Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont meilleurs à ceux obtenus par **Tarkang et al. (2014)**. En effet, ces auteurs ont trouvé des rendements de 5,84% et 5,80% respectivement lors de l'extraction aqueuse des feuilles de *Psidium guajava* et de *Cymbopogon citratus*. Cette différence pourrait être due aux périodes de récolte des feuilles et de l'origine de provenance de ces feuilles.

Le screening de l'activité antioxydante par CCM que nous avons effectué en utilisant le DPPH comme révélateur, montre que tous les extraits y compris la recette Ahoutou sont

capables de réduire le radical DPPH. Ces résultats corroborent avec ceux de **Tuo et al. (2015)**. En effet, pour faire le screening de l'activité antioxydante de ses extraits, ces auteurs avaient utilisé cette méthode et avaient obtenu des bandes jaunes sur un fond violet pour faire la sélection des extraits à activité antioxydante (**Tuo, 2015**).

Le test quantitatif vient confirmer l'activité antioxydante des extraits observés. Selon les résultats, tous les extraits ont présenté des activités antioxydantes. Cependant les extraits de décoction ont présenté une activité antioxydante élevées quelques soit la plante. Cette bonne activité antioxydante repose sur la teneur en composés phénoliques contenus dans ces extraits. En effet, les polyphénols sont des composés possédant un pouvoir antioxydant dû à leurs propriétés redox (**Zeng et Wang, 2001**). De plus, ces extraits ont de fortes accumulations en polyphénols et en flavonoïdes totaux à la fois ; ce qui est en accord avec les résultats de l'activité antioxydantes par les tests de DPPH et ABTS. Ces résultats obtenus sont meilleurs par rapport au résultat de la recette Ahoutou.

Les résultats des tests ont montré que tous les extraits bruts étudiés possèdent une activité antiplasmodiale selon l'échelle de classification proposée par **Bero et al. (2009)** et rapporté par **Beourou et al. (2017)**. Car selon ces auteurs, un extrait de plante est dit à effet promoteur si la  $CI_{50}$  est comprise entre  $5\mu\text{g/mL}$  et  $15\mu\text{g/mL}$  ( $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$ ) et à effet modéré si sa  $CI_{50}$  est comprise entre  $15\mu\text{g/mL}$  et  $50\mu\text{g/mL}$  ( $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ). Ainsi les  $CI_{50}$  obtenus variaient de  $7,10 \mu\text{g/ml}$  (extrait de *Psidium guajava*) à  $29,46\mu\text{g/ml}$  (extrait de *Azadirachta indica*). Au vue ces résultats, nous pouvons dire que les trois extraits de plantes étudiés ont des propriétés antiplasmodiales prometteuses sur l'isolat ANK137, ANK138, ANK139 et ANK140, à l'exception de l'extrait de *Azadirachta indica* qui a montré un effet modéré sur trois des quatre isolats à savoir ANK138, ANK139 et ANK140 puis de l'extrait de *Cymbopogon citratus* sur l'isolats ANK140. Toutefois, ces activités étaient différentes d'un extrait à l'autre pour une même plante et d'une plante à une autre. Ce qui pourrait s'expliquer par la différence de teneur en composés actifs et le polymorphisme antigénique des isolats cliniques. Ainsi les extraits des feuilles des trois plantes ont obtenu une activité antiplasmodiale. L'utilisation de solvants de polarité différente a donc été d'une grande utilité. Aussi, les choix des extraits à tester sur la base de leur composition en flavonoïdes et en polyphénols puis de l'activité antioxydante s'avère d'une importance capitale puisque la quasi-totalité des extraits retenus ont été actifs sur *Plasmodium falciparum*. Pour ce qui est de la validation de l'activité antiplasmodiale de ces extraits, les résultats des trois extraits de décoction de *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* ont donné respectivement sur la souche de référence de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistante Dd2 des valeurs de  $CI_{50}$  de 14,81

$\mu\text{g/mL}$ , 26,87  $\mu\text{g/mL}$  et 15,36  $\mu\text{g/mL}$ . Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par **Tarkang et al (2014)**. En effet, ces auteurs ont obtenu sur la souche de *Plasmodium falciparum* Dd2 les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de 141  $\mu\text{g/mL}$  et de 23,79  $\mu\text{g/mL}$  pour les extraits aqueux de des feuilles de *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava* respectivement récoltés entre les mois de Juillet et Août à Yaoundé au Cameroun. Cette différence pourrait être due à la situation géographique et à la saison de récolte.

### III-2-3- Discussion générale

Il ressort des résultats de l'enquête que la recette Ahoutou semble avoir une bonne presse auprès de la population avec un taux de 79,66% de satisfaction. Toutefois certaines personnes (avec un taux non négligeable de 20,34%) estiment qu'elles ne sont pas totalement satisfaites de la recette car selon ces dernières, il faudra d'abord l'utiliser sur une longue période avant de guérir.

Les analyses physico-chimiques et phytochimiques ont également montré que la recette Ahoutou possède tous les composés chimiques qui sont susceptibles de traiter le paludisme. Cependant, la recette possède un effet modéré sur le *Plasmodium falciparum*. Aussi, les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols qu'elle contient sont faibles. Les données ont également montré que Ahoutou possède un pouvoir antioxydant moins important. Ce pouvoir antiradicalaire observé pourrait être dû aux faibles teneurs en flavonoïdes et en polyphénols totaux. En effet, **N'guessan et al. (2007)** ont montré l'existence d'une corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité antiradicalaire. De plus, plusieurs travaux ont montré que les flavonoïdes et les polyphénols sont des composés possédant une activité antioxydante prononcée (**Yéo et al., 2014**). L'effet antiradicalaire des extraits pourrait être lié à la capacité de donneur d'hydrogène des polyphénols (**Kossah et al., 2013**). Ces substances antioxydantes naturelles rencontrées chez les extraits de végétaux, rentrent dans l'arsenal thérapeutique en ce qui concerne la lutte contre des nombreuses pathologies comme l'asthme et les cancers. L'activité antioxydante *in vitro* des extraits serait un apport important pour la réussite du traitement antiplasmodial. Car les neutrophiles activés par les parasites déclenchent une destruction des cellules endothéliales qui peut être prévenue par les antioxydants et les inhibiteurs d'enzymes protéolytiques *in vitro* (**Hemmer et al., 2005**).

Pourtant ceux qui utilisent la recette Ahoutou, la trouvent efficace contre le paludisme par contre d'autres disent le contraire. Ce qui laisse place à une réflexion. Cette réflexion nous amène à nous interroger sur le mode opératoire de fabrication des produits, notamment le temps

de préparation, le procédé d'extraction et les différentes proportions des feuilles lors du mélange (ratio). Ce qui suscite les hypothèses suivantes :

Peut-être que le temps de préparation est assez long, ce qui pourrait entraîner la destruction de certains composés ou bien le procédé d'extraction poserait un problème ou encore les différentes pesées des feuilles des plantes qui compose la recette Ahoutou ne seraient constantes lors des différentes préparations.

Tous ces facteurs pourraient impacter la qualité des produits. En effet, **Koffi et al. (2014)** ont montré dans leurs travaux que plusieurs facteurs comme le procédé d'extraction, le temps d'extraction, la nature du solvant et le ratio peuvent impacter le rendement d'extraction de certains composés tels que les flavonoïdes et les polyphénols.

Face à ces problèmes récurrents auxquels les tradipraticiens sont confrontés dans les préparations des recettes qu'ils proposent à la population, nous avons entrepris cette étude pour apporter notre contribution afin de les aider.

Pour la résolution d'un tel problème, il serait nécessaire d'utiliser les outils scientifiques couramment utilisés en expérimentations que sont les plans d'expériences pour optimiser les conditions optimales d'extraction de ces composés.

## **Conclusion**

Dans cette partie du travail, l'objectif était d'apporter des preuves scientifiques de l'activité thérapeutique d'une préparation à base de plantes utilisées dans le cadre du traitement du paludisme. Cette préparation appelée Ahoutou par son concepteur est utilisée chez l'homme mais n'ayant pas au préalable fait l'objet d'études précliniques sur des patients atteints du paludisme pour évaluer ses propriétés thérapeutiques. Il ressort de cette étude que Ahoutou contient des métabolites secondaires notamment les composés phénoliques selon l'analyse qualitative. Ahoutou possède en outre une activité antiradicalaire et antioxydante non négligeable par la présence de ces composés. Aussi possède également une activité antiplasmodiale à effet modéré sur *Plasmodium falciparum*.

Quant aux feuilles qui composent la recette Ahoutou, elles possèdent également une activité antiplasmodiale. Les extraits aqueux (décoction) ont un effet avéré sur le *Plasmodium falciparum*. Cet effet serait dû à la forte concentration en métabolites secondaire (polyphénols et flavonoïdes) dans les extraits de ces feuilles. Cependant la combinaison de ces trois extraits que constitue Ahoutou a manifesté un effet modéré moins par rapport aux effets obtenus par les plantes pris individuellement. Toutefois, cette activité pourrait être améliorée par les outils modernes ou techniques (procédés) d'extraction pour le rendre plus efficace contre le paludisme.

### III-3- Optimisation des extractions par décoction, par infusion et par macération des polyphénols (flavonoïdes) des feuilles de la recette Ahoutou

#### III-3-1- Résultats

##### III-3-1-1- Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme étalon (Figure 23). Elle est exprimée en mg d'équivalent de quercétine par mL d'extrait. Les résultats du dosage des teneurs en flavonoïdes en fonction des différents mélanges (54 essais du plan d'expérience) sont indiqués dans le tableau suivant. Ces résultats montrent une variabilité de la teneur en flavonoïdes comprise en 0,393 et 2,403 mg EQ/mL). La valeur moyenne en flavonoïdes enregistrée est de  $1,182 \pm 0,597$  mg EQ/mL.

**Tableau XXX :** Matrice des trois variables utilisées pour l'extraction des flavonoïdes des différentes permutations mélange de feuilles de *A. indica*, *C. citratus* et *P. guajava*

N° Essais	Niveaux des paramètres technologiques			Résultats du dosage	N° Essais	Niveaux des paramètres technologiques			Résultats du dosage
	X1	X2	X3	Y		X1	X2	X3	Y
1	-1	1	-1	0,740 ± 0,062	28	-1	-0,2	0	1,877 ± 0,031
2	0	1	-1	0,370 ± 0,010	29	0	-0,2	0	1,850 ± 0,106
3	1	1	-1	0,677 ± 0,047	30	1	-0,2	0	1,863 ± 0,021
4	-1	0,6	-1	0,720 ± 0,044	31	-1	-0,6	0	1,880 ± 0,021
5	0	0,6	-1	0,393 ± 0,015	32	0	-0,6	0	1,943 ± 0,010
6	1	0,6	-1	0,813 ± 0,015	33	1	-0,6	0	2,010 ± 0,040
7	-1	0,2	-1	0,983 ± 0,015	34	-1	-1	0	0,717 ± 0,026
8	0	0,2	-1	0,513 ± 0,032	35	0	-1	0	0,553 ± 0,021
9	1	0,2	-1	0,877 ± 0,031	36	1	-1	0	0,973 ± 0,010
10	-1	-0,2	-1	1,137 ± 0,015	37	-1	1	1	0,760 ± 0,023
11	0	-0,2	-1	0,837 ± 0,038	38	0	1	1	0,893 ± 0,015
12	1	-0,2	-1	1,943 ± 0,026	39	1	1	1	1,053 ± 0,015
13	-1	-0,6	-1	1,897 ± 0,021	40	-1	0,6	1	1,017 ± 0,010
14	0	-0,6	-1	1,493 ± 0,006	41	0	0,6	1	1,173 ± 0,035
15	1	-0,6	-1	1,800 ± 0,015	42	1	0,6	1	1,010 ± 0,015
16	-1	-1	-1	0,590 ± 0,040	43	-1	0,2	1	1,250 ± 0,021
17	0	-1	-1	0,620 ± 0,031	44	0	0,2	1	1,377 ± 0,032
18	1	-1	-1	0,653 ± 0,036	45	1	0,2	1	1,170 ± 0,017
19	-1	1	0	0,657 ± 0,010	46	-1	-0,2	1	1,947 ± 0,217
20	0	1	0	0,677 ± 0,001	47	0	-0,2	1	2,050 ± 0,015
21	1	1	0	0,740 ± 0,006	48	1	-0,2	1	2,140 ± 0,036
22	-1	0,6	0	0,750 ± 0,050	49	-1	-0,6	1	1,740 ± 0,062
23	0	0,6	0	0,710 ± 0,021	50	0	-0,6	1	1,370 ± 0,010
24	1	0,6	0	0,843 ± 0,010	51	1	-0,6	1	1,833 ± 0,026
25	-1	0,2	0	1,003 ± 0,017	52	-1	-1	1	2,080 ± 0,015
26	0	0,2	0	2,403 ± 0,026	53	0	-1	1	2,029 ± 0,020
27	1	0,2	0	1,023 ± 0,015	54	1	-1	1	2,333 ± 0,026

### III-3-1-2- Analyse de précision et de variance du modèle de régression

Le modèle de régression de flavonoïdes a donné un coefficient de détermination ( $R^2=0,638$ ), indiquant que la régression explique 63,80% de la variabilité observée dans la préparation de l'extraction des flavonoïdes. Le coefficient de détermination ajusté à  $R^2a = 0,583$  a confirmé que le modèle était significatif. Aussi la régression a donné une  $p$ -valeur inférieure à 0,0001 ( $p$ -valeur $<0,0001$ ), démontrant à nouveau la haute signification du modèle de régression. Ce qui montre qu'il existe des coefficients non nuls statistiquement et dont les facteurs correspondants ont un effet significatif dans l'extraction des flavonoïdes totaux.

### III-3-1-3- Analyse des coefficients du modèle de régression et estimation de la teneur en flavonoïdes

L'analyse des coefficients (Tableau XXXI) sur la base des  $p$ -values ( $<0,05$ ) correspondantes montre que les coefficients significatifs sont  $a_0$ ,  $a_2$  et  $a_3$ . Ce qui indique que  $y = a_0 + a_2X_2 + a_3X_3$ . L'extraction des flavonoïdes est donc influencée par le procédé d'extraction ( $X_2$ ) et le ratio ( $X_3$ ). En remplaçant les différents coefficients par leur valeur respective, nous obtenons le modèle mathématique suivant :

$$y = 1,590 - 0,257 X_2 + 0,201 X_3$$

XIX

Quant au facteur temps ( $X_1$ ), il a un effet non appréciable dans le domaine de variation choisi c'est à dire entre 5 et 45 min.

**Tableau XXXI :** Les effets du modèle de la réponse

Terme	Estimation	P-value	Signifiante
<b>a<sub>0</sub></b>	<b>1,590*</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>Oui</b>
a <sub>1</sub>	0,051 <sup>ns</sup>	0,599	Non
<b>a<sub>2</sub></b>	<b>-0,257*</b>	<b>0,031</b>	<b>Oui</b>
<b>a<sub>3</sub></b>	<b>0,201*</b>	<b>0,044</b>	<b>Oui</b>
a <sub>12</sub>	-0,014 <sup>ns</sup>	0,921	Non
a <sub>13</sub>	-0,004 <sup>ns</sup>	0,970	Non
a <sub>23</sub>	0,042 <sup>ns</sup>	0,766	Non
a <sub>123</sub>	0,030 <sup>ns</sup>	0,862	Non

(ns) : non significatif ; (\*) : significatif

### III-3-1-4- Optimisation de la teneur en flavonoïde dans la préparation du Ahoutou

L'optimisation des réponses dans cette étude correspond à maximiser les taux des flavonoïdes totaux contenus dans l'extrait issu de la combinaison des feuilles des trois plantes. Le programme du solveur d'Excel a permis de déterminer les niveaux optimaux théoriques des facteurs pour une maximisation de la teneur en flavonoïdes. Ainsi, pour extraire au mieux les flavonoïdes totaux, il faudrait que l'extraction ( $X_3$ ) se fasse par décoction aqueuse du broyat pour un ratio ( $X_2$ ) de 10% *Azadirachta indica* + 20% *Cymbopogon citratus* et 70% *Psidium guajava* pour une teneur maximale de 2,068 mg EQ/mL.

### III-3-1-5- Validation par l'expérience du choix indiqué par le plan factoriel mixte

Pour la validation du modèle, 3 essais de préparation du Ahoutou ont été réalisés en maintenant les niveaux optimaux de ratio  $X_2$  à (-1) et le procédé d'extraction  $X_3$  à (1). La valeur moyenne de la teneur en flavonoïdes totaux a constitué  $y_{exp}$ . De plus l'Erreur relative de déviation (ERD) obtenue (0,9%) est largement inférieure à 10%.

Les quantités de flavonoïdes totaux (tableau XXXII) obtenues expérimentalement ( $2,048 \pm 0,014$  mg. EQ /mL) sont supérieures à celle prédites par le modèle mathématique ( $2,027$  mg. EQ /mL). Cependant il n'y a aucune différence significative (test de Student avec  $p > 0,05$ ) entre les résultats expérimentaux et théoriques. Le plan factoriel mixte (plan dont les niveaux des facteurs sont variables) est valable pour prédire la quantité de flavonoïdes dans le domaine expérimental choisi (**Rao et Padmanabhan, 2013**).

**Tableau XXXII** : Valeur expérimentale et théorique

Composés	Valeur Expérimentale	Valeur Prédite	ERM (%)  Exp - Pred  / Exp
Flavonoïdes totaux (mg EQ /mL)	$2,048 \pm 0,014^a$	$2,027 \pm 0,000^a$	0,9

Les valeurs moyennes, suivies de leurs écart-types, affectées de lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ )

### III-3-2- Discussion

Au regard des résultats obtenus, plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement d'extraction des flavonoïdes totaux. Parmi ces facteurs, le mode d'extraction. La comparaison entre les méthodes d'extractions classiques : infusion, macération et décoction a montré que la décoction était la meilleure méthode pour extraire le maximum de flavonoïdes (**Bohui et al., 2018**).

Dans la recherche d'une optimisation efficace de l'extraction des flavonoïdes à partir de diverses sources, le choix du ratio notamment, la meilleure proportion de chaque plante lors des mélanges jouerait un rôle très important dans l'extraction de flavonoïdes totaux. Ainsi le mélange de *Azadirachta indica* (10%), *Cymbopogon citratus* (20%) et de *Psidium guajava* (70%) nous permet d'extraire mieux les flavonoïdes dans le mélange lors des préparations. Ce résultat obtenu, est meilleur par rapport à celui de la recette Ahoutou concocté par le tradipraticien. La teneur en flavonoïdes totaux de la recette Ahoutou était faible. Cela pourrait être dû à la non maîtrise des proportions de chaque plante lors des mélanges au cours de la préparation. En effet selon **Koffi et al. (2014)**, le ratio peut influencer sur le rendement des flavonoïdes totaux.

Concernant le temps d'extraction, ce facteur ne présente pas un effet significatif sur l'extraction des flavonoïdes totaux. Selon la littérature, l'extraction des composés phénoliques notamment les flavonoïdes à des températures élevées (supérieur à 80°C) affecterait la stabilité des composés en raison de la dégradation chimique et enzymatique et/ou des pertes par décomposition thermique (**Kiassos et al., 2009**). A ce titre, le temps d'extraction devient important, car des périodes d'extraction plus importantes peuvent entraîner des pertes plus importantes de flavonoïdes.

## **Conclusion**

Cette étude a pour but de proposer un procédé d'extraction des flavonoïdes contenus dans les extraits issus de la combinaison de trois plantes *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*. Ce travail a été réalisé par l'utilisation d'un plan d'expérience qui nous a permis d'obtenir un modèle afin d'obtenir des taux optimaux des flavonoïdes totaux.

Nous avons obtenu avec succès un rendement d'extraction élevé de flavonoïdes totaux par rapport à celui de la recette du tradipraticien. Le plan d'expérience s'avère très utile en pratique et nous permet d'apprécier un réglage optimum des paramètres du procédé d'extraction des taux de flavonoïdes contenus dans la combinaison de trois plantes.

## **III-4- Propriétés physico-chimiques, phytochimie et activité antiplasmodiale des extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique**

Dans cette partie, les mêmes tests (photochimiques, pharmacologiques et biologiques) subis par la recette Ahoutou, seront effectués sur l'extrait (formulation de décoction) obtenu à partir de l'optimisation. Aussi, les mêmes tests seront également effectués sur un autre extrait

obtenu à partir de l'optimisation mais en changeant de solvant (formulation hydroéthanolique) pour voir l'impact que cela pourrait avoir sur les activités pharmacologiques et biologiques.

### III-4-1- Résultats

#### III-4-1-1- Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des extraits optimisés et celle de la recette *Ahoutou* sont résumés dans le tableau XXXIII. D'après l'analyse du tableau, la matière sèche de la recette *Ahoutou*, la teneur en cendres et le pH sont respectivement de  $1,07 \pm 0,33\%$ , de  $16,02 \pm 1,02\%$  et de  $5,79 \pm 0,01$ . Les données des teneurs nous révèlent que la recette *Ahoutou* est riche en substances minérales totales. Quant à la teneur de la matière sèche, elle nous permet de déterminer la dose thérapeutique de la recette. Le pH de cette recette nous indique que la recette *Ahoutou* est acide avec un pH de Valeur 5,79.

**Tableau XXXIII:** Propriétés physico-chimiques de la recette *Ahoutou*

Paramètres	<i>Ahoutou</i>	Extrait aqueux optimisé	Extrait hydroéthanolique optimisé
Cendres (%)	$16,02 \pm 1,02$	$10,50 \pm 0,79$	$9,56 \pm 0,60$
pH	$5,79 \pm 0,01$	$5,62 \pm 0,16$	$5,46 \pm 0,20$

Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  écart type

#### III-4-1-2- Criblage phytochimique

La caractérisation phytochimique des constituants chimique, réalisée sur les extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique, a donné les résultats consignés dans le tableau ci-dessous. Les résultats indiquent que les extraits des formulations contiennent des polyphénols, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des saponines, des tanins, des stérols et terpènes.

Cependant les stérols et terpènes sont en état de traces dans l'extrait de formulation hydroéthanolique.

**Tableau XXXIV :** Caractérisation phytochimique des extraits issus des formulations

Plantes (feuilles)	Composés					
	Polyphénols	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Alcaloïdes	Stérols-terpènes
<i>Ahoutou</i>	+	+	+	+	+	+
Formulation de décoction	+	+	+	+	+	+
Formulation hydroéthanolique	+	+	+	+	+	+

(+++): Forte présence ; (+): Présence ; (-): Absence

### III-4-1-3- Rendements d'extraction

Les résultats du rendement d'extraction des deux extraits étudiés sont consignés dans le tableau ci-dessous. Les résultats des extractions nous permettent de dire que : le meilleur rendement a été obtenu par l'extrait hydroéthanolique avec un rendement de  $28,32 \pm 0,21$  %. Cependant le rendement de l'extrait de décoction obtenu est non négligeable ( $17,89 \pm 0,51\%$ ) et inférieur à celui de l'extrait hydroéthanolique.

**Tableau XXXV** : Rendement d'extraction des extraits des formulations

Extraits optimisés	Rendement d'extraction (%)
Formulation de décoction	$17,89 \pm 0,51^a$
Formulation hydroéthanolique	$28,32 \pm 0,21^b$

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type avec  $n=3$ . Les lettres a et b sont statistiques différentes à  $p < 0,05$

### III-4-1-4- Teneurs en flavonoïdes totaux et en polyphénols totaux

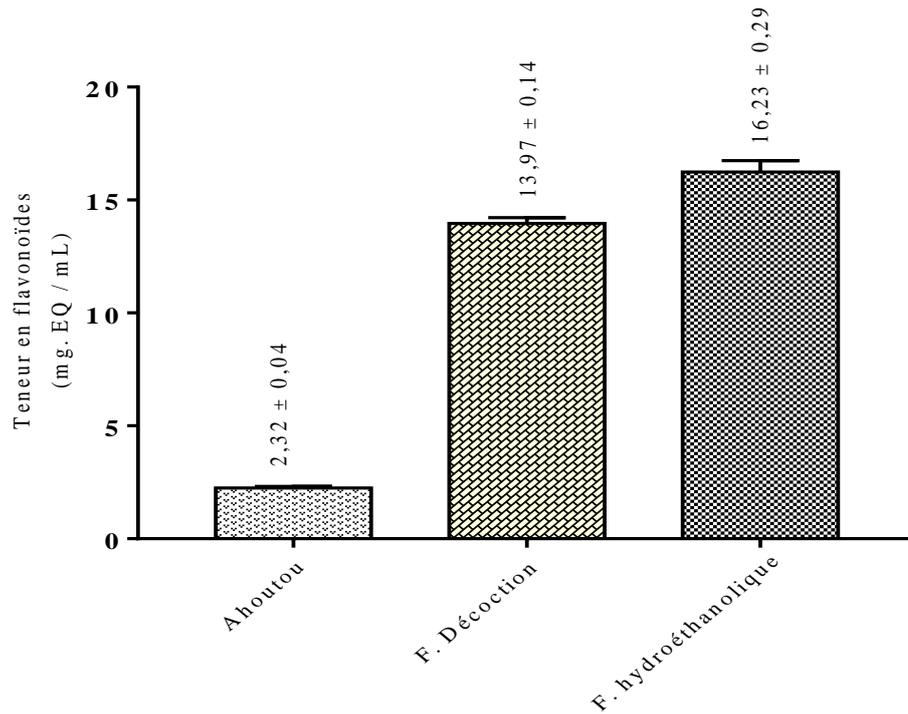
#### ❖ Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits des formulations a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine. La figure 28 présente la teneur en flavonoïdes totaux des trois plantes étudiées. D'après les résultats, une forte teneur en flavonoïdes totaux a été observée pour les deux extraits avec des valeurs de  $13,97$  mg EQ/mL et de  $16,2$ mg EQ/mL respectivement pour les extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique.

#### ❖ Teneur en polyphénols totaux

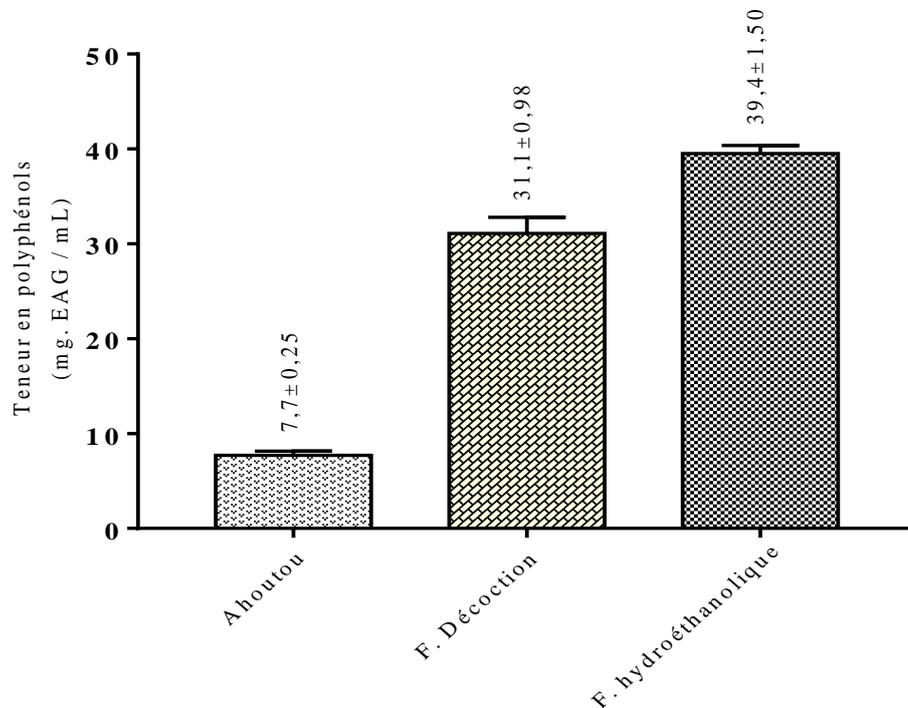
La figure 29 présente la teneur en polyphénols totaux de Ahoutou et des deux extraits des formulations.

Quant à la teneur en polyphénols, les deux extraits enregistrent également une forte teneur avec des valeurs de  $31,10$  mg EAG/mL et de  $39,4$  mg EAG/mL respectivement avec les extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique. Ces valeurs sont meilleures de celle trouvée dans la recette Ahoutou. L'optimisation des conditions d'extraction a donc permis d'augmenter la teneur de cette recette et pourrait améliorer les activités biologiques de Ahoutou.



**Figure 28 :** Teneurs en Flavonoïdes totaux des différents extraits étudiés

**F. décoction :** Formulation de décoction optimisé, **F. hydroéthanolique :** Extrait hydroéthanolique



**Figure 29 :** Teneurs en Polyphénols totaux des différents extraits étudiés

**F. décoction :** Formulation de décoction optimisé, **F. hydroéthanolique :** Extrait hydroéthanolique

### III-4-1-5- Activité antioxydante

#### III-4-1-5-1- Test qualitatif : Test de DPPH sur CCM

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

Les extraits de décoction, de macération hydroéthanolique et de la recette Ahoutou testés se sont montrés actifs avec le DPPH en donnant une tache jaune sur fond pourpre (Figure 30).



**Figure 30 :** Screening de l'activité antioxydante par bioautographie des extraits des formulations en utilisant le DPPH comme révélateur

**F. décoction :** Formulation de décoction optimisé, **F. hydroéthanolique :** Extrait hydroéthanolique

#### III-4-1-5-2- Test quantitatif : Test DPPH et test ABTS

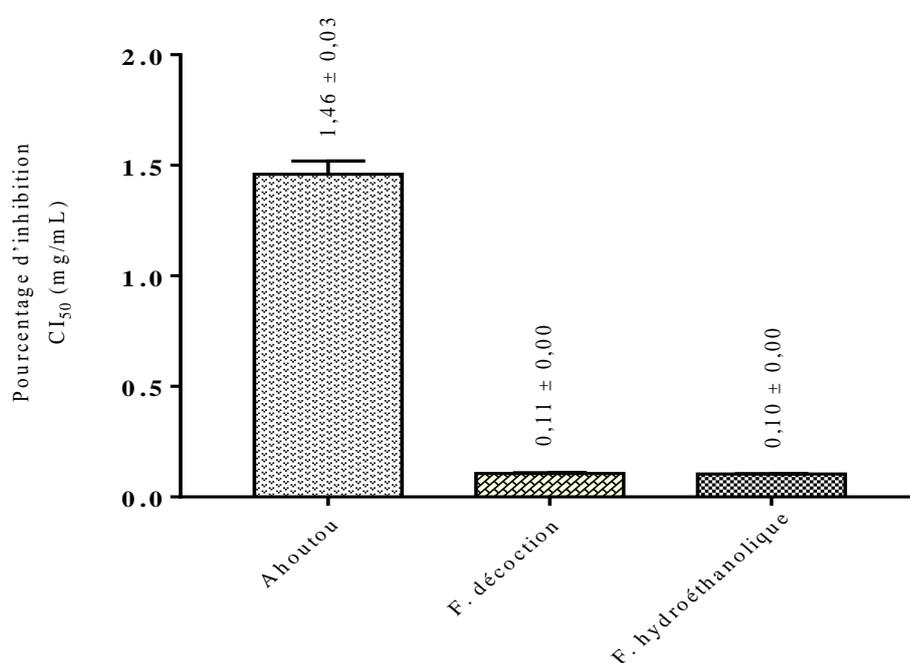
##### ❖ Test DPPH

L'activité antiradicalaire a été mesurée par la technique de piégeage du radical au DPPH (2,2'diphényl-1-picrylhydrazyle) puis déterminée à partir de la figure 31. Les résultats sont présentés sur la figure 40. Cette figure montre que les extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique ont présenté des fortes activités antioxydantes avec des  $CI_{50}$  de 0,1056  $\mu\text{g/mL}$  et 0,1023  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. La valeur de  $CI_{50}$  de l'extrait de décoction est légèrement supérieure à celle de l'extrait hydroéthanolique. Cependant il n'y a aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) entre ses deux valeurs obtenues. Par contre ses deux valeurs de  $CI_{50}$  des extraits optimisés sont inférieure à la  $CI_{50}$  (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) de l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence avec une différence significative ( $p < 0,05$ ). Ainsi, les deux extraits

optimisés se sont montrés plus actifs que l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence.

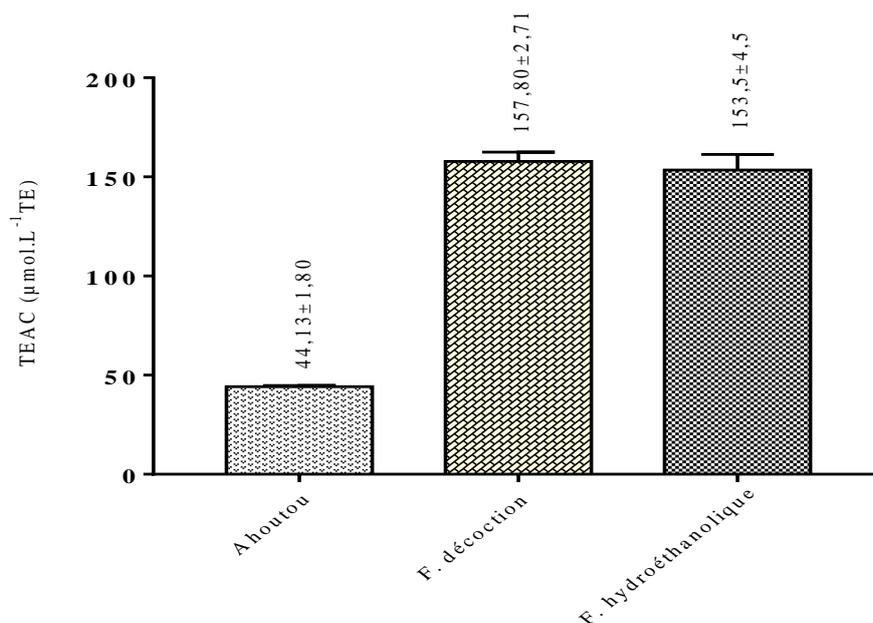
#### ❖ Test ABTS

Le dosage par ABTS a été aussi utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des extraits. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 32. Ainsi, deux extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique ont montré une activité antioxydante intéressante avec les valeurs de  $157,80 \pm 2,71 \mu\text{mol E Trolox/L}$  et de  $153,50 \pm 4,5 \mu\text{mol ETrolox/L}$  respectivement. Ainsi, les extraits des formulations ont montré une meilleure activité antioxydante comparé à celle de la recette Ahoutou ( $P < 0,05$ ).



**Figure 31:** Valeurs des CI<sub>50</sub> de Ahoutou et des extraits optimisés

**F. décoction** : Formulation de décoction optimisé, **F. hydroéthanolique** : Extrait hydroéthanolique



**Figure 32 :** Capacité antioxydante des différents extraits par la méthode ABTS

**F. décoction :** Formulation de décoction optimisé, **F. hydroéthanolique :** Extrait hydroéthanolique

### III-4-1-6- Activités antiplasmodiales des extraits optimisés

La sensibilité des isolats et la souche de référence Dd2 résistante à la chloroquine a été testée. Le tableau XXXVI présente les différentes valeurs des CI<sub>50</sub> des extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique obtenues et celle de la recette Ahoutou.

**Tableau XXXVI :** Valeurs des CI<sub>50</sub> des extraits sur les isolats et la souche de référence Dd2

Extraits optimisés	CI <sub>50</sub> (μg/mL)				
	Isolats cliniques				Souche de référence
	ANK137	ANK138	ANK139	ANK140	Dd2
<b>Ahoutou</b>	12,86	23,55	22,72	18,92	23,42
<b>Décoction</b>	9,01	14,16	3,37	11,9	10,53
<b>Hydroéthanolique</b>	4,92	9,46	2,78	14,67	7,31
<b>DHA (nM)</b>	0,59	0,22	0,66	5,59	2,31

### III-4-2- Discussion

Les extraits des formulations ont fait l'objet d'une étude phytochimique visant à déterminer les principaux groupes chimiques qui les composent, afin d'établir une relation entre la composition chimique des extraits et leur activité sur la croissance plasmodiale.

Le screening phytochimique a été réalisé en tube et a visé principalement les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les stérols & terpènes, les tanins et les saponines à cause de leur grande importance pour la santé. Ainsi, il a été mis en évidence la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des stérols & terpènes, des tanins, des alcaloïdes et des saponines dans les extraits. Ces données montrent de façon générale, que, les deux formulations (extrait de décoction et hydroéthanolique) sont riches en composés chimiques responsables de diverses propriétés pharmacologiques. Ces résultats montrent que les groupes chimiques se concentrent dans les extraits selon le type de solvant. Ces données obtenues corroborent ceux des travaux antérieurs réalisés par **Sanogo et al. (2014)** quant à la présence de composés chimiques tels que les alcaloïdes, les stérols/terpènes, les saponines, les flavonoïdes et les tanins dans le "MALARIAL" une recette de mélange de feuilles de plantes utilisée dans le traitement du paludisme au Mali. Ces résultats prouvent que ces plantes renferment des principes actifs et pourraient justifier l'utilisation faite de ces plantes dans la Pharmacopée traditionnelle africaine.

L'évaluation antioxydante *in vitro* a montré que les extraits des formulations étaient capables de réduire les radicaux libres de DPPH et d'ABTS. Ces deux extraits possédaient des fortes activités antiradicalaire et antioxydante car les valeurs de leurs  $CI_{50}$  étaient inférieures de celle de la vitamine C (substance de référence). Ce pouvoir antiradicalaire et antioxydant reposerait sur la teneur en composés phénoliques des extraits des formulations. De plus, la quantification des polyphénols et des flavonoïdes reconnus pour leur pouvoir antioxydant a montré que les deux extraits ont de fortes accumulations en polyphénols et en flavonoïdes totaux à la fois ; ce qui est en accord avec les résultats des activités antioxydantes obtenus par les tests de DPPH et d'ABTS. Ces résultats obtenus sont meilleurs comparés à ceux de la recette Ahoutou. L'optimisation de l'extraction des flavonoïdes totaux et des composés phénoliques a donc permis d'augmenter la teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux puis de renforcer le pouvoir antioxydant de la recette Ahoutou à travers les formulations de décoction et hydroéthanolique.

Les résultats des tests de chimiosensibilité ont révélé que les deux extraits des formulations (décoction et hydroéthanolique) ont montré une activité antiplasmodiale tout comme la recette Ahoutou selon l'échelle de classification proposée par **Bero et al. (2009)** et rapporté par **Beourou et al. (2017)**. Ainsi, les  $CI_{50}$  allaient de 2,78  $\mu\text{g/mL}$  (extraits le plus actif avec l'extrait hydroéthanolique) à 14,16  $\mu\text{g/mL}$  (extrait le moins actifs avec l'extrait de décoction). Les extraits de formulations de décoction et hydroéthanolique possèdent alors des propriétés antiplasmodiales très intéressantes. Toutes fois, ces activités étaient différentes d'un extrait à l'autre pour une même plante et d'une plante à une autre. Ce qui pourrait s'expliquer

par la différence en teneur des métabolites secondaires. L'utilisation de solvant de polarité différente a donc été d'une grande utilité.

De plus, l'extrait de formulation hydroéthanolique, s'est révélé nettement plus intéressant par rapport à l'extrait de décoction. En effet, il a eu deux activités antiplasmodiales intéressantes sur deux des quatre isolats cliniques utilisés avec des  $CI_{50}$  de 2,78 $\mu$ g/mL (isolat ANK139) et 4,92 $\mu$ g/mL (ANK137). Il a été montré un effet antiplasmodial prometteur sur les deux autres isolats cliniques ainsi que sur la souche Dd2 avec des  $CI_{50}$  de 9,46, 14,67 et 7,31 $\mu$ g/mL respectivement sur les isolats ANK138 et ANK140 ainsi que sur la souche Dd2. L'extrait de formulation de décoction a également présenté de très bons résultats car l'un des quatre isolats cliniques utilisés a obtenu une  $CI_{50}$  de 3,37 $\mu$ g/mL. On a observé un effet antiplasmodial prometteur sur les trois autres isolats cliniques et sur la souche Dd2 avec des  $CI_{50}$  de 9,01, 14,16, 11,9 et de 10,53 $\mu$ g/mL sur les isolats ANK137, ANK138 et ANK140 respectivement ainsi que sur la souche Dd2. Le criblage phytochimique de ces deux extraits des formulations a révélé la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des stérols, des polyterpènes, des saponines et des alcaloïdes. La présence cumulative des composés tels que les polyphénols, les polyterpènes et les alcaloïdes dans les extraits montre que les composés pourraient agir en synergie sur *Plasmodium falciparum* (Camacho *et al.*, 2000; Nassirou *et al.*, 2015). La présence de ces métabolites secondaires pourrait justifier ainsi de la bonne activité observée de ces deux extraits sur *Plasmodium falciparum*.

Aussi, l'optimisation des conditions d'extraction de la combinaison des trois plantes qui compose la recette Ahoutou a permis d'augmenter les teneurs de certains composés qui se trouvaient en faible quantité et renforcer le pouvoir antioxydant de la recette Ahoutou à travers les nouvelles formulations. Cela pourrait être à l'origine des différentes améliorations des  $CI_{50}$  observées des extraits des nouvelles formulations. Ces deux extraits se sont donc montrés plus efficaces que la recette Ahoutou.

## Conclusion

Les deux extraits étudiés ont été des extraits améliorés de la recette Ahoutou et pourraient contribuer efficacement à la lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire.

L'optimisation des conditions d'extraction de la combinaison des trois plantes qui compose la recette Ahoutou a permis d'augmenter les teneurs des composés phénoliques qui se trouvaient en faible quantité et renforcer le pouvoir antioxydant de cet extrait. Cela pourrait être à l'origine de la bonne amélioration de l'activité antiplasmodiale observée des extraits des formulations.

Cependant, d'autres analyses pour confirmer l'efficacité et l'innocuité pour l'utilisation de ce médicament traditionnel amélioré (le profil des composés phénoliques, le dosage des minéraux et les tests toxicités) seraient nécessaires.

### **III-5- Profil en polyphénols et en alcaloïdes de Ahoutou et des formulations de décoction et hydroéthanolique par HPLC**

#### **III-5-1- Résultats**

L'ensemble des résultats de l'analyse chromatographique (HPLC) est représenté par la figure 33.

Les quantités des composés identifiés dans 100g de matière sèche étaient respectivement le glycoside flavonoïque (0,187-0,0893 mg), la catéchine (0,097-0,0723 mg), l'acide caféique (0,0387-0,0038 mg), l'acide gallique (0,354-0,0038 mg), la quercétine (0,115-0,092 mg), la myricétine (0,0601-0,0147 mg), la naringénine (0,084-0,0258 mg) et la quinine (0,067-0,00085 mg). Au total, les extraits étudiés renferment 8 composés dont 7 polyphénols et un alcaloïde. La classification des extraits étudiés sur la base des teneurs de ces composés qu'ils contiennent se présente comme suit :

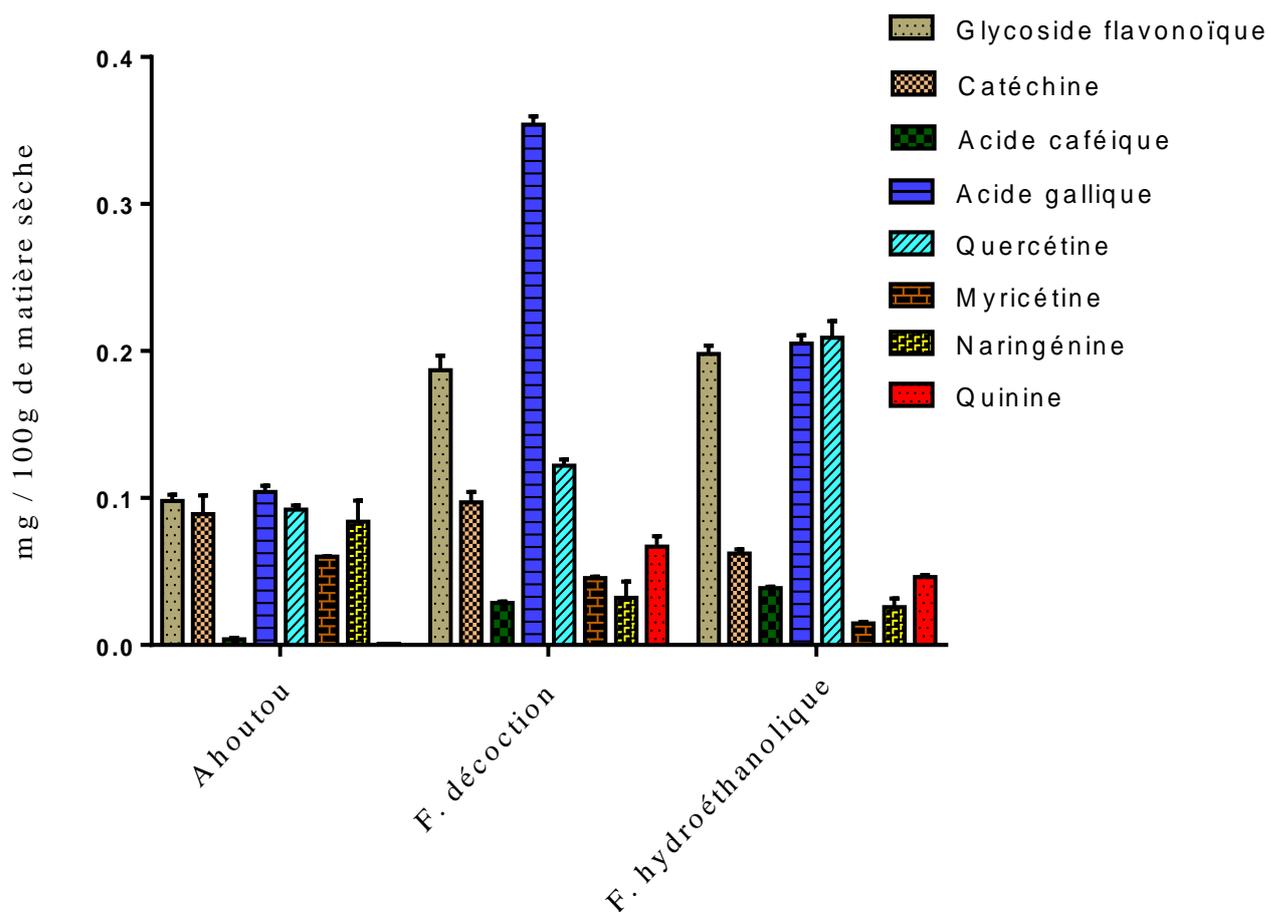
- Pour les teneurs en glycoside flavonoïque, en acide caféique et en quercétine, on a formulation hydroéthanolique > formulation de décoction > Ahoutou

- Pour les teneurs en acide gallique, en quinine, on a : formulation de décoction > formulation hydroéthanolique > Ahoutou

- Pour la teneur en catéchine, on a : formulation de décoction > Ahoutou > formulation hydroéthanolique

- Pour les teneurs en myricétine et en naringénine Ahoutou > formulation de décoction > formulation hydroéthanolique

Les résultats montrent que les extraits issus des formulations enregistrement de bons rangs lors des classements des teneurs des composés détectés par rapport à la recette Ahoutou.



**Figure 33** : Représentation graphique des résultats de HPLC

**F. décoction** : Formulation de décoction et **F. hydroéthanolique** : Formulation hydroéthanolique

### III-5-2- Discussion

L'analyse colorimétrique a révélé la présence de composés phénoliques et alcaloïdes dans la recette Ahoutou et ses nouvelles formulations. L'analyse du dosage spectrophotométrique quant à elle, a révélé une forte teneur en composés phénoliques dans les extraits des formulations par rapport à la recette Ahoutou. Les résultats de l'analyse HPLC confirment ceux de l'analyse colorimétrique à travers l'identification de quelques composés phénoliques et d'un alcaloïde dans tous les extraits étudiés.

Nos résultats, ont permis de déterminer le profil en composés phénoliques et en alcaloïdes. Ainsi, 08 composés dont 07 polyphénols et un alcaloïde dans la recette Ahoutou et les extraits des formulations de décoction et hydroéthanolique ont été trouvés. Parmi ces composés se trouve la Glycoside flavonoïque, la quercétine, la catéchine (inhibe la croissance des *P.*

*falciparum* et des schizonte) et surtout de la quinine qui est un potentiel antipaludique. La présence cumulée de ces composés pourrait agir en synergie et améliorer l'activité antiplasmodiale des extraits. Cependant, l'analyse des résultats montre également une augmentation de la teneur des polyphénols et des alcaloïdes dans les extraits des formulations par rapport à l'extrait de Ahoutou, ce qui serait à l'origine de l'augmentation de la capacité antiplasmodiale *in vitro* de ces extraits des formulations.

L'utilisation de la recette Ahoutou et ses nouvelles formulations dans le traitement des pathologies semble être donc nécessaire pour lutter contre le paludisme à cause de la présence de ses nombreuses molécules. Sur la base de nos résultats, les nouvelles formulations d'Ahoutou sont le siège de composés phénoliques qui seraient responsables de nombreuses activités biologiques. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que la quinine est une molécule antipaludique (Bruneton, 1993), la quercétine (Murakami *et al.*, 2001), le glycoside flavonoïque, l'acide gallique (Sannella *et al.*, 2007) et la catéchine possèdent des activités antiplasmodiale contre le *Plasmodium falciparum*.

Aussi, Liu *et al.* (2007) ont montré que la quercétine possède une activité antiplasmodiale sur le *Plasmodium falciparum* avec une  $CI_{50}=4,1\mu\text{g/mL}$ . En effet, la quercitrine interrompt le cycle érythrocytaire du parasite lors de la transition entre le stade trophozoïte et le stade schizonte. La présence cumulative de ces composés dans ces formulations pourrait expliquer les bonnes activités antiplasmodiales observés par les extraits lors des tests de l'activité antiplasmodiale. Ce qui pourrait fait de ces extraits de formulations des bons candidats pour les nouvelles formulations mise en œuvre pour la lutte contre le paludisme. (Liu *et al.*, 2007) .

## Conclusion

L'analyse HPLC a permis de déterminer le profil en polyphénols et en alcaloïdes des extraits d'Ahoutou et des nouvelles formulations. Cette technique a montré que les extraits des formulations renfermeraient des teneurs en polyphénols totaux intéressants et un alcaloïde comparé à la recette Ahoutou. Elle vient confirmer la bonne activité antioxydante observée au niveau des extraits de formulations. La caractérisation par HPLC tout en confirmant les résultats du screening phytochimique, nous aurait permis de détecter la présence de quelques composés phénoliques et un alcaloïde puis de les quantifier. Parmi ces composés, certains sont responsables des activités antiplasmodiale contre le *Plasmodium falciparum*.

### III-6- Quantification des minéraux

#### III-6-1- Résultats

Le résultat de la teneur en oligo-éléments de Ahoutou et des formulations (extrait de décoction et de l'extrait hydroéthanolique optimisés) est indiqué dans le tableau suivant. Les extraits contiennent des quantités non négligeables d'oligo-éléments. Le magnésium, le calcium, le potassium et le phosphore sont les minéraux les plus abondants dans les différents extraits. Les teneurs en magnésium des extraits sont comprises entre  $530 \pm 5,8$  et  $3,69 \pm 4,6$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait. Les quantités de calcium des différents extraits varient de  $3343 \pm 1,7$  à  $487 \pm 3,5$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait. Les teneurs en potassium varient de  $3908 \pm 3,5$  à  $1987 \pm 4,1$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait. Quant à la teneur en phosphore, elle oscille entre  $200 \pm 1,2$  et  $130 \pm 2,3$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait. Pour ce qui est des teneurs en sodium, zinc, manganèse et fer, elles sont de  $16,64 \pm 0,01$  et  $7,75 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait, de  $6,1 \pm 0,01$  et  $5,9 \pm 0,05$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait, de  $4,7 \pm 0,05$  et  $4,54 \pm 0,01$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait respectivement et enfin  $0,022 \pm 0,001$  et  $0,009 \pm 0,001$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait.

**Tableau XXXVII** : Composition en oligo-éléments ( $\mu\text{g/g}$ ) des extraits d'Ahoutou, décoction et hydroéthanolique optimisées

Plantes	Mg	Ca	K	P	Na	Zn	Mn	Fe
Ahoutou	$530 \pm 5,8$	$3343 \pm 1,7$	$3908 \pm 3,5$	$160 \pm 1,7$	$16,64 \pm 0,01$	$5,9 \pm 0,05$	$4,54 \pm 0,02$	$0,021 \pm 0,001$
Décoction	$479 \pm 4,6$	$1728 \pm 2,9$	$2795 \pm 2,9$	$200 \pm 1,2$	$10,13 \pm 0,03$	$6,0 \pm 0,01$	$4,63 \pm 0,01$	$0,022 \pm 0,001$
Hydroéth	$369 \pm 4,6$	$487 \pm 3,5$	$1987 \pm 4,1$	$130 \pm 2,3$	$7,75 \pm 0,01$	$6,1 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,05$	$0,009 \pm 0,001$

**Décoction** : Décoction optimisée, **Hydroéth** : Hydroéthanolique optimisé, **Mg** : Magnésium, **Ca**: Calcium, **K**: Potassium, **P**: Phosphore, **Na**: Sodium, **Zn**: Zinc, **Mn**: Manganèse, **Fe**: Fer

#### III-6-2- Discussion

Les minéraux sont des substances essentielles au bon fonctionnement de l'organisme (OMS, 2011). La plupart se trouvent en quantités illimitées dans l'eau de rivière, les lacs ainsi que dans la nature (plantes). Les minéraux contenus dans les plantes participent activement à leur activité thérapeutique. Les oligo-éléments sont des éléments minéraux nutritifs indispensables à notre organisme en quantité très faible car à des doses élevées, ces mêmes minéraux pourraient être toxiques pour l'organisme. Dans cette étude, les éléments minéraux tels que le manganèse, le fer, le magnésium, le zinc, le calcium, le sodium et le potassium ont été déterminés.

Le choix de ces minéraux est justifié par leur rôle biologique essentiel dans l'organisme. En effet, ces minéraux ont été identifiés comme nécessaires à la vie humaine par l'OMS (**Picard, 1975**). Aussi certains minéraux, notamment le manganèse, le zinc et le fer paraissent-ils jouer un rôle, dans la prévention du paludisme.

Le Manganèse est un oligo-élément essentiel qui joue un rôle essentiel dans plusieurs processus métaboliques car de nombreux enzymes dépendent du manganèse pour assurer leurs fonctions. Etant le cofacteur du superoxyde dismutase, il constitue un élément critique pour la défense antioxydante (**Culotta et al., 2006**). Il participe à la production d'énergie cellulaire (35) et est co-activateur de l'ARN-polymérase en participant à la synthèse de l'hémoglobine (**Aschner et al., 2006**). Un apport en manganèse pourrait contribuer à la production des globules rouges et renforcer leur présence lors du traitement.

Le zinc est également un oligo-élément essentiel qui favorise la croissance et la différenciation cellulaire (**Prasad, 2003**). En raison du rôle capital du zinc pour la différenciation cellulaire, une carence en ce métal entraîne une altération de la fonction immunitaire et une réduction de la résistance aux infections. Une carence en zinc exacerberait un paludisme (**Shankar et Prasad, 1998**). Par ailleurs, des données croissantes indiquent qu'une supplémentation en zinc pourrait aider à prévenir cette parasitose (**Bates et al., 1993**). Dans les régions affectées par le paludisme, cette parasitose et des carences martiales coexistent et interagissent suscitant un grand intérêt pour le fer en santé publique. Un accès palustre aigu induit une anémie, principalement par une diminution de la production d'érythrocytes par la moelle osseuse consécutive à une suppression de l'érythropoïèse et à un accroissement de l'hémolyse (**Phillips et al., 1986**).

Aussi, le paludisme contribue également à une perte en fer en induisant à son immobilisation sous forme d'hemozoïne et un accroissement de l'excrétion urinaire (**Brabin, 1992**) ainsi qu'une diminution de l'ingestion et de l'absorption de fer d'origine alimentaire (**Molyneux et al., 1989**). Le paludisme étant une maladie hémolytante due à la destruction des hématies par le parasite, il est souvent responsable d'anémie sévère. L'apport en fer par ces extraits pourrait être précieux dans la reconstitution de l'hémoglobine lors du traitement.

**Ikekpeazu et al (2010)** ont prouvé que l'infection de *Plasmodium falciparum* mène à une réduction du  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sérique. Le sodium agit avec le potassium particulièrement dans l'espace intracellulaire à régler la pression osmotique et maintenir l'équilibre approprié de l'eau dans l'organisme. La présence de certains minéraux dans nos extraits (Fer, calcium, magnésium, sodium, potassium) serait un complément de l'alimentation dans la prévention de

certaines complications dues au paludisme comme l'anémie, le stress oxydant, les troubles hydro électrolytiques et la déshydratation.

### III-7- Etude de la toxicité de « Ahoutou » et des nouvelles formulations de Ahoutou

#### III-7-1- Toxicité aiguë

##### III-7-1-1- Résultats

##### III-7-1-1-1- Signes cliniques d'intoxication

Selon les résultats du test d'innocuité, l'administration de la recette Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des extraits aqueux et organiques respectivement de la formulation de décoction (E<sub>14</sub>) et la formulation hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) à la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel (PC), n'ont révélé aucun signe clinique de toxicité (tableau XXXVIII) chez les rats durant l'expérimentation. Il n'y a aucun changement au niveau de la mobilité, du comportement et de l'appétit des rats. Ces mêmes observations ont été faites après trois heures et pendant les 14 jours, après l'administration des produits.

**Tableau XXXVIII:** Résultats de l'observation des animaux durant les premières 24 heures et tous les jours durant 14 jours après administration orale de Ahoutou et des formulations.

Signes cliniques de toxicité	Lot 1 (Témoin)	Lot 2 (E <sub>13</sub> ) 2000 mg/kg pc	Lot 3 (E <sub>14</sub> ) 2000 mg/kg pc	Lot 4 (E <sub>16</sub> ) 2000 mg/kg pc
Douleur abdominale	-	-	-	-
Excitation	-	-	-	-
Troubles de la respiration	-	-	-	-
Coma	-	-	-	-
Diarrhée	-	-	-	-
Convulsion	-	-	-	-
Saignement nasal	-	-	-	-
Perte d'appétit	-	-	-	-
Saignement buccal	-	-	-	-
Mortalité	-	-	-	-

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

##### III-7-1-1-2- Mortalité

D'après les résultats obtenus, aucun cas de mort n'a été enregistré chez les rats (femelles) pour la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel durant les deux semaines d'observations (tableau XXXIX). On en déduit que la DL<sub>50</sub> de Ahoutou et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) est comprise entre 2000 et 5000mg/kg. Les trois

extraits testés appartiennent donc à la catégorie 5 du Système Global Harmonisé (SGH). Ahoutou et les deux autres extraits optimisés ne renferment donc pas de produits mortels, toxiques et nocifs.

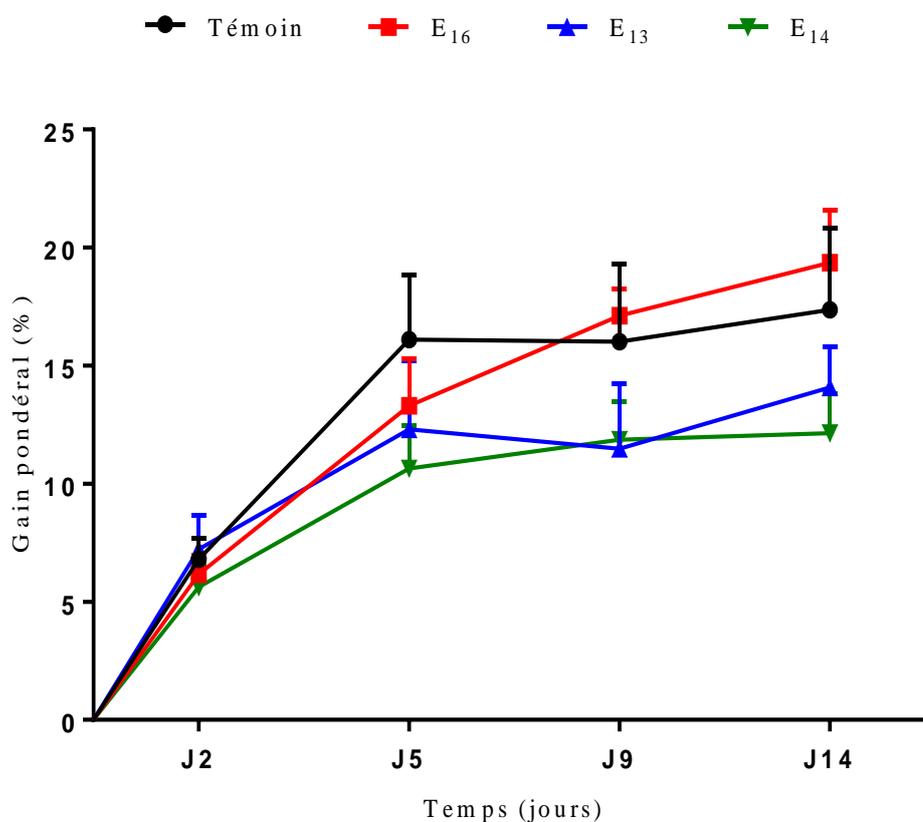
**Tableau XXXIX** : Mortalité des rats en fonction de la dose de Ahoutou et des formulations

Lots	Lot 1 (Témoin)	Lot 2 (E <sub>13</sub> )	Lot 3 (E <sub>14</sub> )	Lot 4 (E <sub>16</sub> )
Doses (mg/kg. pc)	0	2000	2000	2000
Nombre de rats par lot	3	3	3	3
Mortalité (%)	0	0	0	0

E<sub>13</sub> : Recette Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

### III-7-1-1-3- Effet de Ahoutou et des formulations sur le poids corporel des rats

Les résultats montrent que durant toute la durée de l'expérimentation, une augmentation générale non significative ( $p > 0,05$ ) du poids corporel a été notée chez les rats à la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel (Figure 34). Ce gain de poids est plus élevé chez les rats traités par la formulation hydroéthanolique (E<sub>16</sub>).



**Figure 34** : Poids moyen en gramme (g) des rats en fonction du temps de traitement

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction et E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

### III-7-1-2- Discussion

L'étude de la toxicité aigüe de la recette Ahoutou et des formulations de décoction et hydroéthanolique a révélé que la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel, n'a entraîné aucune mort chez les rats. Selon les travaux de **Delonges et al. (1983)**, tout produit dont la  $DL_{50}$  est supérieure à 2000 mg/kg de poids corporel est considéré comme non toxique. La dose thérapeutique recommandée par le tradipraticien dans le traitement du paludisme qui est de 60 mg/kg/jour, est largement en dessous de la  $DL_{50}$ . On peut donc en déduire que la recette Ahoutou et les formulations ne présenteraient aucun danger pour les patients souffrant du paludisme simple. L'absence d'éventuelle toxicité de la recette Ahoutou et des formulations peut être liée à la faible présence d'alcaloïdes connus pour leur toxicité à fortes doses.

De plus, au cours de l'étude, il n'a pas été constaté une variation significative du poids corporel chez les rats des lots traités avec les trois extraits testés à la dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel.

### III-7-2- Toxicité subaigüe

#### III-7-2-1- Résultats

##### III-7-2-1-1- Effets de Ahoutou et des formulations sur le poids corporel chez les rats wistar

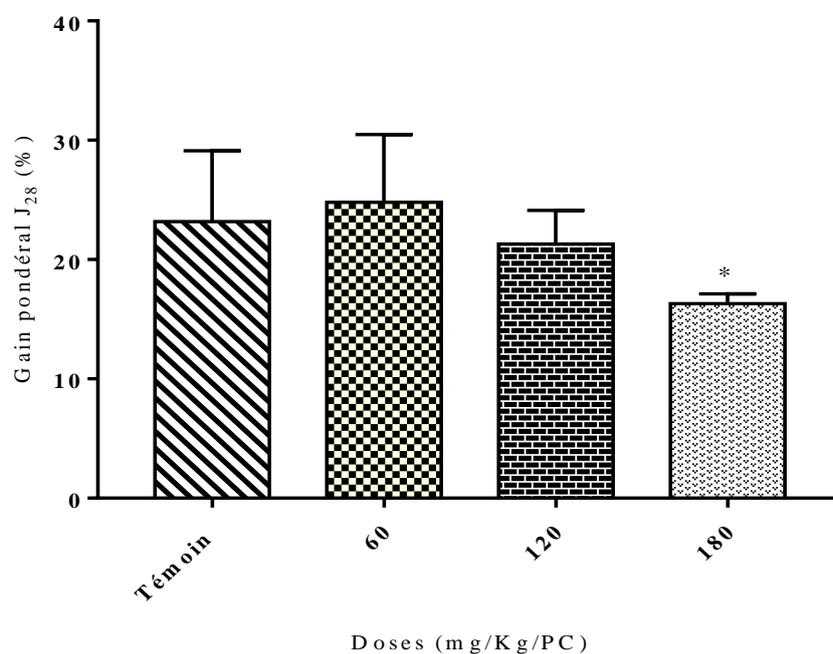
Le poids corporel des rats traités avec les extraits de Ahoutou ( $E_{13}$ ) et des formulations de décoction ( $E_{14}$ ) et hydroéthanolique ( $E_{16}$ ) a été suivi avant et pendant toute l'expérimentation.

Chez les rats traités avec l'extrait de la recette Ahoutou ( $E_{13}$ ), aux doses de 60 mg/kg et de 120 mg/kg, un gain de poids non significatif ( $p > 0,05$ ) de  $24,8 \pm 2,64\%$  et de  $21,30 \pm 1,45\%$  respectivement par rapport aux rats témoins ( $23,18 \pm 2,37\%$ ) a été noté à  $J_{28}$ . Par contre, à la dose de 180 mg/kg, une baisse de poids ( $16,31 \pm 0,40\%$ ) significatif ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin (Figure 35) a été observé.

Quant aux rats traités avec l'extrait de la formulation de décoction ( $E_{14}$ ), aux doses de 60 mg/kg et de 120 mg/kg, un gain de poids non significatif ( $p > 0,05$ ) a été enregistré respectivement par rapport au témoin ( $23,18 \pm 2,97$ ) avec des valeurs de  $25 \pm 2,53\%$  et  $26,39 \pm 3,69\%$  à  $J_{28}$ . Cependant, à 180 mg/kg, une baisse de poids ( $17,66 \pm 3,55\%$ ) significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin a été observée (Figure 36).

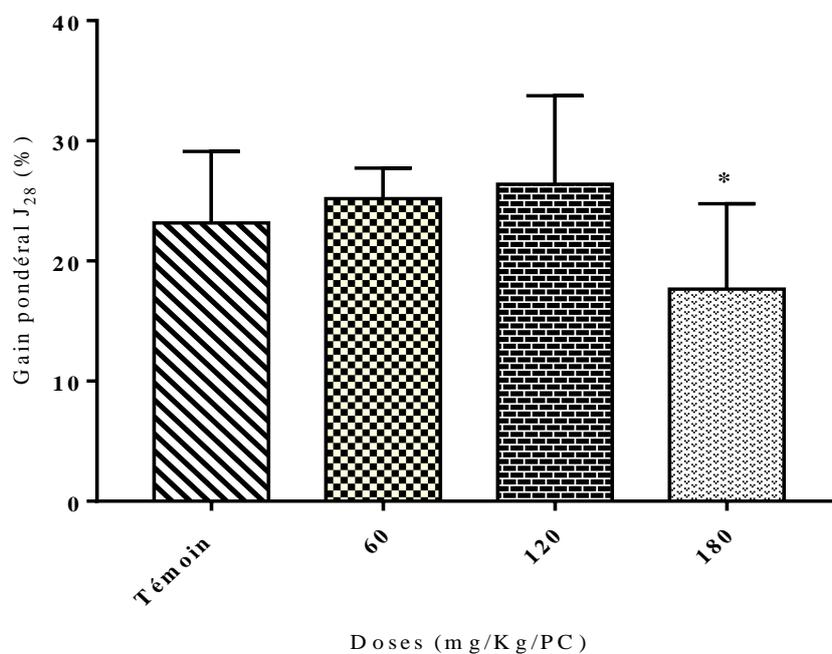
Concernant les rats traités avec l'extrait de la formulation hydroéthanolique ( $E_{16}$ ) aux doses de 120 mg/kg et de 180 mg/kg, un gain de poids non significatif ( $p > 0,05$ ) a été enregistré respectivement par rapport au témoin ( $23,18 \pm 2,97$ ) avec des valeurs de  $30,11 \pm 8,95\%$  et  $26,39$

$\pm 3,69\%$  respectivement à J<sub>28</sub>. Toutefois, à 60 mg/kg, une baisse de poids ( $14,36 \pm 2,17\%$ ) significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin a été notée (Figure 37).

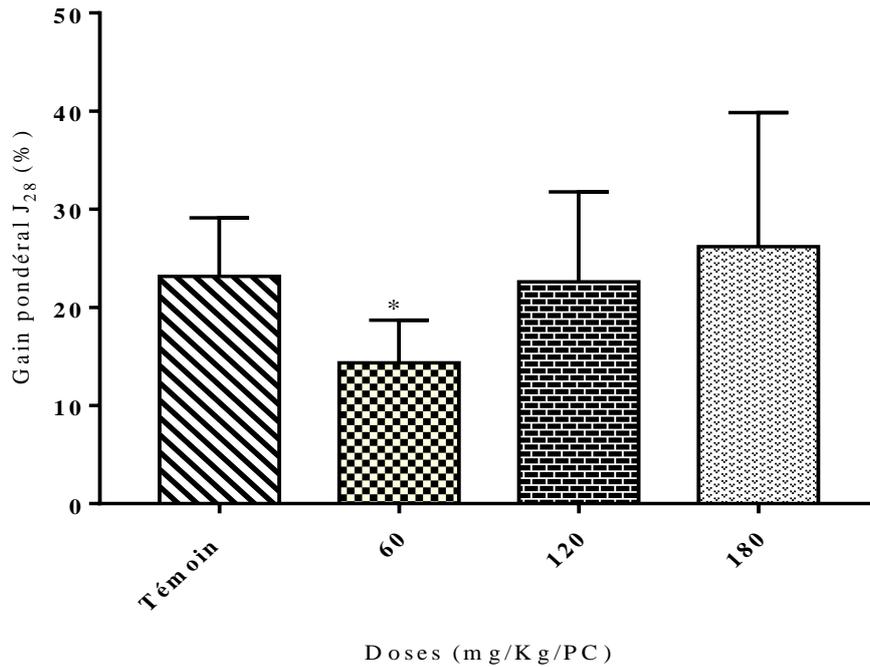


**Figure 35 :** Effet de l'extrait d'Ahoutou (E<sub>13</sub>) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement.

(\*) significatif à  $p < 0,05$  par rapport au témoin



**Figure 36 :** Effet de l'extrait de la formulation de décoction (E<sub>14</sub>) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement. (\*) significatif à  $p < 0,05$  par rapport au témoin.

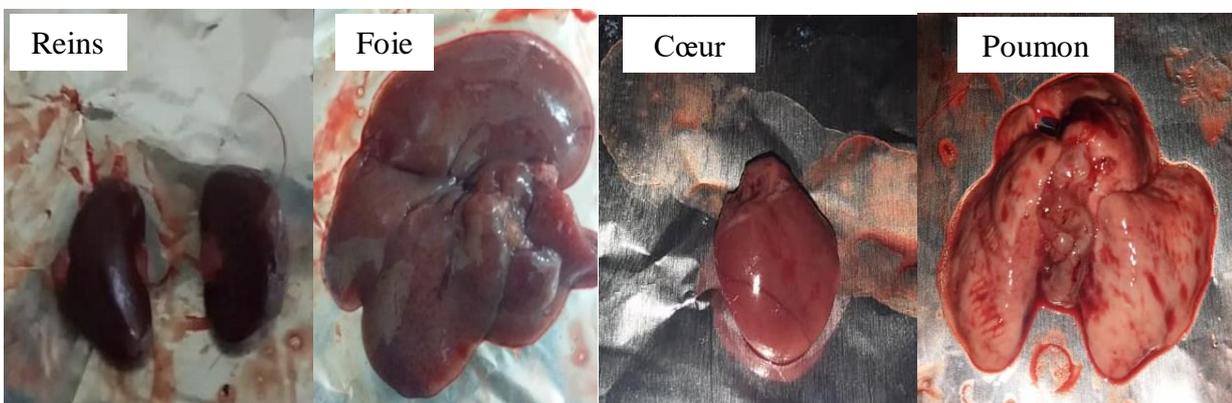


**Figure 37** : Effet de l'extrait de la formulation hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sur le gain de poids chez les rats après 28 jours de traitement.

(\*) significatif à  $p < 0,05$  par rapport au témoin.

### III-7-2-1-2- Effets de Ahoutou et des formulations sur le poids des organes prélevés chez le rats wistar

Le poids relatif des organes (Figure 38) des rats traités avec les extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) pendant 28 jours est indiqué dans le tableau XL. Le poids relatif de chaque organe (rein, foie, cœur et poumon) enregistré à l'autopsie dans les groupes traités n'a pas montré de différence significative ( $p > 0,05$ ) par rapport au témoin, quelle que soit la dose administrée.



**Figure 38**: Les organes prélevés des Rats

**Tableau XL:** Effet des extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sur le poids relatif des organes chez le rat après 28 jours de traitement

Organes	Témoin	Doses (mg/kg. pc)		
		60	120	180
	<b>Eau distillée</b>	<b>Recette Ahoutou (E<sub>13</sub>)</b>		
<b>Reins</b>	0,62 ± 0,06	0,63 ± 0,02 <sup>ns</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>ns</sup>	0,63 ± 0,05 <sup>ns</sup>
<b>Foie</b>	2,72 ± 0,16	2,81 ± 0,12 <sup>ns</sup>	2,68 ± 0,11 <sup>ns</sup>	2,91 ± 0,10 <sup>ns</sup>
<b>Cœur</b>	0,39 ± 0,40	0,42 ± 0,03 <sup>ns</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>ns</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>ns</sup>
<b>Poumons</b>	0,75 ± 0,07	0,70 ± 0,08 <sup>ns</sup>	0,91 ± 0,08 <sup>ns</sup>	1,03 ± 0,55 <sup>ns</sup>
	<b>Eau distillée</b>	<b>Formulation de décoction (E<sub>14</sub>)</b>		
<b>Reins</b>	0,62 ± 0,06	0,61 ± 0,08 <sup>ns</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>ns</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>ns</sup>
<b>Foie</b>	2,72 ± 0,16	3,15 ± 0,35 <sup>ns</sup>	2,70 ± 0,11 <sup>ns</sup>	2,88 ± 0,10 <sup>ns</sup>
<b>Cœur</b>	0,39 ± 0,40	0,46 ± 0,05 <sup>ns</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>ns</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>ns</sup>
<b>Poumons</b>	0,75 ± 0,07	0,77 ± 0,16 <sup>ns</sup>	0,84 ± 0,11 <sup>ns</sup>	0,98 ± 0,09 <sup>ns</sup>
	<b>Eau distillée</b>	<b>Formulation hydroéthanolique (E<sub>16</sub>)</b>		
<b>Reins</b>	0,62 ± 0,06	0,59 ± 0,02 <sup>ns</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>ns</sup>	0,55 ± 0,03 <sup>ns</sup>
<b>Foie</b>	2,72 ± 0,16	2,88 ± 0,07 <sup>ns</sup>	2,68 ± 0,17 <sup>ns</sup>	2,70 ± 0,13 <sup>ns</sup>
<b>Cœur</b>	0,39 ± 0,40	0,44 ± 0,01 <sup>ns</sup>	0,43 ± 0,03 <sup>ns</sup>	0,40 ± 0,02 <sup>ns</sup>
<b>Poumons</b>	0,75 ± 0,07	0,89 ± 0,06 <sup>ns</sup>	0,76 ± 0,08 <sup>ns</sup>	0,93 ± 0,00 <sup>ns</sup>

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0,05, et non significatives pour p>0,05.

### III-7-2-1-3- Effets de Ahoutou et des formulations sur les paramètres biochimiques chez le rats wistar

Les résultats des analyses des paramètres rénaux (urée et créatinine) avant les traitements à J<sub>0</sub> et après 28 jours de traitements (J<sub>28</sub>) avec les extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sont consignés respectivement dans les tableaux XLI et XLII.

Aucune différence significative (P > 0,05) n'est observée entre les valeurs moyennes de l'urée et de la créatinine au 28<sup>ème</sup> jour du traitement quelle que soit la dose d'extrait comparativement à celles du lot témoin.

**Tableau XLI** : Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à J<sub>0</sub>

Paramètres biochimiques	Extraits	Valeurs des paramètres biochimiques			
		Lot <sub>Témoin</sub>	Lot <sub>60</sub>	Lot <sub>120</sub>	Lot <sub>180</sub>
Urée (g/l)	E13	0,42 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,33 ± 0,01
	E14	0,42 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,41 ± 0,04
	E16	0,42 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,39 ± 0,03
Créatinine (mg/l)	E13	4,75 ± 0,25	5,00 ± 0,41	4,25 ± 0,25	4,50 ± 0,29
	E14	4,75 ± 0,25	4,25 ± 0,25	3,50 ± 0,29	3,75 ± 0,48
	E16	4,75 ± 0,25	4,50 ± 0,29	4,00 ± 0,58	4,00 ± 0,41

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

**Tableau XLII** : Effet des extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sur les paramètres rénaux des rats après 28 jours de traitement

Paramètres biochimiques	Extraits	Doses (mg/Kg de P.C)			
		Lot <sub>Témoin</sub>	Lot <sub>60</sub>	Lot <sub>120</sub>	Lot <sub>180</sub>
Urée (g/L)	E13	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,01
	E14	0,29 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,01
	E16	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,28 ± 0,03
Créatinine (mg/L)	E13	4,50 ± 0,50	3,50 ± 0,29	4,50 ± 0,29	5,00 ± 1,00
	E14	4,50 ± 0,50	3,75 ± 0,75	4,25 ± 0,25	5,25 ± 0,25
	E16	4,50 ± 0,50	4,25 ± 0,48	5,00 ± 0,41	5,50 ± 0,65

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

#### III-7-2-1-4- Effets de Ahoutou et des formulations sur les paramètres hépatiques chez le rats wistar

Les résultats des analyses de la transaminase glutamo-oxaloacétique (TGO) et de la transaminase glutamo-pyruvique (TGP) avant les traitements à J<sub>0</sub> et après 28 jours de traitements (J<sub>28</sub>) avec les extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sont consignés dans les tableaux XLIII et XLIV, respectivement. Les concentrations sériques de TGO ont diminué chez les animaux après 28 jours de traitements, sauf chez ceux traités à la dose 120 mg/kg/PC des extraits des formulations de décoction (E<sub>14</sub>)

et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>), en se référant aux valeurs moyennes à J<sub>0</sub>. Cette baisse n'est pas statistiquement significative (P > 0,05).

Les concentrations sériques de TGP n'ont pas varié significativement (P > 0,05) après 28 jours de traitements comparativement à celles du J<sub>0</sub>.

Aucune variation significative (P > 0,05) des marqueurs sériques hépatiques n'est observée au bout de 28 jours du traitement avec les 3 extraits.

**Tableau XLIII** : Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à J<sub>0</sub>

Paramètres biochimiques	Extraits	Valeurs des paramètres biochimiques			
		Lot <sub>Témoin</sub>	Lot <sub>60</sub>	Lot <sub>120</sub>	Lot <sub>180</sub>
TGO (UI/L)	E13	288,3 ± 15,64	233,8 ± 15,74	266,5 ± 21,69	285,5 ± 47,69
	E14	288,3 ± 15,64	229,3 ± 10,14	188,5 ± 32,90	247,5 ± 35,31
	E16	288,3 ± 15,64	255,3 ± 14,27	184,8 ± 23,72	239,5 ± 44,43
TGP (UI/L)	E13	45,75 ± 4,80	40,25 ± 3,75	55,75 ± 14,65	42,75 ± 4,85
	E14	45,75 ± 4,80	39,50 ± 4,74	36,50 ± 5,01	54,75 ± 15,45
	E16	45,75 ± 4,80	43,25 ± 5,59	38,75 ± 5,88	42,50 ± 5,04

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

**Tableau XLIV** : Effet des extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sur les paramètres hépatiques des rats après 28 jours de traitement

Paramètres biochimiques	Extraits	Doses (mg/Kg de P.C)			
		Lot <sub>Témoin</sub>	Lot <sub>60</sub>	Lot <sub>120</sub>	Lot <sub>180</sub>
TGO (UI/L)	E13	210,80 ± 9,40	205,00 ± 18,83	191,00 ± 14,75	221,30 ± 16,27
	E14	210,80 ± 9,40	195,50 ± 15,47	187,30 ± 11,18	188,50 ± 12,45
	E16	210,80 ± 9,40	206,80 ± 17,15	195,00 ± 17,80	185,00 ± 11,48
TGP (UI/L)	E13	45,25 ± 4,94	44,50 ± 2,18	45,75 ± 5,75	35,25 ± 3,75
	E14	45,25 ± 4,94	44,00 ± 5,05	43,25 ± 2,69	42,25 ± 2,29
	E16	45,25 ± 4,94	50,50 ± 7,98	46,75 ± 5,94	46,50 ± 7,62

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

### III-8-2-1-5- Effets de Ahoutou et des formulations sur l'un des paramètres du cœur chez le rats wistar

Une diminution de la concentration sérique du CK-MB est observée chez tous les animaux après 28 jours de traitement quelle que soit la dose, comparativement aux valeurs moyennes du J<sub>0</sub> (tableau XLV et XLVI). Cependant, cette baisse n'est pas statistiquement significative (P > 0,05).

Par ailleurs, aucune différence significative (P > 0,05) n'est observée entre les valeurs moyennes du CK-MB au 28<sup>ème</sup> jour du traitement quelle que soit la dose comparativement à celle du témoin.

**Tableau XLV** : Valeurs moyennes observées des paramètres sériques des rats par lot analysés avant les traitements à J<sub>0</sub>

Paramètre biochimique	Extraits	Valeurs des paramètres biochimiques			
		Lot <sub>Témoin</sub>	Lot <sub>60</sub>	Lot <sub>120</sub>	Lot <sub>180</sub>
CK-MB (UI/L)	E13	5252 ± 517,9	3844 ± 283,3	4871 ± 394,1	4614 ± 648,0
	E14	5252 ± 517,9	4137 ± 376,5	3377 ± 750,5	3912 ± 638,6
	E16	5252 ± 517,9	4130 ± 316,6	3006 ± 509,7	37,01 ± 639,1

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

**Tableau XLVI** : Effet des extraits de Ahoutou (E<sub>13</sub>) et des formulations de décoction (E<sub>14</sub>) et hydroéthanolique (E<sub>16</sub>) sur l'un des paramètres du cœur des rats après 28 jours de traitement

Paramètre biochimique	Extraits	Doses (mg/Kg de P.C)			
		Témoin	60	120	180
CK MB (UI/L)	E13	3080 ± 407	2943 ± 285	3705 ± 304	2998 ± 337
	E14	3080 ± 407	2487 ± 441	3050 ± 219	3405 ± 430
	E16	3080 ± 407	2988 ± 635	2960 ± 381	2488 ± 271

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart-type (n=4), les valeurs sont considérées significatives à (\*) p<0.05, et non significatives pour p>0,05.

E<sub>13</sub> : Ahoutou, E<sub>14</sub> : formulation de décoction, E<sub>16</sub> : formulation hydroéthanolique

### III-7-2-2- Discussion

Les résultats de l'étude de la toxicité subaiguë ont montré un gain de poids chez tous les animaux traités ainsi que chez les témoins au terme des 28 jours de traitement. Toutefois, les animaux traités aux doses 180 mg/Kg/PC de l'extrait de Ahoutou et de la formulation de

décoction et 60 mg/Kg/PC de l'extrait de la formulation hydroéthanolique ont des gains pondéraux significativement moins importants comparativement à ceux des animaux témoins. Ce faible gain de poids observé à ces doses pourrait s'expliquer par une diminution de l'appétit des animaux sous l'effet de ces doses des différents extraits, qui aurait pour conséquence une baisse de leur consommation en nourriture.

Les organes prélevés à la fin du traitement (reins, foie, cœur, poumons) n'ont connu aucune variation significative de leur poids. La toxicité hépatorénale et cardiaque a été étudiée par le dosage de quelques paramètres biochimiques.

La concentration d'urée et de créatinine constitue un important marqueur pour le diagnostic de la fonction rénale (**Gnanamani et al., 2008; Mukinda et al., 2010**). Les transaminases sont les marqueurs du foie, leurs activités augmentent en cas de toxicité hépatique (**Hilaly et al., 2004**). Leurs concentrations dans le sérum renseignent sur une lésion des hépatocytes (**Kumar et al., 2004**).

Dans notre étude, la comparaison des valeurs moyennes des paramètres rénaux et hépatiques du J<sub>0</sub> au J<sub>28</sub> n'indique pas de différence significative. Il n'y a également aucune différence significative entre les valeurs moyennes de ces paramètres biochimiques au 28<sup>ème</sup> jour du traitement quelque soit la dose comparée à celles du témoin.

En se référant aux résultats des travaux menés sur la toxicité subaiguë de chacune des plantes que composent notre recette, aucune toxicité hépatorénale n'a été observée aux doses inférieures ou égales 180 mg/Kg/PC. En effet, les résultats des travaux de **Wang et al. (2013)** n'ont pas montré de variation des paramètres hépatorénales après 30 jours de traitement à l'huile essentielle des graines de *Azadirachta indica* à la dose de 1600 mg/Kg de P.C. Cependant, une autre étude visant à évaluer les conséquences toxiques de l'extrait éthanolique d'écorce de tige de *Azadirachta indica* a montré que cet extrait, aux doses de 50, 100, 200, et 300 mg/Kg de P.C. peut ne pas être sans danger en tant que remède en prise oral et doit se refaire avec prudence si cela est absolument nécessaire (**Ashafa et al., 2012**).

Aussi, l'extrait éthanolique des feuilles de *Psidium guajava* s'est révélé non toxique aux de 250, 500 et 750 mg/Kg de P.C. (**Utami et al., 2018**). En outre, **Koh et al. (2012)** ont évalué l'effet hépatoprotecteur de *Cymbopogon citratus* sur les dommages oxydatifs médiés par le tétrachlorure de carbone chez le rat. Les animaux traités avec l'extrait (100, 200, 300 mg/Kg de P.C.) avant l'administration du tétrachlorure de carbone ont été protégés de manière dose-dépendante contre les effets hépatotoxiques de cette substance (**Koh et al., 2012**). L'effet hépatoprotecteur de *Cymbopogon citratus* peut être attribué à ses propriétés antioxydantes et à son piégeage des radicaux libres (**Ekpenyong et al., 2014**).

Le CK-MB est une enzyme intervenant très largement dans la contraction du muscle cardiaque. Son dosage permet à priori le diagnostic et la surveillance d'un infarctus du myocarde (**Biomnis, 2012**). Nos résultats ont montré que le Ahoutou et les formulations de décoction et hydroéthanolique n'ont pas engendré de dommage des tissus cardiaques chez les rats auxquels ils ont été administrés.

## **Conclusion**

L'étude de la toxicité aigüe a montré que les extraits Ahoutou et de formulations de décoction et hydroéthanolique ne sont pas toxiques par voie orale.

Quant à l'évaluation de la toxicité subaigüe, qui a consisté à l'administration répétée des extraits Ahoutou et de formulations par voie orale, durant les vingt-huit jours (28 jours), à des rats de souche Wistar, n'a pas altéré les paramètres biochimiques. Il ressort de cette étude que les extraits Ahoutou et de formulations n'ont pas eu d'effets délétères sur les tissus rénaux et hépatiques et n'ont pas endommagés les tissus cardiaques. Cependant, ces extraits entraînent chez le rat Wistar un gain de poids tout stimulant l'appétit chez cet animal.

# **CONCLUSION GENERALE**

L'objectif général de cette étude est de contribuer à la prise en charge du paludisme par la valorisation d'une préparation traditionnelle utilisée dans le traitement du paludisme. Ce travail a consisté à rechercher à travers différentes expérimentations, les preuves scientifiques des propriétés thérapeutiques de cette préparation à base de la combinaison des trois plantes utilisées dans le traitement du paludisme et à proposer des formulations en vue d'une éventuelle amélioration. Cette préparation dénommée Ahoutou est utilisée chez l'homme mais n'avait pas encore fait l'objet d'études précliniques sur le paludisme pour évaluer ses propriétés thérapeutiques. Cette étude préclinique a donc été menée par le biais de la mise en place d'un modèle mathématique permettant d'obtenir une nouvelle formulation à partir de la combinaison des trois plantes. Le travail a consisté également à évaluer les activités antioxydantes et antiplasmodiales *in vitro*, quantifier les minéraux, et évaluer la toxicité du Ahoutou et des formulations chez les rats.

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes chimiques, dans les différents extraits capables d'inhiber la croissance de *Plasmodium falciparum in vitro*. Ainsi, la recette Ahoutou et les extraits des plantes qui la composent contiennent des phénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins condensés. Ces extraits possèdent également en outre des activités antiradicalaire et antioxydante qui seraient liées à la présence de ces composés. Le test de chimiosensibilité réalisé avec la recette Ahoutou et les extraits des plantes qui la composent a permis de déterminer leurs CI<sub>50</sub>. Tous les extraits y compris la recette Ahoutou ont la capacité d'inhiber la croissance de *Plasmodium falciparum*.

De manière générale, il ressort de ce travail que :

- La recette Ahoutou et les extraits des plantes qui la composent possèdent des principes actifs capables d'inhiber la croissance de *Plasmodium falciparum*. Cependant, Ahoutou a manifesté un effet modéré par rapport aux effets obtenus par les extraits des plantes pris individuellement.
- Grâce à ces outils modernes ou techniques (procédés) d'extraction, nous avons amélioré les activités de la recette Ahoutou avec la mise en place de nouvelles formulations à partir des plantes qui la composent.
- Les extraits des formulations possèdent également des principes actifs capables d'inhiber la croissance de *Plasmodium falciparum* avec un effet prometteur.
- Grâce aux tests biologiques réalisés, il est avéré que les formulations possèdent des vertus antiplasmodiques et antiradicalaires, ce qui est bénéfique pour la prise en charge du paludisme simple en médecine traditionnelle.

- Les formulations y compris la recette Ahoutou ne sont pas toxiques jusqu'à la dose de 2000 mg/kg pc et n'endommagent pas les organes cibles tels que le cœur, le foie, les poumons et les reins. Ces extraits peuvent donc être utilisés sans risques d'intoxication.
- La présence de certains minéraux dans ces extraits (Fer, calcium, magnésium, sodium, potassium) serait un complément de l'alimentation dans la prévention de certaines complications du paludisme comme l'anémie, les troubles hydroélectrolytiques et la déshydratation.

Au terme de cette étude, nous avons mis en place des nouvelles formulations à partir des plantes de la recette Ahoutou. Cette nouvelle formulation contient des composés phénoliques, flavonoïques totaux et des alcaloïdes. Elle possède également une bonne activité antiradicalaire et antioxydante qui serait liée à la présence de ces composés. Cette préparation ne renferme pas de produits toxiques selon le système de classification globale harmonisée (SGH) et exerce une activité antiplasmodiale prometteur meilleure que celle obtenue par la recette Ahoutou. Cette formulation peut être proposée aux tradipraticiens et à la population pour traiter efficacement le paludisme.

En perspective, nous réaliserons :

- Une étude clinique sur des patients pour confirmer la dose thérapeutique et rechercher les effets secondaires qui pourraient survenir ;
- Un fractionnement bio-guidé afin d'isoler et d'identifier les principes actifs impliqués dans l'activité antiplasmodiale de ces extraits des formulations ;
- Une formulation galénique stable pour la mise d'un Médicament Traditionnel Amélioré (MTA).

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abalaka, M., Oyewole, O. A. & Kolawole, A. R.** (2012). Antibacterial Activities of *Azadirachta Indica* against Some Bacterial Pathogens. *Advances in Life Sciences* **2**, 5-8.

**Achi, N. K., Onyeabo, C., Nnate, D. A., Ekeleme-Egedigwe, C. A., Kalu, I. K., Chibundu, I. C., Wokoma, G. C.** (2018). Effets thérapeutiques des feuilles d'*Azadirachta indica* A.Juss. chez les rats Wistar mâles infectés par le paludisme. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* **6**, 191-204.

**Ade-Serrano, O.** (1982). Growth inhibitory and lymphocytotoxic effect of *Azadirachta indica*. *Journal of African Medicinal Plants* **5**, 60-65.

**Adeneye, A. A. & Agbaje, E. O.** (2007). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *Journal Ethnopharmacol* **112**, 440-444.

**Adjanhoun, E. J., Adjakidje, V. & Ahyi, M.** (1989). Médecine traditionnelle et pharmacopée : Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en république populaire du Bénin. *Édrapport-ACCT Paris*, 427p.

**Adjanooun, E. J., Ahyi, M. R. A., Aké-Assi, L., Akpagana, K., Chibon, P., Hadji-El, A., Eyme, J., Garba, M., Gassita, J. N., Gbeassor, M., Goudote, E., Guinko, S., Hodouto, K. K., Houngnon, P., Keita, A., Keoula, Y., Kluga-Ocloo, W. P., Lo, I., Siamevi, K. M. & Taffame, K. K.** (1987). Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo. *Rapport ACCT, Paris, France*, 225.

**Adjanooun, E. J., Ake, A. L. & Floret, J. J.** (1979). Médecine traditionnelle et pharmacopée: Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques du togo. *Paris A.C.C.T*, 249

**Akinboro, A., Bakare, A. A.** (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *J Ethnopharmacol* **112**, 470-5.

**Akinmalodun, A. C., Ibukun, E. O., Afor, E., Akirinlola, B. L., Onibon, T. R., Akinboboye, A. O., Obuotor, E. M., Farombi, E. O.** (2007). Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. *Afr. J. Biotechnol*, 6(10): 1197-1201.

- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Frischknecht, F. & Ménard, R.** (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine* **12**, 220-224.
- Anonyme1** (2018). Lutte contre le paludisme en Côte d'Ivoire : les décès passe de 4431 en 2016 à 3222 en 2017. *Communiqué du 12/04/2018, consulté le 25/06/2019*.
- Asase, A., Akwetey, G. A. & Achel, D. G.** (2010). Ethnopharmacological use of herbal remedies for the treatment of malaria in the Dangme West District of Ghana. *J Ethnopharmacol* **129**, 367-76.
- Aschner, M., Lukey, B. & Tremblay, A.** (2006). The Manganese Health Research Program (MHRP): status report and future research needs and directions. *Neurotoxicology* **27**, 733-736.
- Ashafa, T. O. A., Orekoya, O. L. & Yakubu, T. M.** (2012). Toxicity profile of ethanolic extract of Azadirachta indica stem bark in male Wistar rats. *Asian Journal of Tropical Biomedicine* **2**, 811-817.
- Ashraf, A., Sarfraz, R. A., Rashid, M. A., Mahmood, A., Shahid, M. & Noor, N.** (2016). Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. *Pharmaceutical Biology* **54**, 1971-1981.
- Atangwho, I. J., Ebong, P. E., Eyong, E. U., Williams, I. O., Eteng, M. U., Egbung, G. E.** (2009). Comparative chemical composition of leaves of some antidiabetic medicinal plants : *Azadirachta indica*, *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. *African Journal of Biotechnology* **8**, 4685-4689.
- Bacon, D. J., Latour, C., Lucas, C., Colina, O., Ringwald, P. & Picot, S.** (2009). Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *The Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 1172-1178
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H., Schnieder, T. & Frevert, U.** (2007). Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathogen* **3**, 171.

**Basco, L. K. (2006).** Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXIII. Experimental studies on serum substitutes and alternative culture media for in vitro drug sensitivity assays using clinical isolates of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 777-782.

**Basco, L. K. (2007).** Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. *WHO, Library Cataloguing-in-Publication Data*, 202.

**Bates, C. J., Evans, P. H. & Dardenne, M. (1993).** A trial of zinc supplementation in young rural Gambian children. *British Journal of Nutrition* **69**, 243-255.

**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 (Caesalpiniaceae). *Sciences et Nature* **4**, 217-225.

**Benge, M. D. (1989).** Cultivation and propagation of the neem tree. In JACOBSON, M., Focus on phytochemical. *The neem tree. CRC Press, Boca Raton, FL. pesticides Ed. 1988* **1**, 1-18.

**Beourou, S., Okou, O. C., Tuo, K., Kamenan, K. C. D., Gnonjui, A. A., Kouakou, L., Atteméné, D. S. D., Penali, L., Jambou, R. & Djaman, A. J. (2017).** Propagation in culture of *Plasmodium falciparum* gametocytes clinical isolates and antiplasmodial activity of two medicinal plant extracts on parasitic growth. *African Journal of Parasitology Research* **4**, 249-256.

**Biomnis (2012).** Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. 2.

**Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D. & Yadav, A. (2013a).** Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology* **2013**, 7

**Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D. & Yadav, A. (2013b).** Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology* **13**, 7

**Bitsindou, M.** (1997). Enquêtes sur la phytothérapie traditionnelle à Kindamba et Odzala (Congo) et analyse des convergences d'usage des plantes médicinales en Afrique Centrale. *Thèse de doctorat, université libre de Bruxelles, Belgique*, 482p.

**Blois, M. S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature & technologie. b- sciences agronomiques et biologiques* **26**, 1199-1200.

**Bohui, P. S. G., Adima, A. A., Niamké, F. B. & N'Guessan, J. D.** (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie* **046** :, 50 -58.

**Bois, D.** (1928). Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les ages Paul Lechevalier *Paris VI* **2**, 637.

**Bolou, G. E. K., B. 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.

**Brabin, B. J.** (1992). The role of malaria in nutritional anemias; in Fomon SJ, Slotkin S (eds): *Nutritional Anemias. New York, Raven Press* 65-80.

**Bricaire, F., Worlff, M. & Charmot, G.** (1990). aludisme–Techniques. *Encycl. Chir Thérapeutique, Paris, France*, 10-12.

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

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

**Camacho, C. M., Del, R., Croft, S. L. & Phillipson, J. D.** (2000). Natural products as sources of antiprotozoal drugs. *Current opinion in anti-infective investigational drugs* **2**, 47-62.

**Changpradub, D. & Mungthin, M.** (2014). Severe vivax malaria: a case report and a literature review. . *Journal of the Medical Association of Thailand* **97**, 243-246.

**Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez.** (2005). Free radical and antioxidants (Cymbopogon Citratus (DC) Staff.) [J]. *J Agric Food Chem.* **53**, 2511-2517.

**Chen, C. W. & Ho, C. T.** (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green tea and black tea. *J Lipids* **2**, 35-46.

**Chen, I., Clarke, S. E., Gosling, R., Hamainza, B., Killeen, G., Magill, A., O'Meara, W., Price, R. N. P. & Riley, E. M.** (2016). Asymptomatic malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Medicine* **13**, 100-1942.

**Chenq, Q., Kyle, D. E. & Gatton, L. L.** (2012). Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. A process linked to dormancy. *International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance* **2**, 249-255.

**Choong, C., T.an-Den, V. T., Roger, F. & Roger, M. C. F. L.** (2007). Antioxidant activities, phenolic and beta-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry* **103**, 829-838.

**Clement, M. & Francoise, P.** (2003). Analyse chimique des sols. *Édition: Tec et Doc*, 387p.

**Co, E. M., Dennull, R. A., Reinbold, D. D., Waters, N. C. & Johnson, J. D.** (2009). Assessment of malaria in vitro drug combination screening and mixed-strain infections using the malaria Sybr green I-based fluorescence assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**, 2557-2563.

**Corbett, Y., Herrera, L., Gonzalez, J., Cubilla, L., Capson, T. L., Coley, P. D., Kursar, T. A., Romero, L. I. & Ortega-Barria, E.** (2004). A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **70**, 119-124.

- Costa, C. A., Bidinotto, L. T., Takahira, R. K.** (2011). Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food Chem Toxicol* **49**, 2268-72.
- Crowell, P. L., Elson, C. E., Bailey, H. H.** (1994). Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**, 31-7.
- Cui, L., Mharakurwa, S., Ndiaye, D., Rathod, P. K. & Rosenthal, P. J.** (2015). Antimalarial drug resistance literature review and activities and finding of the ICEMR network. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **93**, 57-68.
- Culotta, V. C., Yang, M. & O'Halloran, T. V.** (2006). Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 747-758.
- Daneshvar, C., Davis, T. M., Cox-Singh, J., Rafa'ee, M. Z., Zakaria, S. K., Divis, P. C. & Singh, B.** (2009). Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. *Clinical Infectious Diseases* **49**, 852-860.
- Danlami, U., Rebecca, A., Machan, D. B. & Asuquo, T. S.** (2011). Comparative study on the Antimicrobial activities of the Ethanolic extracts of Lemon grass and Polyalthia longifolia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **1**, 174-176.
- Das, A., Sharma, M., Gupta, B. & Dash, A. P.** (2009). Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: so similar, yet very different. *Parasitology Research* **105**, 1169-1171.
- 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.
- Desjarlais, F.** (2006). Aspartate aminotransferase. Fiches cliniques. *Annales de Biologie Clinique Québec* **43**, 40-43.
- Diaby, B., Kroa, E., Niare, A., Coulibaly, D., Traore, Y., Giani, S., Coulibaly, A., Niare, B., Guindo, A., Kéita, M. T., Sylla, A. O., Sanogo, R. & Doumbo, O. K.** (2011).

Connaissances, attitudes et pratiques des tradipraticiens de la sante de la ville d'Abidjan sur le paludisme. *Mali medical Tome XXVI* 8-12.

**Die-Kacou, H., Kamagate, M. & Yavo, J. C.** (2009). Intoxications par les plantes à Abidjan : difficultés du diagnostic étiologique et aspects ethnobotaniques. *Bio-Afrique* **7**, 34-43.

**Dutta, S. & Das, S.** (2009). Une étude de l'effet anti-inflammatoire des feuilles de *Psidium guajava* Linn. sur des modèles animaux expérimentaux. 2p.

**Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C. & Shiroishi, T.** (1975). Invasion of erythrocytes by malaria mérozoïtes *Science* **187**, 748-750.

**Ekanem, J.** (1978). Dongo-Yaro, does it work? . *Nigeria Medical Journal* **8**, 8-10.

**Ekpenyong, C. E., Ekpan, A. E. & Nyebuk, D. E.** (2014). Phytochemical constituents, Therapeutic Applications and Toxicological profile of *Combopogon citratus* Stapf (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacology and Phytochemistry* **3**, 133-141.

**Eleazu, C. O., Okafor, P. N., Amajor, J., Awa, E., Ikpeama, A. I., Eleazu, K. C.** (2011). Chemical Composition, antioxidant activity, functional properties and inhibitory action of unripe plantain (*M. Paradisiacae*) flour. *Afr. J. Biotechnol* **10**, 16948-16952.

**Eleazu, C O, Eleazu, K C, Awa, E and Chukwuma, S C.** (2012). Comparative study of the phytochemical composition of the leaves of five Nigerian medicinal plants. *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research* **3**, 42-46.

**Ene, A. C., Atawodi, S. E., Ameh, D. A., Kwanashie, H. O. & Agomo, P. U.** (2010). Locally used plants for malaria therapy amongst the Hausa, Yoruba and Ibo communities in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *IJKT* **9**, 486-490.

**Figueirinha, A., Cruz, M. T., Francisco, V., Lopes, M. C. & Batista, M. T.** (2010). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *Journal of Medicinal Food* **13**, 681-690.

**Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez-Alonso, J. J., Santos-Buelga, C., Batista, M. T. & Kolawole, A. R.** (2008). *Cymbopogon citratus* leaves : characterisation of flavonoids by

HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chemistry* **110**, 718-728.

**Flamand, B.** (2005). Cours de parasitologie DUT ABB, les filaires exotiques. *IUT Dijon*.

**Foote, S. J. & Cowman, A. F.** (1994). The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Tropical* **56**, 157-171.

**Forster, P. & Moser, G.** (2000). Status report on global Neem usage. Ed. Eschborn.

**Garg, D., Muley, A., Khare, N. & Marar, T.** (2012). Comparative Analysis of Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Some Indian Culinary Herbs. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **3**, 845-854.

**Gentillini, M., Caumes, E. & Duflo, B.** (1993). Médecine Tropicale, Médecine-Sciences 5ème ed. Flammarion Paris. 928.

**Gnanamani, A., Sudha, M., Deepa, G., Sudha, M., Deivanai, K. & Sadulla, S.** (2008). Hematological and biochemical effects of polyphenolics in animal models. *Chemosphere* **72**, 1321-1326.

**Gregson, A. & Plowe, C. V.** (2005). Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological Review* **57**, 117-145.

**Gupta, B. K. & Jain, N.** (1978). Cultivation and utilization of Genus *Cymbopogon* in Indian. *Indian Perfumer* **22(2)**, 55-68.

**Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S. & Solis, R. V.** (2008). *Psidium guajava*: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **117**, 1-27.

**Han, X., hen, T. & Lou, H.** (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* **8**, 950-988.

- Hanif, A., Hossan, S., Mia, M. M. K., Islam, M. J., Jahan, R. & Rahmatullah, M.** (2009). Ethnobotanical survey of the Rakhain tribe inhabiting the Chittagong hill tracts region of Bangladesh. *AENSI* **3**, 172-180.
- Hemmer, C. J., Lehr, H. A., Westphal, K., Unverricht, M., Kratzius, M. & Reisinger, E. C.** (2005). *Plasmodium falciparum* Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. *Infectious Immunology* **73**, 1764-1770.
- Herbal, D. B.** (2018). Avantages de l'extrait de feuille de neem pour la peau: hydrate et guérit.
- Hermione, T. M., Armelle, T. M., Samuel, A. N., T. M., Armel-Joseph, D. A., Victor, K.** (2019). Évaluation des toxicités aiguës et subaiguës de l'extrait méthanolique d'écorce de *Psidium guajava* : une plante avec un potentiel antiprolifératif *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2019**, 13p
- Hilaly, E. J., Israili, H. Z. & Lyouss, B.** (2004). Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva iva* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol* **91**, 43-50.
- Hsu, C. Y., Chan, Y. P. & Chang, J.** (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol Res* **40**, 13-21.
- Isah, A. B., Ibrahim, Y. K. E. & Iwalewa, E. O.** (2003). Evaluation of the Antimalarial Properties and Standardization of Tablets of *Azadirachta indica* (Meliaceae) in Mice. *Phytotherapy Research* **17**, 807-810
- Isnard, B. C., Deray, G., Baumelou, A., Quintrec, M. L. & Vanherweghem, J. L.** (2004). Herbs and the kidney. *American Journal of Kidney Diseases* **44**, 1-11.
- Izumiya, 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*. 3 **366**, 1960-1963.

**Kamanyi, A., Dongmo, A. B. & Bopelet, M.** (1995). Etude des propriétés hypotensives de l'extrait aqueux et une saponine total des feuilles de *Musanga cecropioides* (Cecropiaceae) chez le rat. *Revue Medical. Pharmaceutique. Africaine* **9**, 107-113.

**Kaushik, N. K., Bagavan, A., Rahuman, A. A., Mohanakrishnan, D., Kamaraj, C. & Elango, G.** (2013). Antiplasmodial potential of selected medicinal plants from eastern Ghats of South India. *Experimental Parasitology* **134**, 26-32.

**Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F. J.** (1991). Evaluation of the mutagenicity of  $\beta$ -myrcene in mammalian cells in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **18**, 28-34.

**Kerharo, J. & Adam, J. G.** (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. *Plantes médicinales et toxiques*. Ed. Vigot et Frères (Paris) 604-606.

**Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P. & Kefalas, P.** (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innov. Food Sci. Emerg* **10**, 246-252.

**Klein, E. Y.** (2013). Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International Journal of Antimicrobial Agents* **41**, 311-317.

**Koffi, A. J.** (2017). Etude phytochimique, évaluation in vitro des oligo-éléments, des activités antiplasmodiale, antioxydante et non hémolytique de *Cochlospermum planchonii* (Cochlospermaceae), *Harungana madagascariensis* (Hipperiaceae) et de *Pericopsis laxiflora* (Fabaceae), trois plantes issues de la région de toumodi (Côte d'Ivoire). *Doctorat d'Université, Thèse Unique, Université Félix Houphouët Boigny*, 200p.

**Koffi, N. E.** (2014). Contribution à l'optimisation et à l'étude chimique des polyphénols de deux plantes de la Côte d'Ivoire *Tectona grandis* Linn (Verbenaceae) et *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae). p. 160. Université Nangui Abrogoua.

- Koh, H. P., Mohd, Z. A. & Igbal, M.** (2012). Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract : Alleviation of carbon tetrachloride-induced hépatic oxidative stress and toxicity. *Hum Exp. Toxicol* **31**, 81-91.
- Kokwaro, J. O.** (2009). Medicinal plants of East Africa 3rd edition. *University of Nairobi press, Nairobi, Kenya*, 418.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H. & Chen, W.** (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of Syrian sumac fruit extract. *Journal of Natural Products* **6**, 102.
- Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R. & Kakou, A.** (2015a). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. *Lavoisier SAS*, 9p.
- Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R. & Kakou, A.** (2015b). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie *Phytothérapie*, 10p.
- Kumar, B., Sharmila, P., Vanithapappa, M., Sundararajan, M. & Rajasekara, P.** (2004). Hepatoprotective activity of *Triantema portulacastrum* against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *J. Ethnopharmacol* **92**, 37-40.
- Laborpresse.net** (2014). Bienfaits pour la santé des feuilles de goyave.
- Ladda, R., Aikawa, M. & Sprinz, H.** (1969). Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malaria parasites. *Journal of Parasitology* **55**, 633-644.
- Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I.** (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **8**, 395-400.
- Lambros, C. & Vanderberg, J. P.** (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology* **65**, 418-420.

**Langreth, S. G., Nguyen-dinh, P. & Trager, W.** (1978). Plasmodium falciparum: Merozoite invasion in vitro in the presence of chloroquine. *Experimental Parasitology* **46**, 235-238.

**Lapointe, G.** (2004). Notions de Toxicologie. 2nd ed. *Commission de la santé et de la sécurité du travail (Québec, Canada)*, 16-20.

**Laroche, M.J., Fabiani P. & Rousselet F.** (1996). L'expertise toxicologique des médicaments. Edition Masson, Paris, 367 p.

**Larousse** (1986). Encyclopédie médicale de l'Afrique. *Édition Librairie Larousse. Paris*, 1150.

**Larrey, D.** (1997). Hepatotoxicity of herb remedies. *Journal of hepatology* **26**, 47-51.

**Lauwerys, R., Haufroid, V., Houet, P. & Lison, D.** (2007). Toxicologie industrielle & intoxications professionnelles. 5<sup>ème</sup> Édition Masson, Paris, 1252 p.

**Le-Bras, J.** (2006). Cours de parasitologie. Paludisme, épidémiologie et physiopathologie. *DCEM1 Paris 7*.

**Le-Nagard, H., Vincent, C., Mentre, F. & Bras, J. L.** (2011). Online analysis of in vitro resistance to antimalarial drugs through nonlinear regression. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **104**, 10-18.

**LeBlanc, G. A.** (2010). Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4<sup>th</sup> ed. *John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey)*, 125-236.

**Lim, P., Alker, A. P., N. Khim, Shah, N. K., Incardona, S., Doung, S., P. Yi, Bouth, D. M., Bouchier, C., Puijalon, O. M., Meshnick, S. R., Wongsrichanalai, C., Fandeur, Bras, J. L., Ringwald, P. & Ariey, F.** (2009). Pfmdr1 copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malaria Journal* **8**, 11.

**Liu, Y., Murakami, N., Ji, H., Abreu, P. & Zhang, S.** (2007). Antimalarial flavonol glycosides from Euphorbia hirta. *Pharmaceut. Biol* **45**, 278-281.

**Lucantoni, L., Yerbanga, R. S., Lupidi, G., Pasqualini, L., Esposito, F. & Habluetzel, A.** (2010). Transmission blocking activity of a standardized neem (Azadirachta indica) seed

extract on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in its vector *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal* **9**.

**Lucky, O. O., Kate, E. I. & Adeyemi, A. A.** (2010 ). Phytochemical, Proximate and Metal Content Analysis of the Leaves of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae). *International Journal of Health Research* **3**, 217-221.

**Maïga, M. A. A.** (2014). Etude de la chimie et des activités biologiques de six (6) plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète : *Allium cepa*; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena*. p. 135. Université de Bamako: Bamako.

**Makler, M. T. & Hinrichs, D. J.** (1993). Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **48**, 205-210.

**Maltha, J., Gillet, P. & Jacobs, J.** (2013). Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clinical Microbiology Infectious* **19**, 399-407.

**Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M.** (2005). Total phenolics in bulgarian Fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* **40**, 255-260.

**Matsuo, N. H., Koyoko, S. Y. N. & Tomita, I.** (1994). Identification of (+) galocatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidium guajava* leaves *Phytochemistry* **36(4)**, 1027-1029.

**Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. & Hadar, S. P.** (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative systems of various senescing leaves. *Journal of Agriculture and food chemistry* **43**, 1813-1817.

**Melariri, P., Campbell, W., Etusim, P. & Smith, P.** ( 2012). In vitro antiplasmodial activities of extracts from five plants used singly and in combination against *Plasmodium falciparum* parasites. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**, 5770-5779.

**Melhorn, H. E. D.** (2001). Encyclopaedic reference of parasitology. *2nd edition, Dusseldorf, Springer*, 617.

**Menan, E. I. H., Yavo, W., Oga, S. S. A., Kiki-barro, P. C., Kassi, R. R., Ewussi, L. & Koné, M.** (2007). Diagnostic clinique présomptif du paludisme : part réelle de la maladie. *Medecine d'Afrique Noire* **54**, 139-144.

**Ménard, D., Ariey, F. & Mercereau-Puijalon, O.** (2013). Etude de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques au sein du réseau international des Instituts Pasteur (RIIP-Palu). *Médecine/sciences* **29**, 9.

**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.

**Menendez, C., Todd, J., Alonso, P. L., Lulat, S., Francis, N. & Greenwood, B. M.** (1994). Malaria chemoprophylaxis, infection of the placenta and birth weight in Gambian primigravidae. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 244-248.

**Miguel, M. G., Cruz, C., Faleiro, L., Simoes, M. F. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. & Pedro, L. G.** (2010). *Foeniculum vulgare*: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications* **5**, 319-328.

**Mitra, C. R. & Misra, P. S.** (1967). Amino acids of processed seed meal proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **15**, 697-700.

**Mohammedi, Z.** (2005). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Université Abou Bakr Belkaïd: Tlemcen.

**Molyneux, M. E., Looareesuwan, S. & Menzies, I. S.** (1989). Reduced hepatic blood flow and nintestinal malabsorption in severe falciparum malaria. *Americain Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40**, 470-476.

**Mondal, D. & Mondal, T.** (2012). A Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective. *Res. J. Recent Sci* **1**, 94-99.

**Monsieurs Plantes** (2014 ). Azadirachta indica ou Neem, une plante aux 1001 vertus. Ayurveda, Dossiers santé, Médecine Ayurvédique, Remèdes Naturels.

**Mukinda, T. J., Syce, A. J., Fisher, D. & Meyer, X. M.** (2010). Effect of the Plant Matrix on the Uptake of Luteolin Derivatives-containing Artemisia afra Aqueous-extract in Caco-2 cells. *J. Ethnopharmacol* **130**, 439–449.

**Murakami, N., Huq, M. M., Tamura, S., Itagaki, S., Horii, T. & Kobayashi, M.** (2001). New anti-malarial flavonol glycoside from Hydrangeae dulcis folium. *Bioorg. Med. Chem* **11**, 2445-2447.

**Muthaura, C. N., Keriko, J. M., Derese, S., Yenesew, A. & Rukunga, G. M.** (2011). Investigation of some medicinal plants traditionally used for treatment of malaria in Kenya as potential sources of antimalarial drugs. *Experimental Parasitology* **127**, 609-626.

**N'guessan, J. D., Zirihi, G. N., Kra, A. K. M., Kouakou, K., Djaman, A. J. & Guede-Guina, F.** (2007). Free radical scavenging activity, flavonoid and phenolic contents of selected Ivoirian plants. *International Journal of Natural and Applied Sciences* **4**, 425-429.

**N'Guessan, K., Bi, F. H. T. & Koné, M. W.** (2009). Etude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle chez les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte d'Ivoire). *Ethnopharmacologia* **44**, 42-50.

**Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. & Mitani, T.** (2000). Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5512-5516.

**Nassirou, R. S., Ibrahim, M. L., Ilagouma, A. T., Mahamadou, A., Mamoudou, M., Abdoulaye, A., Oukem-Boyer, O. O. M. & K, K. I.** (2015). Évaluation in vitro de l'activité antiplasmodiale d'extraits de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle du Niger. *Journal of Applied Biosciences* **89**, 8291-8300.

**National, R. C.** (1992). Neem: a tree for solving global problems. *National Academy Press, Washington, D.C.*

- Nicolas, J. P.** (2012). Plantes médicinales du nord de Madagascar. *Jardin du Monde*, 150.
- Nikiema, J. B., Simpore, J., Dabogo, S., Djierro, K., Guissou, I. P. & Kasilo, J. M.** (2010). L'introduction de plantes médicinales dans le traitement de l'infection à VIH : une approche réussie au Burkina Faso. In *The African Health Monitor. African Traditionnal Medicine Day, OMS*, 47-51.
- Nogueira, A. C. M. A., Carvalho, R. R., Souza, C. A. M.** (1995). Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. *Toxicology* 196,105-13.
- Nondo, R. S., P. Erasto P., Moshi, M. J., Zacharia, A., Masimba, P. J. & Kidukuli, A. W.** (2017). In vivo antimalarial activity of extracts of Tanzanian medicinal plants used for the treatment of malaria. *Journal of Advanced Pharmacology and Technology Research* 7, 59-63.
- Nundkumar, N. & Ojewole, J. A.** (2002). Studies on the antiplasmodial properties of some South African medicinal plants used as antimalarial remedies in Zulu folk medicine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24(7), 397-401.
- OCDE 423** (2001). Guideline for the testing of chemicals. *Acute oral toxicity-Acute Toxic Class Method*.
- OCDE** (1998). Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances. *Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France*.
- OCDE** (2008). ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: étude toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. 14p.
- Okere, S. O., Sangodele, J. O., Ogunwole, E., Adams, M. D. & Shafe, M. O.** (2014). Antiplasmodial activity of aqueous leaf extract of *Cymbopogon citratus* against *Plasmodium falciparum* infected rats. *American Journal of Biomedical and Life Sciences* 2, 60-64.
- Olajide, O. A., Awe, S. O. & Makinde, J. M.** (1999). Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. *Fitoterapia* 70, 25-31.

**Oluwole, A. B., Laura, Z., Olufunke, D. O., Oluwafunmike, A. S., Luciana, D. & Ezekiel, C. M. A.** (2011). Ameliorative effects of ethanolic leaf extract of *Azadirachta indica* on renal histologic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *The American Journal of Chinese Medicine* **39(5)**, 903-916.

**OMS** (1973). Chimiothérapie du Paludisme et résistance aux anti-paludiques. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. *Séries rapports techniques, Genève 1973* **259**, 30-39.

**OMS** (2000). General guidelines for methodologies research and evaluation of traditional medicine. *Switzerland*, 80p.

**OMS** (2008). Fact sheet on traditional medicine.

**OMS** (2011). Rapport sur le paludisme dans le monde ; résumé et points essentiels. 1-2.

**OMS** (2017). Stratégie de coopération de l'organisation mondiale de la santé avec la république de Côte d'Ivoire 2016-2020. 90p.

**OMS** (2018). Rapport sur le paludisme dans le monde. *Genève, Suisse*, 210.

**Otache, M. A., Agbajor, G. K.** (2017). Proximate and Mineral composition of leaves of *Azadirachta indica*. *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences* **4**, 50-54.

**Pascual, M., Ahumada, A., Chaves, L. F., Rodo, X. & Boum, M.** (2006). Malaria resurgence in the East African highlands: Temperature trends revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5829-5834.

**Perera, D. F. T. N., Fernando, K. M. E. P. & Wijendra., W. A. S.** (2014). Antifungal activity of secondary metabolites present in *Psidium guajava* leaves against dermatophytes. *Vidyodaya J. Sci* **19**

**Phillips, R. E., Looareesuwan, S., White, N. J., Silamut, K., Kietinun, S. & Warrell, D. A.** (1986). Quinine pharmacokinetics and toxicity in pregnant and lactating women with falciparum malaria. *British Journal of Clinical Pharmacology* **21**, 677-683.

- Picard, H.** (1975). Utilisation thérapeutique des oligo-éléments *Ed. Maloine, Paris*.
- Pillay, P., Maharaj, V. J. & Smith, P. J.** (2008). Investigating South African plants as a source of new antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology* **119**, 438-454.
- Prasad, A. S.** (2003). Zinc deficiency. *British Medical Journal* **326**, 409-410.
- Puri, H. S.** (1999). Neem the divine tree, *Azadiracta indica*. *1079 LH Amsterdam*.
- Ramasamy, M. & Arumugam, V. A.** (2016 ). Evaluation of Antioxidant Activity of *Psidium guajava* Linn in streptozotocin–Induced Diabetic Rats. **6**.
- Rao, P.** (1987). Chemistry, biological activity and utilization aspects of some promising neem extractives. In: Eschborn (ed), *Natural Pesticides from Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss.) and other Tropical Plants*. *3rd Int. Neem Conf. Nairobi, Kenya*, 127-148.
- Rao, S. R. & Padmanabhan, G.** (2013). Linear modeling of the electrochemical machining process using full factorial design of experiments. *Journal of Advanced Mechanical Engineering* **1**, 13-23.
- Rason, M. A., Randriantsoa, T., Andrianantenaina, H., Ratsimbasoa, A. & Menard, D.** (2008). Performance and reliability of the SYBR Green I based assay for the routine monitoring of susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 346-351.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237.
- Rocha-Silva, F. L., Silva, A. C. P. D., Pohlit M.A., Quignard, J. L. E., Viera, R. P. P., Tadei, P. W., Chaves, M. C. F., Samonek, F. J., Lima, J. A. C., Costa, F. R. M., Alecrim, C. G. M. & Neto, A. F. V.** (2011). In vivo and in vitro antimalarial activity of 4 nerolidylcatechol. *Phytotherapy research* **25**, 1181-1188.

**Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A. & Muñoz, J. F.** (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **6**, 2-7.

**Rowe, A., Berendt, A. R., Marsh, K. & Newbold, C. I.** (1994). Plasmodium falciparum: a family of Sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. *Experimental Parasitology* **79**, 506-516.

**Ruckebush, Y.** (1981). Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. 2<sup>ème</sup> Édition Maloine, Paris ; 612 p.

**Salery, R. M.** (2007). Activité antipaludique de la girolline, étude in vitro et in vivo. p. 158. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse: Toulouse.

**Salgado, H. R. N., Roncari, A. F. F., Michelin, D. C. & Moreirarr, D.** (2006). Evaluation of antidiarrhoeal effects of Psidium guajava L.(Myrtaceae) aqueous leaf extract in mice. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* **27**, 89-92.

**Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Schiavini, M. S., Nakamura, C. V. & Filho, B. P. D.** (2005). An Evaluation of Antibacterial Activities of Psidium guajava (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology—An International Journal* **48**, 429-436.

**Sanchez, C. P., Stein, W. D. & Lanzer, M.** (2007). Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitology* **23**, 332-339.

**Sangaré, D.** (2003). Etude de la prise en charge du paludisme par les thérapeutes Traditionnels dans les aires de sante de kendie (bandiagara) et de Finkolo (Sikasso). *thèse de doctorat. Bamako*, 58.

**Sannella, A. R., Messori, L., Casini, A., Vincieri, F. F. & Bilia, A. R.** (2007). Antimalarial properties of green tea. *Biochemical and biophysical research communications* **353**, 177-181.

**Sanogo, R., Doucouré, M., Fabre, A., Haidara, M., Diarra, B., Dénou, A., Kanadjigui, F., Benoit, V. F. & Diallo, D.** (2014). Standardisation et essai de production industrielle. *Pharm. Méd. Trad. Afr* **17**, 15-20.

**Santin, M. R., Dos Santos, A. O., Nakamura, C. V.** (2009). In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* **105**, 1489-96.

**Schmutterer, H.** (1995). The Neem Tree, *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceous Plants. *VCH: Weinheim*.

**Schmutterer, H. & Ascher, K. R. S.** (1987). Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants. *Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, Kenya, 1986)*.

**Schordelet, M., Jaques, A. E. & Bachman F.** (1992). Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 2<sup>ème</sup> Édition Frison-Roche et Slatkine, Paris, Genève, 932 p.

**Shankar, A. H. & Prasad, A. S.** (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 447S-463S.

**Sibley, C. H., Hyde, J. E., Sims, P. F., Plowe, C. V., Kublin, J. G., Mberu, E. K., Cowman, A. F., Winstanley, P. A., Watkins, W. M. & Nzila, A. M.** (2001). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitology* **17**, 582-588.

**Sidhu, A. B., Verdier-Pinard, V. & Fidock, D. A.** (2002). Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr*t mutations. *Science* **298**, 210-213.

**Sithisarn, P., Supabphol, R., Gritsanapan, W.** (2005). Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *Journal of Ethnopharmacology* **99(1)**, 109-112.

**Sithisarn, P., Supabphol, R., Gritsanapan, W.** (2006). Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) leaf extracts prepared by different methods of extraction. *Medical Principles and Practice* **15**, 219-222.

**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.

**Sohafy, S. M. E., Metwalli, A. M., Harraz, F. M. & Omar, A. A.** (2009 ). Quantification of Flavonoids of *Psidium guajava* L. Preparations by Planar Chromatography (HPTLC). *Pharmacognosy Magazine* **5**, 61-66.

**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.

**Sousa, S. M., Silva, P. S., Viccini, L.F.** (2010). Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. *An Acad Bras Cienc* **82**, 305-11.

**Sutherland, C. J., Allouche, A., Curtis, J., Drakeley, Ord, R., Duraisingh, M., Greenwood, B. M., Pinder, M., Warhurst, D. & Targett, G. A.** (2002). Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 578-585.

**Tano, K. D.** (2016). Etude de l'activite antiplasmodiale de divers extraits de *Terminalia glaucescens* (Combretacea) et d'*Erigeron floribundus* (Asteracea). Profil toxicologique en vue de la formulation de médicaments traditionnels améliorés (MTA) antipaludiques. *Thèse de l'Université Félix Houphouët-Boigny de l'UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques*, 237.

**Tardieux, I. & Ménard, R.** (2008). Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic* **9**, 627-635.

**Tarkang, P. A., Franzoi, K. D., Lee, S., Lee, E., Vivarelli, D., Freitas-Junior, L., Liuzzi, M., Nolé, T., Ayong, L. S., Agbor, G. A., Okalebo, F. A. & Guantai, A. N.** (2014). Activités antiplasmodiques in vitro et combinaisons synergiques d'extraits de solvants différentiels du produit polyherbal, Nefang. **2014**, 10.

**Tensaout, F. & Gaoua, A.** (2018). Caractéristiques chimiques et propriétés antioxydantes de la goyave «*Psidium guajava* ». *Universite Abderrahmane Mira – Bejaia. Memoire de fin d’etude*, 94p.

**Thaithong, S.** (1983). Clones of different sensitivities in drug-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Bulletin of the World Health Organization* **61**, 709-712.

**Thakurta, P., Bhowmik, P., Mukherjee, S., Hajra, T. K., Patra, A. & Bag, P. K.** (2007). Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. *Journal of Ethnopharmacology* **111**, 607–612.

**Timbrell, J.** (2000). Principles of biochemical toxicology. *3rd ed. Taylor & Francis. Inc (London)*, 1-390.

**Tiwari, M., Dwivedi, U. N., Kakkar, P.** (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chem Toxicol.* **48**, 2913-2919.

**Tra-Bi, F. H., IRIÉ, G. M., N’GAMAN, K. C. C. & Clejesson, M. 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.

**Trager, W. & Jensen, J. B.** (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **190**, 673-675.

**Troye-Blomberg, M.** (2002). Genetic regulation of malaria infection in humans. *Chemical and Immunology* **80**, 243-252.

**Tuo, K.** (2015). Criblage phytochimique, activité antioxydante et antiplasmodiale in vitro de cinq plantes utilisées traditionnellement en Côte d’Ivoire contre le paludisme. p. 200. Université Félix Houphouët Boigny: Abidjan.

**Utami, D. E., Baroroh, N. H. & Nuryanti, N.** (2018). Subacute Toxicity Effect of *Psidium guajava* Leaves Ethanolic Extract on Gaster in wistar Rat. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* **16**, 61-66.

**Valdiguie, P.** (2000). Biochimie clinique. 2e Edition. *Editions Médicales Internationales, France*, 340p.

**Van, P. D.** (2001). Citronnelle. *Cymbopogon* spp. In: Agriculture en Afrique Tropicale. *Direction générale de la coopération Internationale (DGCI). Bruxelles, Belgique* 1231-1232.

**Vartak, V. D. & Ghate, V.** (1990). Ethnobotany of neem Biol. Ind. **1** 55-59.

**Vigushin, D. M., Poon, G. K, Boddy, A.** (1998). Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**, 111-7.

**White, N. J.** (2004). Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation* **113**, 1084-1092.

**White, N. J.** (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine* **361**, 455-467.

**WHO** (2019). World malaria report 2019. *World Health Organization*, P.xxii.

**Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C. & Sam, B.** (2013). Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infectious Disease* **13**, 1043-1049.

**Wood, J. E., Senthilmohan, S. T. & Peskin, A. V.** (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry* **77**, 155-161.

**Woodrow, C. J. & Krishna, S.** (2006). Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cellular Molecular and Life Sciences* **63**, 1586-1596.

**Wuththitum, W.** (1994). Thai traditional medicine. O.S. *Printing House, Bangkok*, 237.

**Yavo, W., Ackra, K. N., Menan, E. I., Barro-Kiki, P. C., Kassi, R. R., Adjetey, T. A., Bamba, A. & Kone, M.** (2002). Comparative study of four malaria diagnostic techniques used in Ivory Coast. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **95**, 238-40.

**Yéo, S. O.** (2015). Evaluation In Vitro des activités antibactérienne Et antioxydante des extraits de racines de *Cochlospermum planchonii* Hook f. ex. Planch. (Cochlospermaceae), une plante utilisée contre les diarrhées en Côte d'Ivoire. *Doctorat d'Université Thèse Unique, Université Félix Houphouët Boigny*, 130p.

**Yéo, S. O., Guessenn, K. N., Meité, S., Ouattara, K., Bahi, G. A., N'Guessan, J. D. & Coulibaly, A.** (2014). In vitro *Cochlospermum planchonii* (Cochlospermaceae) antioxidant activity of extracts hook. of ex. the Planch root. *Journal of Pharmacognosy and phytotherapy* **3**, 164-170.

**Zeng, W. & Wang, S. Y.** (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **49**, 5165-5170.

**Zirihi, G. N., Datté, J. Y., Kra-Adou, K. M. & Grellier, P.** (2007). Phytochemical and pharmacological studies of the alcoholic extract (MFA) of *Fagara macrophylla* (Oliv.) Engl. (Rutaceae): the chemical structure of the active compound inducing antipaludic activity. *Journal of Clinical Medicine Research* **2**, 205-210.

**Zirihi G.N., Datté J.Y., Kra-Adou K.M. & Grellier P.** (2007). Phytochemical and pharmacological studies of the alcoholic extract (MFA) of *Fagara macrophylla* (Oliv.) Engl. (Rutaceae): the chemical structure of the active compound inducing antipaludic activity. *Journal of Clinical Medicine Research*, **2(4)**:205-210.

# **ANNEXE**

ENQUETE SUR LE MEDICAMENT "AHOUTOU" C001

Localité  Date

Nom et prénoms

Connaissez-vous la recette "Ahoutou" ?

A quoi sert-il?

Avez-vous déjà utilisé ce médicament?

C'était pour traiter quelle maladie?

Quelle est votre appréciation globale sur ce médicament?

Sous que le forme se trouvait le médicament?

Quelle est la posologie du médicament?

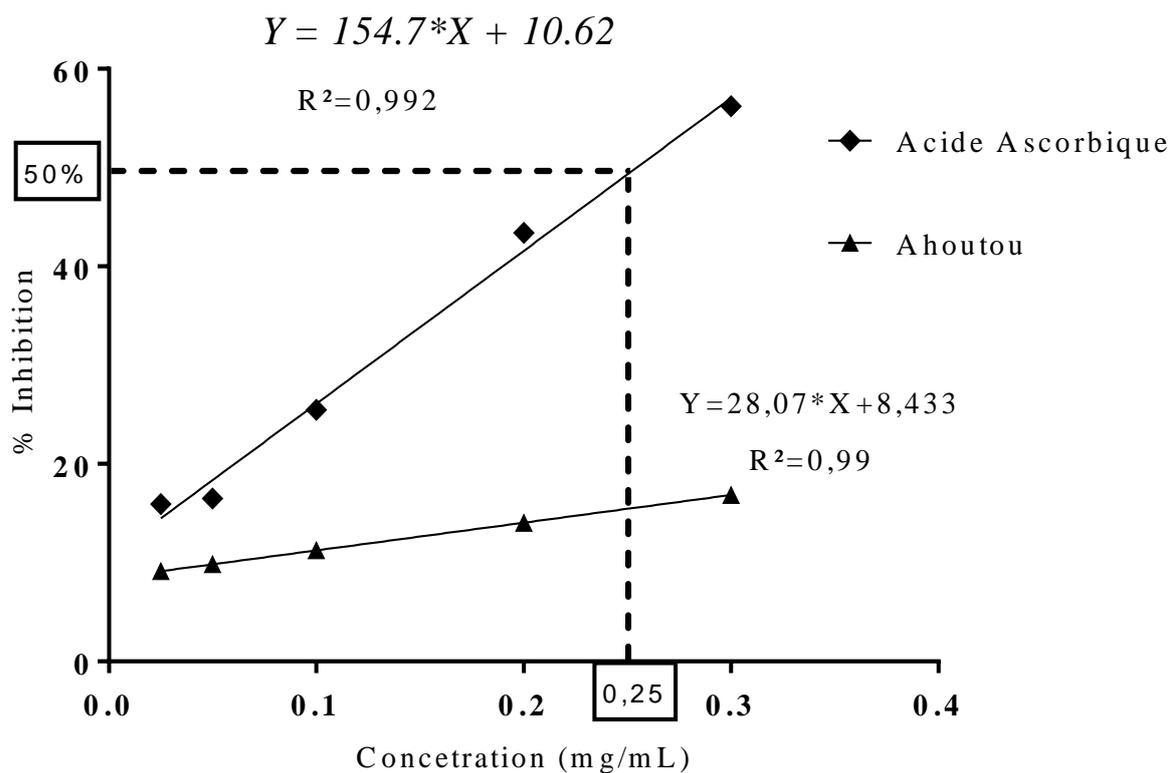
Quelle est la durée du traitement?

Comment conservez-vous le médicament?

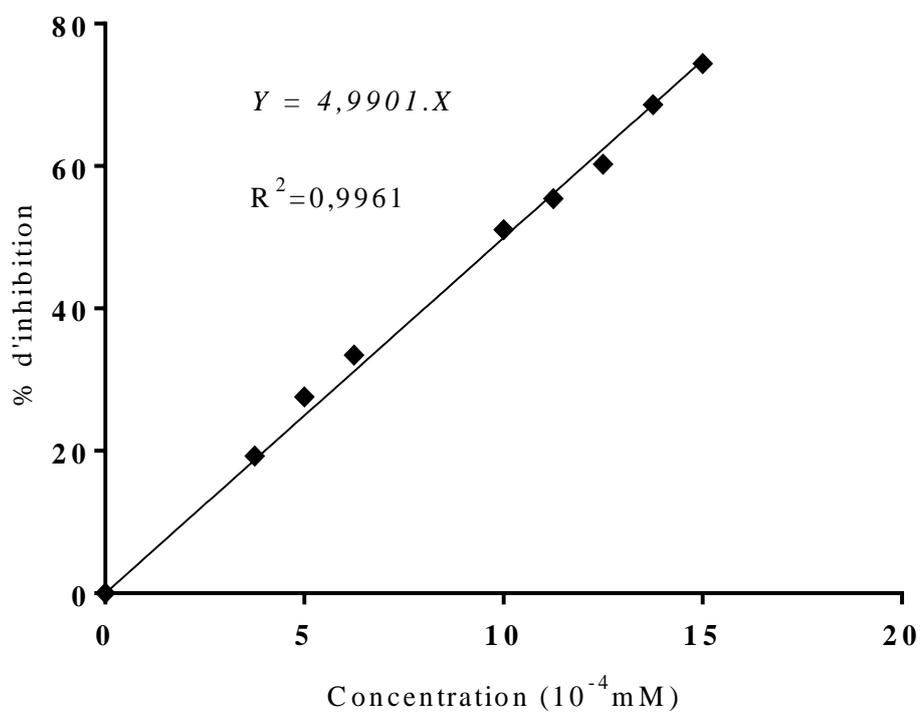
Avez vous déjà conseillé ce médicament à vos proche?

Si Oui pourquoi?

ANNEXE : 2

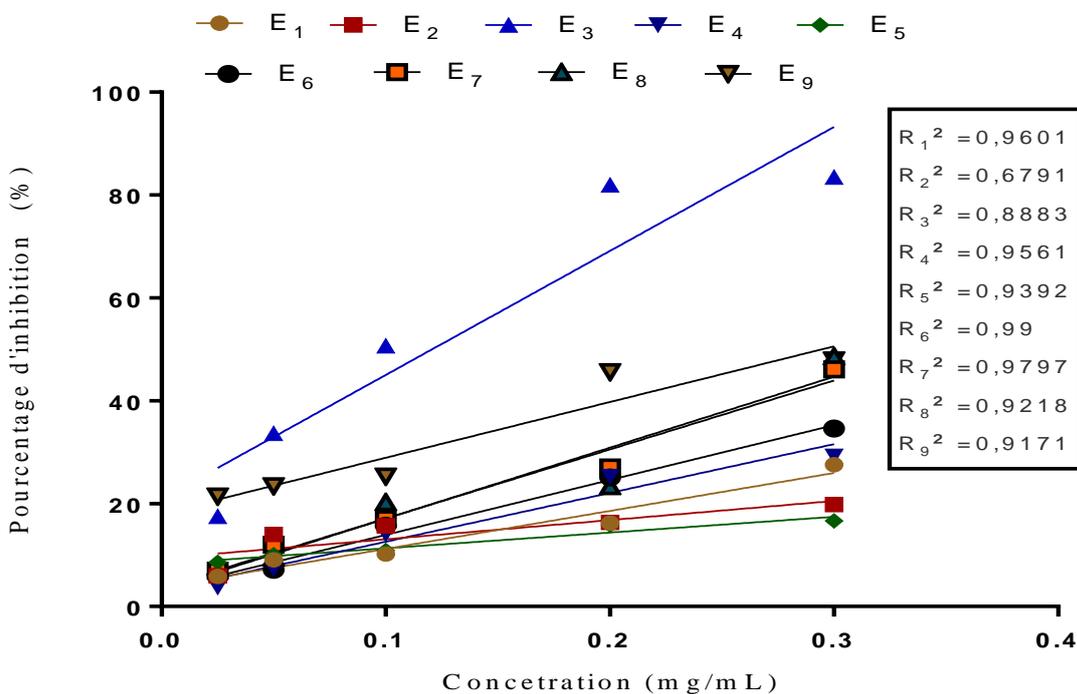


A2.1 : Inhibition du DPPH par l'acide ascorbique et Ahoutou

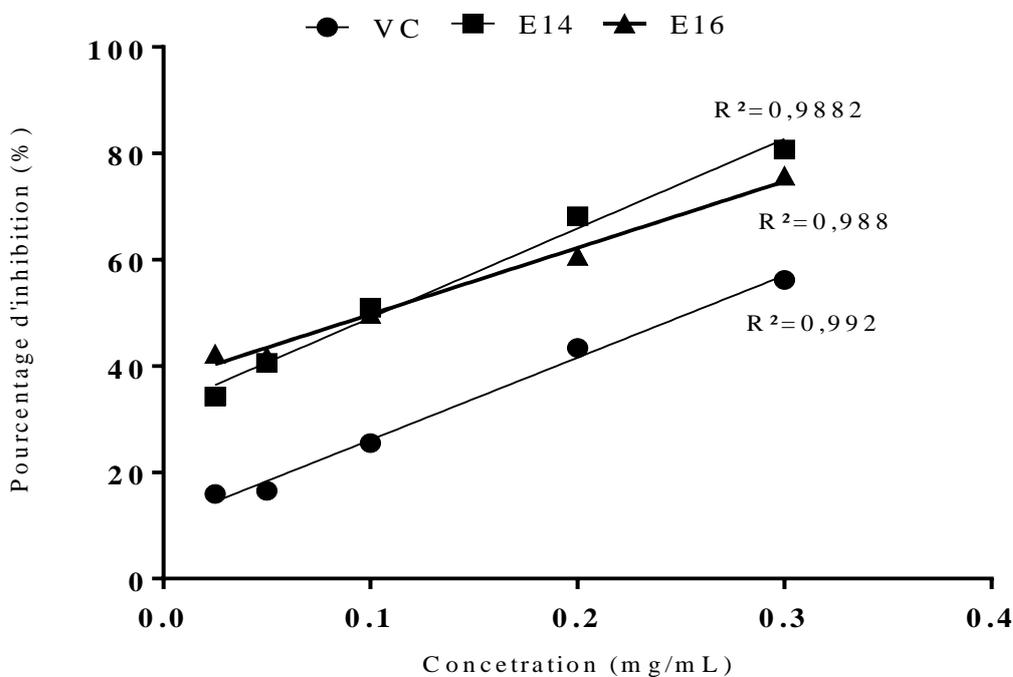


A2.2 : Courbe d'étalonnage du Trolox (ABTS)

ANNEXE : 3

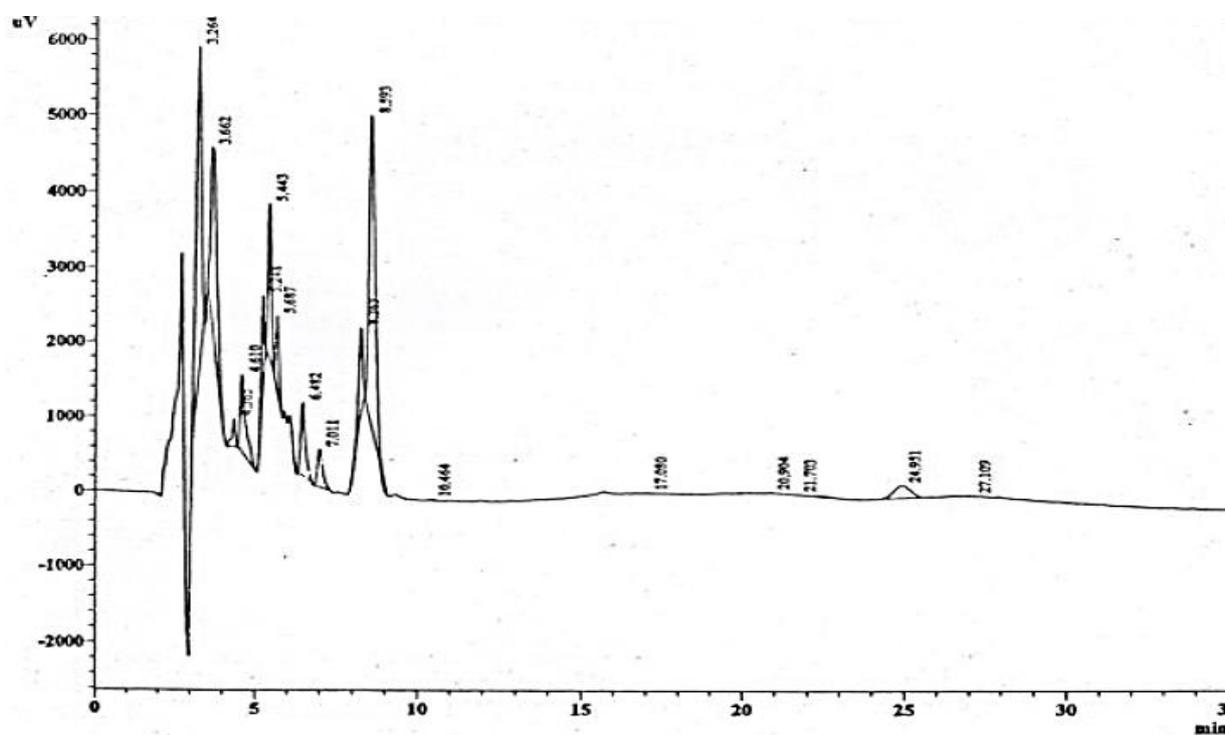


A3.1 : Evolution du pouvoir inhibiteur des extraits de plantes étudiées en fonction leur concentration



A3.2 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des extraits hydroéthanoliques étudiés

## ANNEXE : 4



**A4.1** : Chromatogramme des standards des composés phénoliques

Acide gallique (3,264min), glycoside flavonoïque (3,66min), Acide caféique (4,365min), Kaempferol (4,610min), myricétine (5,428min), Quercétine (5,443min), génistéine (5,687min), Resvératrol (6,482min), Naringénine (7,011min), Catéchine (8,263min), Epicatéchine (8,593min), Cyanidine (10,464min), Quinine (17,080min), Codéine (20,904min), Morphine (21,703min), Atropine (24,951) et Cortisol (27,109min)

# **COMMUNICATIONS**

**01** : Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica*, *Cymbopogon citratus* et *Psidium guajava*.

**Auteurs** : Bohui Gouegoui Serge Pacôme, Adima Amissa Augustin, Niamké Bobelé Florence, N'Guessan Jean David

**Lieu** : 1<sup>ère</sup> Journée Scientifiques du Département de Formation et de Recherche en Génie Chimique et Agro-Alimentaire de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny, du 12 au 13 avril 2018, Yamoussoukro - Côte d'Ivoire.

**02** : Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*.

**Auteurs** : Bohui Gouegoui Serge Pacôme, Adima Amissa Augustin, Niamké Bobelé Florence, N'Guessan Jean David

**Lieu** : 19<sup>ème</sup> Journée Scientifique annuelle de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM), du 14 au 17 Août 2018, Lomé - Togo.

**03** : Optimisation d'une méthode d'extraction des flavonoïdes totaux extraits des feuilles de plantes d'*Azadirachta indica*, de *Cymbopogon citratus* et de *Psidium guajava* utilisées pour traiter le paludisme

**Auteurs** : Bohui Gouegoui Serge Pacôme, Adima Amissa Augustin, Akmel Djedjro Clément, Niamké Bobelé Florence, N'Guessan Jean David

**Lieu** : 20<sup>ème</sup> Journée Scientifique annuelle de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM), du 06 au 09 Août 2019, Bamako- Mali.

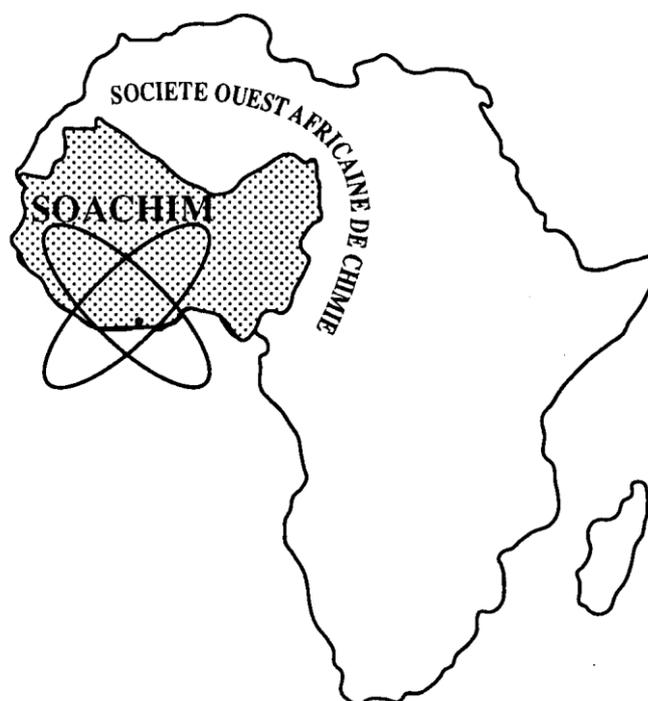
# **PUBLICATION**

*Etude comparative de trois méthodes  
d'extraction des flavonoïdes totaux à partir  
des feuilles de plantes médicinales :  
Azadirachta indica et Psidium guajava*

**Pacôme Serge Gouegoui Bohui, Augustin Amissa Adima,  
Florence Bobelé Niamké, Jean David N'Guessan**

*Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*

*J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*(2018), 046 : 50 - 58  
23<sup>ème</sup> Année, Décembre 2018



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>

# Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*

Pacôme Serge Gouegoui Bohui<sup>1</sup>, Augustin Amissa Adima<sup>1</sup>, Florence Bobelé Niamké<sup>1</sup>, Jean David N'Guessan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Procédés Industriels, de synthèse de l'Environnement et des Energies Nouvelles, (LAPISEN), Groupe de recherche en chimie de l'eau et substances naturelles, BP 1313 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, UFR Biosciences-Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

(Reçu le 07/09/2018 – Accepté après corrections le 22/01/ 2019)

**Résumé :** L'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés d'intérêt. Elle est influencée par plusieurs facteurs notamment la méthode utilisée et la présence de substances interférentes. Il s'agit de comparer trois méthodes d'extraction par l'évaluation des teneurs en flavonoïdes totaux et des activités antioxydantes des extraits des feuilles d'*Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. Les taux d'extraction sont déterminés à partir de trois méthodes d'extraction à savoir la macération, l'infusion et la décoction. Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits obtenus ont été déterminées à partir d'une méthode spectrophotométrique et l'activité antioxydante a été quantifiée par la méthode du DPPH. Les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés par la décoction avec une moyenne de 16,3% et 19,3% respectivement pour *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. Cependant, l'infusion et la macération restent de bonnes méthodes d'extraction pour les deux plantes. La décoction est la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes totaux qui représentent 6,73 mg EQ/mL pour *Azadirachta indica* et 8,1 mg EQ/mL pour *Psidium guajava*. Concernant l'activité antioxydante, les extraits obtenus par décoction présentent l'activité antioxydante la plus importante indépendamment des plantes étudiées. Cette étude montre que l'extraction par décoction est la meilleure méthode pour extraire les flavonoïdes et obtenir la plus forte capacité antioxydante des extraits étudiés.

**Mots clés :** Méthode d'extraction, DPPH, Flavonoïdes, *Azadirachta indica*, *Psidium guajava*

## Comparative study of three methods for extracting total flavonoids from the leaves of medicinal plants: *Azadirachta indica* and *Psidium guajava*

**Abstract:** Extraction is a very important step in the isolation and recovery of compounds of interest. It is influenced by several factors including the method used and the presence of interfering substances. The aim of this study is to compare three methods of extraction by assessing total flavonoid contents and antioxidant activities of leaves' extracts of *Azadirachta indica* and *Psidium guajava*. The extraction rates are determined from three extraction methods, namely maceration, infusion and decoction. The total flavonoid contents of the extracts obtained were determined using a spectrophotometric method and antioxidant activity was quantified using the DPPH method. The best extraction yields are recorded by decoction, with 16.3% for *Azadirachta indica* and 19.3% for *Psidium guajava*. However, infusion and maceration remain good extraction methods for both studied plants. Decoction therefore seems the best method for the extraction of total flavonoids (6.73 mg EQ/mL) for *Azadirachta indica* and (8.1 mg EQ/mL) for *Psidium guajava*. Concerning antioxidant activity, extracts obtained by decoction present the most important antioxidant activity independently of the studied plants. This study shows that extraction by decoction is the best method to extract flavonoids and obtain the highest antioxidant capacity of the extracts studied.

**Keywords:** extraction method, DPPH, Flavonoids, *Azadirachta indica*, *Psidium guajava*

---

<sup>1</sup> Auteur correspondant : Bohui Gouegoui Serge Pacôme : [gouegoui.bohui@inphb.ci](mailto:gouegoui.bohui@inphb.ci)

## 1. Introduction

L'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique à travers le monde est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès de la population et cela malgré les progrès de la médecine moderne. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale a recours à la médecine dite traditionnelle pour faire face à ses problèmes de santé<sup>[1]</sup>. Cet engouement s'explique par le fait que de nombreuses maladies sont traitées de manière satisfaisante et à moindre coût par les plantes. Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique aux substances, dites actives qu'elles renferment. Pour évaluer l'activité biologique de ces plantes, il est impératif de recourir à des tests biologiques appropriés et à des méthodes de screening chimique adaptés<sup>[2]</sup>. Dans la plupart des cas, l'activité biologique des métabolites secondaires est reconnue bien avant la détermination de leurs structures chimiques<sup>[3]</sup>. Cependant, ces composés peuvent engendrer des effets bénéfiques, aussi bien que des effets néfastes, sur les organismes vivants. *Azadirachta indica* et *Psidium guajava* sont deux plantes médicinales largement utilisées par la population ivoirienne, voire africaine notamment dans la médecine traditionnelle. La valeur thérapeutique de ces plantes est due à ses métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques. Les composés phénoliques (principalement flavonoïdes, acides phénoliques et tannins) constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique<sup>[4]</sup>. L'extraction de principes actifs de ces métabolites est une étape très importante dans leur isolement, aussi bien que dans leur identification<sup>[5]</sup>. La qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé<sup>[4]</sup>. Parmi les divers procédés utilisés, on compte la macération aqueuse, l'infusion et la décoction. L'extraction par décoction est un procédé utilisé traditionnellement par la population ivoirienne, soit dans la préparation de boissons comme le thé ou dans les préparations traditionnelles à base de plantes médicinales. L'objectif visé par ce travail est de comparer trois méthodes d'extraction de deux plantes couramment utilisées dans la médecine traditionnelle :

*Azadirachta indica* et *Psidium guajava*, par l'évaluation de leurs taux d'extraction, de leurs teneurs en flavonoïdes totaux et leur activité antioxydante.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de trois plantes de *Azadirachta indica* et *Psidium guajava* Linn. Les feuilles ont été récoltées dans le mois de mars 2018 à Yamoussoukro (Côte d'Ivoire) et séchées à l'abri du soleil pendant dix (10) jours. Après 10 jours, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et réduites en poudre. Leur identification botanique a été confirmée par M. N'GUESSAN Amani, taxonomiste au laboratoire de botanique du département Agriculture et Ressources Animales de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro (INP-HB).

### 2.2. Extraction

Les extraits obtenus à partir de poudres ont été préparés selon les procédés classiques de préparation d'extraits utilisés en milieu villageois que sont l'infusion, la décoction et la macération. Cela a permis d'obtenir des extraits aqueux.

#### 2.2.1. Décoction

Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée. L'ensemble a été maintenu en ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 50°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures. Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé.

#### 2.2.2. Infusion

Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée bouillante. L'ensemble a été maintenu pendant 30 minutes jusqu'au refroidissement. Après filtration, le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 50°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures. Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé.

#### 2.2.3. Macération aqueuse

Une prise d'essai de 10 g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100 mL d'eau distillée. L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 50°C. L'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures. Les essais ont été réalisés en triple. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé.

### 2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant le transfert du filtrat à évaporer)<sup>[6]</sup>.

Rendement (%) = ((Masse d'extrait sec) \* 100) / (Masse de la matière végétale).

### 2.4. Détection des composés phénoliques et des flavonoïdes

Le but de ces tests est la mise en évidence des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les six solutions aqueuses obtenues (après l'évaporation et avant l'étuvage). Le protocole de chaque test est comme suit :

#### 2.4.1. Détection des composés phénoliques (Réaction au FeCl<sub>3</sub>)

2 mL de chaque solution dans un tube à essai et ajouter quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10 %. La présence des composés phénoliques dans les extraits a été indiquée par l'apparition de la couleur vertenoirâtre.

#### 2.4.2. Mise en évidence des flavonoïdes

La mise en évidence des flavonoïdes a été effectuée selon le protocole décrit par Békro et al.<sup>[7]</sup> en y apportant quelques modifications. 2 mL de chaque phase aqueuse obtenue après chaque méthode d'extraction, ont été placés dans un tube à essai contenant de l'alcool chlorhydrique (4 mL éthanol + 1mL HCl concentré). Après ajout de 2 ou 3 copeaux de magnésium et l'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique, l'intensification d'une coloration rose-orange ou violacée a indiqué la présence de flavonoïdes.

### 2.5. Préparation des solutions

Les extraits secs ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée afin d'avoir des solutions aqueuses d'une concentration de 1 mg/mL pour tous les échantillons.

### 2.6. Dosage spectrophotométrique des flavonoïdes totaux

La méthode de Marinova *et al.*<sup>[8]</sup> a été utilisée pour le dosage des flavonoïdes totaux. Dans une fiole de 25 mL, 0,75 mL de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5% (m/v) a été ajouté à 2,5 mL d'extrait. Le mélange a été additionné de 0,75 mL de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10% (m/v), puis incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. Après l'incubation, 5 mL de soude (NaOH, 1N) ont été ajoutés puis le volume a été complété à 25 mL. Le mélange a été agité vigoureusement avant d'être dosé au spectrophotomètre Jasco V-530 (JASCO, Japon). La lecture a été faite à 510 nm. Les essais ont été réalisés en triple. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme par litre d'extrait équivalent quercétine (mg EQ/mL).

### 2.7. Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH

#### 2.7.1. Principe du test de DPPH

La méthode de Blois<sup>[9]</sup> a été utilisée avec quelques modifications pour la détermination du potentiel antioxydant. Cette méthode consiste à mesurer l'activité antiradicalaire par la technique de piégeage du radical au DPPH (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl). Le DPPH, (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ; PM= 394,33), est un radical libre stable soluble dans le méthanol (ou éthanol). D'une couleur violette intense, il présente un maximum d'absorbance à 517 nm. Lorsqu'une molécule antioxydante réduit le radical DPPH, la couleur violette disparaît rapidement pour donner une couleur jaune pâle.

#### 2.7.2. Réduction du radical libre DPPH par dosage spectrophotométrie

L'activité antioxydante des extraits *in vitro* a été testée selon la méthode de Blois<sup>[9]</sup> a été utilisée avec quelques modifications. Le test est effectué selon les étapes suivantes :

## Préparation des extraits et de l'acide ascorbique

Les extraits aqueux secs et l'acide ascorbique (antioxydant de référence) dissous dans le méthanol à une concentration de 1 mg/mL ont été dilués à différentes concentrations croissantes (0,025-0,050,1-0,2-0,3 mg/mL).

### Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH a été solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution d'une concentration de  $6,34 \cdot 10^{-5}$  M (0,0025g DPPH dans 100 mL méthanol). La solution obtenue a été conservée à l'abri de la lumière.

### Détermination du potentiel antioxydant

La détermination de pouvoir antioxydant est basée sur la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant. Le spectrophotomètre UV-Visible de marque Jasco V530 (JASCO, Japon) a été calibré à l'aide d'un blanc constitué de méthanol pur à une longueur d'onde de 517 nm. 1950  $\mu$ L de la solution du DPPH, a été ajoutée à 50  $\mu$ L de chaque extrait et de l'acide ascorbique préparé dans les mêmes conditions des extraits à tester. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à la température ambiante (25°C) dans le noir, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance des extraits testés a été lue à 517 nm contre celle d'un blanc qui ne contient que la solution méthanolique de DPPH. L'activité antiradicalaire des extraits testés correspondant au pourcentage d'inhibition (PI) du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$PI (\%) = \frac{(A_0(\text{Absorbance du blanc}) - A(\text{Absorbance de l'extrait})) * 100}{A_0(\text{Absorbance du blanc})}$$

Ou  $A_0$  est l'absorbance du témoin négatif ; ce dernier contient du DPPH et du méthanol sans

extrait. La concentration d'inhibition  $IC_{50}$  (mg/mL) qui correspond à la concentration de l'extrait des feuilles où l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé.

### 2.8. Analyse statistique

La représentation graphique des données a été réalisée grâce au logiciel Graph Pad Prism 5.0 et Microsoft office Excel 2016. La valeur moyenne est accompagnée de l'erreur standard sur la moyenne (Moyenne  $\pm$  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 ont été effectués.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques permettent de mettre en évidence l'existence des composés phénoliques et flavonoïdes dans la matière végétale broyée des feuilles de *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. Deux tests préliminaires ont été réalisés: il s'agit de la réaction au  $FeCl_3$  et la réaction à la cyanidine. Les résultats de ces deux tests sont représentés dans le tableau I.

Les résultats obtenus nous indiquent clairement la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits des deux plantes

**Tableau I :** Mise en évidence des composés phénoliques et flavonoïdes

Extraits	Mode d'extraction	Flavonoïdes	Polyphénols
<i>Azadirachta indica</i>	Macération	+	+
	Infusion	+	+
	Décoction	+	+
<i>Psidium guajava</i>	Macération	+	+
	Infusion	+	+
	Décoction	+	+

(+) : Présent ; (-) : Absent

quel que soit le mode d'extraction. Cela est caractérisé par une réponse positive au test de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) et au test à la cyanidine respectivement pour les composés phénoliques et les flavonoïdes. Les composés phénoliques se sont confirmés par l'apparition d'une coloration

vert-noirâtre et les flavonoïdes par une coloration orange. Ce résultat est en accord respectivement avec celui de Mondal et al.<sup>[10]</sup> sur *Azadirachta indica* et celui de Biswas et al.<sup>[11]</sup> sur *Psidium guajava*.

### 3.2. Etude comparative des techniques d'extraction des flavonoïdes

Dans cette étude, nous avons utilisé trois méthodes d'extraction : la macération en milieu aqueux, l'infusion et la décoction. Au total, nous avons obtenu six extraits secs avec lesquels les différents tests ont été effectués. L'étude comparative des ces trois méthodes d'extraction a porté sur : Le rendement d'extraction, le dosage quantitatif des flavonoïdes totaux et l'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits.

#### 3.2.1. Extraction des plantes

A partir des deux plantes sélectionnées, six extraits ont été obtenus. Le tableau II indique les rendements obtenus pour chaque extrait de plante.

**Tableau II :** Rendements d'extraction des extraits obtenus à partir des feuilles de *Azadirachta indica* et *Psidium guajava* à différents modes d'extraction

Plantes	Rendement d'extraction (%)		
	Par décoction	Par infusion	Par macération
<i>Azadirachta indica</i>	16,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	14,30 ± 0,23 <sup>b</sup>	15,10 ± 0,15 <sup>b</sup>
<i>Psidium guajava</i>	19,30 ± 0,35 <sup>a</sup>	15,90 ± 0,28 <sup>b</sup>	15,50 ± 0,28 <sup>c</sup>

Les résultats des rendements sont exprimés en moyenne ±SD, n=3 pour chaque extrait.

Les rendements d'extraction des deux plantes étudiées par les trois méthodes d'extraction sont présentés dans la figure 2. Il ressort de cette figure que :

- Pour *Azadirachta indica*: le meilleur rendement d'extraction des trois méthodes utilisées, est la décoction avec un taux d'extraction moyen de 16,30 %, suivi de la macération avec 15,10% et de l'infusion avec 14,30%. Statistiquement, la décoction ne diffère pas significativement de la macération, l'infusion quant à elle, ne diffère pas significativement de la macération. Cependant, la méthode d'extraction par décoction diffère significativement de l'extraction par macération. Cette différence entre la macération et les deux autres méthodes d'extraction pourrait être due au temps

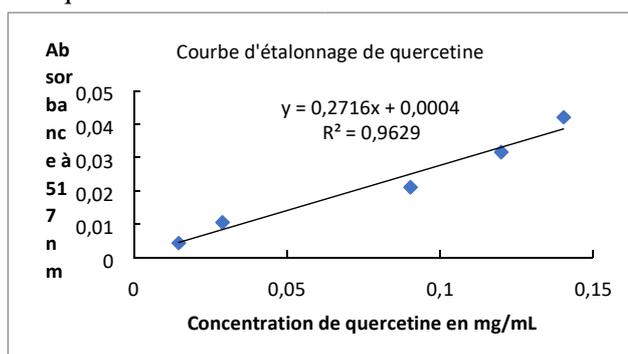
d'extraction, qui est long dans le cas de la macération (24 heures) par rapport aux autres méthodes. Ce résultat concorde avec celui de Mahmoudi Souhila et al.<sup>[5]</sup> sur l'étude d'Artichaut et similaire à celui de Konkon et al.<sup>[12]</sup>, lors de l'étude de l'identification des groupes de constituants chimiques présentant un intérêt pharmacologique, ils ont testé trois modes d'extraction à savoir la décoction, l'infusion et la macération. Ils ont trouvé que la méthode d'extraction par décoction du point de vue qualitative, est aussi efficace que les autres méthodes d'extraction (macération et infusion).

- Concernant *Psidium guajava*, le meilleur rendement d'extraction des trois méthodes utilisées, est la décoction avec une moyenne de 19,3 % suivi de l'infusion et de la macération avec en moyenne 15,9% et 15,50% respectivement. Statistiquement, il y a une différence significativement entre la méthode d'extraction par décoction et les deux autres méthodes notamment de l'infusion et la macération (P<0,05). Toutes fois l'infusion et la macération restent une bonne méthode d'extraction et enregistrent les mêmes rendements car elles ne diffèrent significativement (P>0,05). Le résultat trouvé par Lehout et al.<sup>[14]</sup> sur l'étude de *Artemisia herba* diffère de la nôtre, il a plutôt trouvé que c'est l'infusion qui enregistre le rendement le plus élevé suivi de la décoction et la macération.

#### 3.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux et calcul des rendements en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme étalon (Figure 1). Elle est exprimée en mg d'équivalent de quercétine par mL d'extrait.

Les résultats du dosage des teneurs en flavonoïdes et les calculs des rendements en flavonoïdes sont indiqués dans le tableau III.



**Figure 1** : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

**Tableau III** : Teneur en flavonoïdes dans différentes parties des extraits par décoction et par macération (mg EQ/mL).

Plantes	Teneur en flavonoïdes (mg EQ / mL)		
	Par décoction	Par infusion	Par macération
<i>Azadirachta indica</i>	6,73 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,67 ± 0,04 <sup>a</sup>
<i>Psidium guajava</i>	8,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,62 ± 0,02 <sup>b</sup>	7,80 ± 0,01 <sup>c</sup>

Les résultats des teneurs en flavonoïdes sont exprimés en moyenne ±SD, n=3 pour chaque concentration.

-Ce résultat pourrait être dû au temps d'extraction. En effet, le temps est très long dans le cas de la macération (24 heures) par rapport à la décoction (30 min) et pourrait entraîner la dégradation de certaines substances naturelles comme les flavonoïdes. Ce résultat diffère de celui trouvé par Mahmoudi Souhila et *al.*<sup>[5]</sup> sur l'étude d'Artichaut. Ils ont montré que la macération serait préférable pour extraire les flavonoïdes par rapport à la décoction. Cependant, la décoction et la macération semblent être préférables pour extraire les flavonoïdes par rapport à l'infusion. Cela est matérialisé par la différence significative observée des deux méthodes d'extraction (la décoction et la macération) avec l'extraction par infusion (P<0,05).

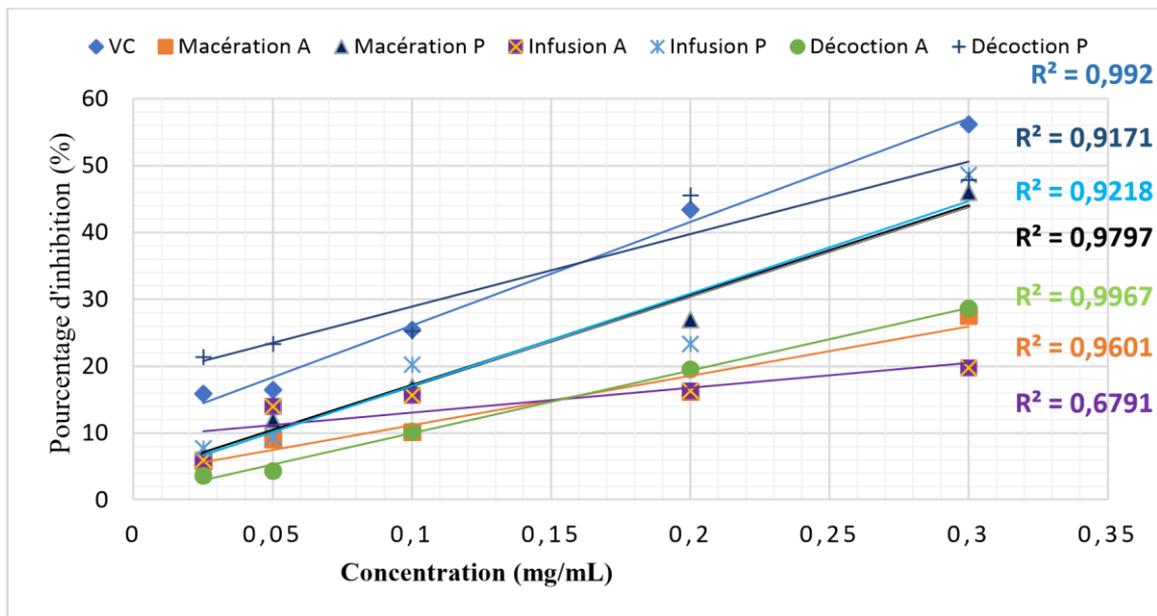
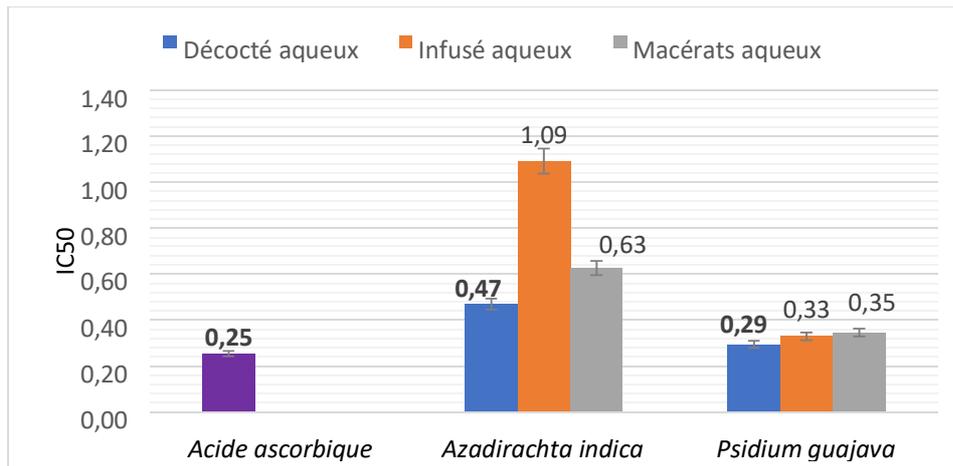
- Pour *Psidium guajava*, les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux du décocté, de l'infusé et du macérat obtenu par les trois modes d'extraction montrent que la décoction est préférable pour extraire les flavonoïdes à savoir une moyenne de 8,10 mg EQ/mL contre 7,90 mg EQ/mL en moyenne pour l'infusion suivie de la macération avec une moyenne de 7,60 mg EQ/mL. Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes totaux en fonction des différentes méthodes d'extraction est hautement significative (P<0,01). Cette différence pourrait s'expliquer par le temps d'extraction, qui est long dans le cas de la macération (24 heures) par rapport aux autres méthodes (30 min).

En effet, selon Rhazi et *al.*,<sup>[15]</sup> la prolongation du temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et pourrait entraîner la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols et les flavonoïdes. Ce résultat diffère de celui de Mahmoudi Souhila et *al.*<sup>[5]</sup> sur l'étude

d'Artichaut qui ont trouvé que la macération serait préférable pour extraire les flavonoïdes par rapport à la décoction.

#### **4. Réduction du radical libre 2,2-Diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH) par dosage spectrophotométrique**

La détermination du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la concentration en acide ascorbique (substance de référence) et des extraits testés a été effectuée à partir des courbes illustrées par la figure 2. La valeur de l'IC<sub>50</sub> trouvée pour l'acide ascorbique est égale à 0,25 mg/mL. Les résultats de la réduction du radical DPPH par tous les extraits sont illustrés par la figure 3. D'après les résultats, la décoction présente l'activité antioxydante la plus importante indépendamment des plantes étudiées. Cela justifierait l'intérêt de cette technique d'extraction par les tradipraticiens lors de l'utilisation de ces plantes pour se soigner, car les extraits obtenus sont sources d'activités antioxydantes.



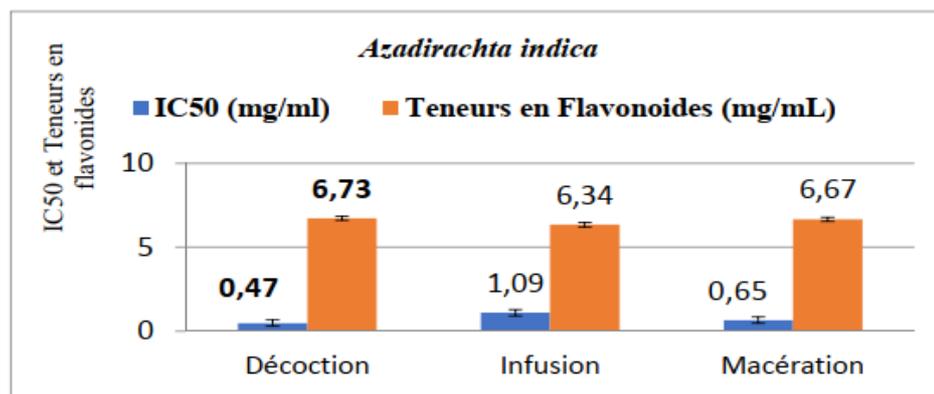
**Figure 2 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en acide ascorbique et des extraits étudiés

**Figure 3 :** Histogrammes représentant les valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits avec l'acide ascorbique

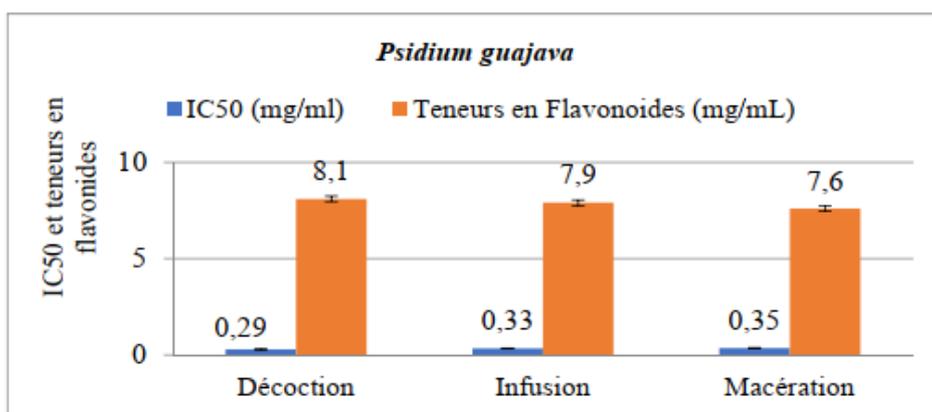
**5. Variations de l'activité antioxydante et teneur en flavonoïdes totaux à différents modes d'extraction chez *Azadirachta indica* et *Psidium guajava***

Les variations de l'activité antioxydante et de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits aqueux

des feuilles de *Azadirachta indica* et de *Psidium guajava* sont illustrées par les figures 4 et 5. Il ressort à travers l'observation des figures 4 et 5 que l'extraction par décoction est la meilleure méthode pour extraire les flavonoïdes et obtenir la plus forte capacité antioxydante des extraits étudiés.



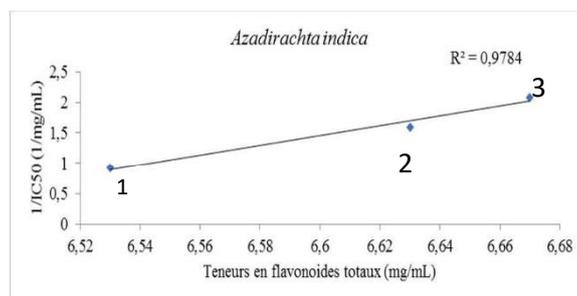
**Figure 4 :** Histogrammes montrant l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles de *Azadirachta indica* à différents modes d'extraction



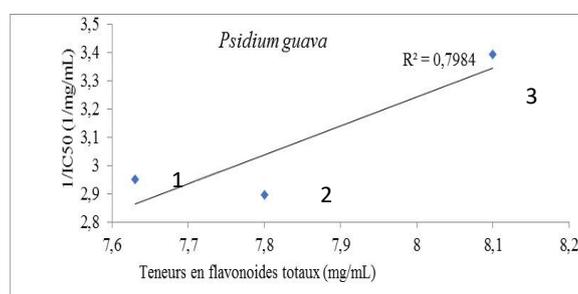
**Figure 5 :** Histogrammes montrant l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes dans l'extrait aqueux des feuilles de *Psidium guajava* à différents modes d'extraction

## 6. Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante de ces plantes

Les figure 6 et figure 7 montrent qu'il existe une bonne corrélation linéaire entre les teneurs en flavonoïdes et les activités antioxydantes des extraits issus des différents modes d'extraction chez les deux plantes étudiées à savoir *Azadirachta indica* ( $R^2=0,9784$ ) et *Psidium guajava* ( $R^2=0,7984$ ). Cela laisse suggérer que les flavonoïdes sont des contributeurs majeurs dans l'activité antioxydante.



**Figure 6 :** Corrélation entre l'activité antioxydante chez *Azadirachta indica* et le teneur en flavonoïdes (1 : Macération, 2 : Infusion, 3 : Décoction)



**Figure 7 :** Corrélation entre l'activité antioxydante chez *Psidium guajava* et le teneur en flavonoïdes. (1 : Macération 2 : Infusion, 3 : Décoction)

## 7. Conclusion

Le présent travail avait pour but de faire une étude comparative de trois techniques d'extraction des flavonoïdes contenus dans deux plantes médicinales, *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. Il s'agit, en l'occurrence, de l'extraction par macération aqueuse à température ambiante pendant 24 heures, l'extraction par infusion, pendant 30 min, et l'extraction par décoction, pendant 30 min. La comparaison porte sur le rendement d'extraction en flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antioxydante.

Du point de vue phytochimique, ces deux plantes médicinales sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes, comme en témoigne l'apparition de coloration vert-noirâtre et orange, par addition de  $FeCl_3$  et de cyanidine, respectivement. Les résultats de l'étude comparative montrent que le rendement d'extraction de ces composés le plus élevé a été obtenu par la décoction chez les deux plantes, suivi par la macération et l'infusion chez *Azadirachta indica*, puis de l'infusion et la macération chez *Psidium guajava*.

Au niveau de l'activité anti radicalaire, elle diffère en fonction de l'extrait. Ainsi, l'extraction par décoction est en accord avec son meilleur rendement d'extraction.

Cette étude montre que de la méthode d'extraction par décoction est la meilleure méthode d'extraction rapport aux deux autres méthodes pour extraire les flavonoïdes et obtenir la plus forte capacité anti oxydante des extraits aqueux obtenus chez les deux plantes. Néanmoins, ce résultat, obtenu pour *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*, reste à confirmer pour les autres plantes médicinales.

## Bibliographies

- [1] OMS. Fact sheet on traditional medicine. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> (2008). Consulté le 15 juin 2015 à 09 heures.
- [2] Tyihák E., Móricz ÁM., G.Ott P., Biodetection and Determination of Biological Activity of Natural Compounds in Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press (2007).
- [3].Sofowera A., Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris (2010):384.
- [4].Nkhili E., Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Université Cadi Ayyad - Marrakech, (2009).
- [5].Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N., Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*cynara scolymus* l.). Nature & technologie. b- sciences agronomiques et biologiques (2013); N° 09 35.
- [6]. Mohammedi Z., Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Tlemcen: Université Abou Bakr Belkaïd, (2005).
- [7].Békro YA., Boua BB., Bi FHT., Ehile EE., Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. Et *Zarucchi* (Caesalpinaceae). Sciences et Nature (2007);4:217.
- [8]. MARINOVA D., RIBAROVA F., ATANASSOVA M., Total phenolics in bulgarian Fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy (2005);40:255.
- [9].Blois MS., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26 1(958):1199.
- [10].Mondal D., Mondal T., A Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective. Res. J. Recent Sci (2012);1:94. [11].Biswas B., Rogers K., McLaughlin F., Daniels D., Yadav A., Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. International Journal of Microbiology 2013;(2013):7
- [12]. Konkon NG., Simaga D., Adjoungova A., Etude phytochimique de *mitragyna inermis* (willd.) o. ktze (rubiceae), plante a feuille antidiabetique. Pharm Méd Trad Afr (2006);14:73.

## Résumé

Le recours aux recettes à base des plantes médicinales dans le traitement du paludisme est assez fréquent en Côte d'Ivoire. Parmi ces recettes figure « Ahoutou », décocté d'un mélange de feuilles de trois plantes est l'une des plus utilisées du village de « Djahakro ». L'objectif général de cette thèse est de contribuer à la valorisation des plantes médicinales en proposant une formulation améliorée de la recette « Ahoutou ». L'étude a consisté à apporter d'une part des bases scientifiques, phytochimiques, pharmacologiques et toxicologiques, à l'utilisation thérapeutique traditionnelle de cette recette et d'autre part à optimiser les vertus thérapeutiques attribuées à cette recette pour lutter efficacement contre le paludisme. Pour ce faire, les études phytochimiques de l'extrait Ahoutou ont été effectuées. L'activité antioxydante de l'extrait a été évaluée en utilisant le test de DPPH et de l'ABTS. Ensuite l'activité antiplasmodiale *in vitro* a été réalisé sur des isolats cliniques et sur la souche de référence de *P. falciparum* Dd2 en utilisant le test de SYBR green I. Quant à l'optimisation, elle a conduit à un protocole d'extraction pouvant influencer les conditions opératoires d'extractions des polyphénols (flavonoïdes). Ainsi plusieurs extractions par décoction, infusion et macération à partir des différentes permutations des proportions des broyats des feuilles des trois plantes pendant 5 min, 25 min et 45 min ont été effectuées. Les conditions d'extraction ont été optimisées en utilisant l'outil statistique des plans d'expérience. L'extrait obtenu (optimisé) a subi les mêmes analyses physico-chimiques et biochimiques que l'extrait Ahoutou. Aussi, une analyse chromatographique HPLC a été réalisé sur les extraits Ahoutou et optimisé. Afin d'évaluer les dangers biologiques qui seraient liés à l'utilisation de ces recettes, la toxicité aiguë et subaiguë de ces extraits a été évaluée sur des rats wistar. Les résultats des études phytochimiques ont montré la présence des familles chimiques bioactives (flavonoïdes, polyphénols, Alcaloïdes etc...). Par contre l'évaluation de la capacité antiplasmodiale *in vitro* a présenté une réponse modérée ( $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ) sur les isolats cliniques et la souche de référence de *Plasmodium falciparum* Dd2. Les résultats de l'optimisation ont permis d'améliorer le rendement d'extraction et de stabiliser la recette à un pH constant. Ces résultats ont montré également que les teneurs totales respectivement en polyphénols et en alcaloïdes de l'extrait optimisé sont plus élevées que celles de l'extrait Ahoutou. Les tests de l'activité antiplasmodiale de l'extrait optimisé ont montré des effets prometteurs ( $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$ ) sur les souches chloroquinorésistantes selon l'échelle de classification des substances naturelles. L'analyse chromatographie a montré que la quinine, un antipaludique de référence, est présent à une teneur plus élevée dans l'extrait amélioré par rapport à l'extrait Ahoutou. On note également la présence de certains composés polyphénoliques importants tels que la catéchine, l'acide gallique et la quercétine qui sont d'une part des antioxydants puissants ayant également des propriétés modulatrices et régulatrices du système immunitaire. Enfin, les tests de la toxicité aiguë effectués ont montré que les extraits d'Ahoutou et améliorés sont non toxiques ( $DL_{50} > 2000 \text{ mg/kg PC}$ ). En outre, l'étude de la toxicité subaiguë a montré que les extraits améliorés et d'Ahoutou, administrés aux doses 60, 120 et 180 mg/Kg de poids corporel par voie orale pendant 28 jours, ne sont pas toxiques pour les organes vitaux des rats. Au terme de cette étude, les résultats enregistrés lors de cette étude ont permis de proposer la mise au point d'une formulation : 10% *Azadirachta indica* + 20% *Cymbopogon citratus* et 70% *Psidium guajava* capable d'être utilisée comme remède amélioré dans la lutte contre le paludisme.

**Mots clés :** Ahoutou, Antioxydant, Optimisation, Activité antiplasmodiale, Toxicité subaiguë

## Abstract

The use of herbal recipes in the treatment of malaria is quite common in Côte d'Ivoire. Among these recipes is "Ahoutou", made from a mixture of leaves of three plants, which is one of the most widely used recipes in the village of "Djahakro". The general objective of this thesis is to contribute to the valorisation of medicinal plants by proposing an improved formulation of the "Ahoutou" recipe. The study consisted in providing scientific, phytochemical, pharmacological and toxicological bases for the traditional therapeutic use of this recipe and in optimizing the therapeutic virtues attributed to this recipe to fight effectively against malaria. To do this, phytochemical studies of Ahoutou extract were carried out. The antioxidant activity of the extract was evaluated using the DPPH and ABTS test. Then *in vitro* antiplasmodial activity was performed on clinical isolates and on the reference *P. falciparum* Dd2 strain using the SYBR green I assay. As for optimization, it has led to an extraction protocol that can influence the operating conditions for extracting polyphenols (flavonoids). Thus several extractions by decoction, infusion and maceration from the different permutations of the proportions of the crushed leaves of the three plants for 5 min, 25 min and 45 min were carried out. The extraction conditions were optimized using the statistical design of experiment tool. The extract obtained (optimized) underwent the same physico-chemical and biochemical analyses as the Ahoutou extract. Also, an HPLC chromatographic analysis was performed on the Ahoutou extracts and optimized. In order to assess the biological hazards that would be associated with the use of these recipes, the acute and sub-acute toxicity of these extracts was evaluated in wistar rats. The results of phytochemical studies have shown the presence of bioactive chemical families (flavonoids, polyphenols, alkaloids etc...). In contrast, the *in vitro* evaluation of antiplasmodial capacity showed a moderate response ( $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ) on clinical isolates and the reference strain of *Plasmodium falciparum* Dd2. The results of the optimization improved the extraction yield and stabilized the recipe at a constant pH. These results also showed that the total polyphenol and alkaloid contents respectively of the optimized extract are higher than those of the Ahoutou extract. Tests of the antiplasmodial activity of the optimized extract showed promising effects ( $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/mL}$ ) on chloroquinorésistant strains according to the classification scale of natural substances. Chromatographic analysis showed that quinine, a reference antimalarial drug, is present at a higher level in the improved extract compared to the Ahoutou extract. We also note the presence of some important polyphenolic compounds such as catechin, gallic acid and quercetin which are powerful antioxidants that also have modulating and regulatory properties of the immune system. Finally, the acute toxicity tests carried out have shown that Ahoutou and enhanced extracts are non-toxic ( $LD_{50} > 2000 \text{ mg/kg PC}$ ). In addition, the sub-acute toxicity study showed that the enhanced and Ahoutou extracts, administered at doses of 60, 120 and 180 mg/kg body weight orally for 28 days, were not toxic to the vital organs of rats. At the end of this study, the results recorded during this study made it possible to propose the development of a formulation : 10% *Azadirachta indica* + 20% *Cymbopogon citratus* and 70% *Psidium guajava* capable of being used as an improved remedy in the fight against malaria.

**Key words :** Ahoutou, Antioxidant, Optimization, Antiplasmodial activity, Subacute toxicity