MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE, SUPERIEUR (MESS)

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DE DEVELOPPEMENT RURAL (IDR)

MINISTERE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE L'INOVATION

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE

INSTITUT DE RECHERCHE EN SCIENCES DE LA SANTE (IRSS-DRO)

Année Universitaire : 2011-2012

MEMOIRE

Présenté par

Benjamin K. KOAMA

Thème

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE *IN VIVO* DE *CANTHIUM MULTIFLORUM* (SCHUMACH. & THONN.) HIERN (RUBIACEAE) CHEZ LA SOURIS NMRI INFESTEE PAR *Plasmodium berghei, ANKA*

Pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (D E A)

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)

Soutenu le 02 Avril 2013

Devant le jury :

Directeur de mémoire
Dr TRAORE/COULIBALY Maminata

Co-Directeur
Dr Yerbanga R Serge

Président
Pr Georges-Anicet OUEDRAOGO

Membres
Dr Zakharia BENGALY
Dr TRAORE/COULIBALY Maminata

Dédicace

- *A mon père **KOAMA Yemdegma** pour ta confiance et ton soutien inconditionnel*
- *A ma mère **KABORE Koudipoko Pauline** pour ta patience et ton soutien moral*
- *A mes oncles **KOAMA Lazare et KOAMA Jean Paul** pour votre soutien et vos conseils*
- *A mon ami et frère **ZONGO Ambroise** pour son sens de l'amitié et du combat commun*
- *A mon cousin **KOAMA Koudbi Clément** pour ses conseils et ses encouragements*
- *A la famille ZONGO pour son soutien et ses conseils*
- *A tous ceux qui d'une manière ou une autre ont contribué à l'aboutissement de ce travail*

.

Remerciements

Je remercie :

- **Professeur Jean Bosco Ouedraogo**, qui nous a permis de réaliser ce travail à la Direction Régionale de l'Ouest de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS/DRO). Merci vivement de m'avoir accueilli dans votre laboratoire.
- **Professeur Anicet Ouedraogo** pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements, ses enseignements et son assistance pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie également pour avoir accepté de juger ce travail.
- **Professeur Maminata TRAORE** pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements, ses enseignements et son assistance pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie également pour avoir accepté d'encadrer et de juger ce travail.
- **Docteur** Zakaria BENGALY pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements. Je vous remercie également pour avoir accepté de juger ce travail.
- **Docteur Serge YERBANGA**, pour ses enseignements, son encadrement, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements, sa convivialité et son assistance morale et matériel tout le long de ce travail.
- **Docteur Ollo DA**, pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements.
- **Aminata FOFANA, Souleymane TAMBOULA, Zakaria KABRE, Sibidou YOUGBARE, Dr Noufou Ouedraogo** pour leurs disponibilités, leur assistance morale tout le long de ce travail.
- tous les **enseignants-chercheurs, le personnel de l'IRSS**, l'administration pour leurs aides multiformes et les enseignements reçus lors de mes différents cycles de formation
- les **ainés**, pour leur participation active et pour leurs encouragements tout le long de ce travail. Trouvez ici nos vifs remerciements.
- tous mes camarades de DEA, en particulier Zango Sylvère, Patrick Dim dim Madinga pour leur collaboration et leur convivialité.
- tous mes camarades professeurs certifiés de Biochimie ; GUENNE Samson BOUGMA, Richard OUOBA, Edouard KONCOMBO, François TAPSOBA et tous les enseignants d'agro alimentaire du lycée professionnel de BOBO

- mes amies Milogo Alice, Kaboré Chantal, Esther LOMPO pour leurs soutiens multiformes
- tous les herboristes et tradithérapeutes de la ville de BOBO et environnent qui ont bien voulu partager leurs expériences avec nous.

Résumé

Canthium multiflorum (Schumach. & Thonn.) Hiern (Rubiaceae) appelé *Ladji Fofona* par les populations de la région de l'ouest du Burkina Faso, est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme simple.
L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vivo* chez des souris l'activité antiplasmodiale des extraits de feuilles de *Canthium multiflorum*.
Le test suppressive de 4 jours décrit par Peters et *al.* en 1975 a été réalisé en utilisant des souris, souche NMRI (Naval Medical Research Institute), âgées de 4 à 6 semaines avec un poids moyen de 25 ± 3g. A J0, les souris sont infectées par inoculation intrapéritoneale avec 10^7 globules rouges parasités par *Plasmodium berghei* (souche ANKA). Deux heures après l'infection, les souris par groupe de six sont traitées par voie orale avec 200µl d'extraits aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg de poids corporel par jour, de J0 à J3. La solution utilisée pour solubiliser les extraits aqueux et organiques a été administrée au groupe contrôle. A J4, des frottis sanguins sont réalisés avec le sang recueilli à la queue des souris et colorés au Giemsa 10%. La parasitémie de chaque groupe de souris traitées est déterminée par lecture au microscope et le pourcentage de réduction de la parasitémie calculé par rapport au groupe contrôle.
Comparativement à l'extrait au dichlorométhane, l'extrait éthanolique a donné les pourcentages de réduction de la parasitémie, les plus élevés 22,5 ; 30,8 et 81,9% respectivement aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg. Les extraits aqueux ont donné de faibles pourcentages de réduction de la parasitémie (<10%) à la dose de 100 mg/kg. Par contre, à la dose de 500 mg/kg, le décocté aqueux avait une activité antiplasmodiale significativement plus élevée (74,2%) que le macéré aqueux. L'activité antiplasmodiale (30,8%) enregistrée avec l'extrait éthanolique à la dose de 250 mg/kg était la plus élevée comparativement aux autres extraits à la même dose mais restait modérée de façon générale (DE50=267,73mg/kg pour l'extrait éthanolique).
Les tests de toxicité ont permis d'estimer la DL50 de l'extrait éthanolique à une valeur au moins supérieure à 25628,9 mg/kg. Il ressort alors que l'index thérapeutique (DL50/DE50) de l'extrait est très élevée (95,72). A l'issu de l'étude les extraits de *Canthium multiflorum* ont montré une activité antiplasmodiale modérée et une sécurité d'emploi en administration orale chez les souris.
Mots clés : *Canthium multiflorum* ; activité antiplasmodiale ; test *in vivo*, *P berghei*, souris NMRI, toxicité.

Abstract

The decoction of leaves of *Canthium multiflorum* (Schumach. & Thonn.) Hiern (Rubiaceae) is widely used for malaria treatment in western region of Burkina Faso. This study aimed to assess the *in vivo* antiplasmodial activities of *Canthium multiflorum* extracts on NMRI mice infected with *Plasmodium berghei* (ANKA strain). Crude water and organic leaves extracts of the plant where prepared. Experiment was performed in NMRI mice (aged 6 weeks old and weighing 25±2g) according to the 4 days suppressive test described by Peters et *al.* 1975. At day 0, mice were inoculated intraperitoneally with 10^7 red blood cells parasitized with *Plasmodium berghei* (ANKA stain). Two hours post infection, the treatment was carried out by using six mice per treatment group. Mice were treated orally with 200µl of experimental solution once a day starting from day 0 to day 3 with following doses of the extracts 100, 250 and 500 mg/kg bw. The control group received only the distilled water used to dissolve the extracts. On day 4 post infection, blood smears obtained from the tail of the mice, were fixed with methanol and stained with Giemsa 10%. The parasitemia for each group is recorded and the percentage suppression of parasitemia calculated with respect to the parasitemiae of the control group.

The results showed a dose dependant inhibition of parasites by the plant extracts event if the level of inhibition was found weak to moderate. The percentage reduction of parasitemia was around 2.4 % at 250 mg/kg for the dichloromethane extract while for the water extracts it was about 28.7 at the same dose. The ethanol crude extract, the most active (p=0.08) among the four tested extracts exhibited 22.5, 30.8 and 81.9% of reduction at 100, 250 and 500 mg/kg bw respectively.

The preliminary results have shown a moderated antiplamodial activity of ethanol extract of leaves of *Canthium multiflorum* (DE50=267,73mg/kg).

The acute toxicity (DL50) of the ethanolic extract of *Canthium multiflorum* was found higher than 25628.9 mg/kg bw. The calculated therapeutic index (TI) was very wide (95.5) giving strong evidence of the non toxicity of the ethanolic extract of *Canthium multiflorum* administrated by oral route.

Mots clés: *Canthium multiflorum ;* antiplasmodial activity; *in vivo* test ; *P. berghei,* toxicity

Liste des abréviations:

DCM : Dichlorométhane

DE50 : Dose Effet 50

DMNL: Dose maximale de non létalité

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

EtOH : Ethanol

ND : Non Déterminé

NMRI : Naval Medical Research Institute

PBS : Phosphate Buffered Saline

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme

CI50 : Concentration inhibitrice à cinquante pourcent.

Sommaire

Dédicace i

Remerciements ii

Liste des abréviations: vi

Liste des tableaux ix

I-Introduction 1

II- Objectifs 3

2.1. Objectif général 3

2.2. Objectif spécifiques 3

III Données bibliographiques 4

3.1. Définition 4

3.2 Ecologie du Plasmodium 4

3.3. Le cycle du plasmodium 4

3.4. Classification 5

3.5. Rappels sur la pathologie 6

3.5.1. Symptômes 6

3.5.2. Paludisme non compliqué 6

3.5.3. Paludisme grave ou compliqué 6

3.6. Traitement du paludisme par les molécules modernes 7

3.7. Le modèle *P. berghei* / souris NMRI 7

3.8 .Les plantes médicinales 7

3.8.1 Les métabolites secondaires des plantes 8

3.8.2. *Canthium multiflorum* 13

IV MATERIEL ET METHODES 16

4.1. Matériels 16

4.1.1. Matériel végétal 16
4.1.2. Matériel biologique 16
4.2. Méthodes 17
4.2.1. Extractions 17
4.2.2 Tests pharmacologiques pour la mise en évidence de l'activité antiplasmodiale 21
4.2.3. Recherche de l'extrait le plus actif 25
4.2.4. Détermination de la dose effet 50 de l'extrait le plus actif 25
4.2.5. Détermination de la toxicité des extraits 25
4.2.5.1 Dose létale 50 (DL50) 25
4.2.6. Analyses statistiques 26
V. Résultats 28
5.1. Extractions et rendements 28
5.2. Résultats des tests pharmacologiques 28
5.2.1 Activité antiplasmodiale 28
5.2.2. Extrait le plus actif 29
5.2.3. Dose effet 50 de l'extrait le plus actif 30
5.2.4. Toxicité de l'extrait le plus actif 31
VI. DISCUSSION 33
6.1-Etude des plantes et quelques résultats probants 33
6.2- Extractions et rendement 34
6.3-Toxicité des extraits – signes physiques de toxicité au cours des tests 34
6.4-Efficacité parasitologique de *Canthium multiflorum* 35
VII.CONLUSION & PERSPECTIVES 37
Annexe 43

Listes des figures, tableaux et photos

Listes des figures

Figure 1 : cycle du parasite (www.cdc;gov/malaria/biology/life_cycle.htm) 4

Figure 2:Photo de *Canthium multiflorum*,Tin ,juin 2012 14

Figure 3: acide 19α-hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic (1) & acide 15α,19α-dihydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic (2). 15

Figure 4: Diagramme global d'extraction ..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 5: Infection de souris, Avril 2012 23

Figure 6:Traitement oral des souris, Avril 2012 24

Figure 7:Photos de coloration des lames au Giemsa 24

Figure 8: Comparaison de l'activité antiplasmodiale des extraits testés 30

Figure 9: Courbe de détermination de la Dose Effet 50 de l'extrait éthanolique 31

Liste des tableaux

Tableau I: Répartition des souris pour chaque extrait 23

Tableau II: Rendements des extraits 28

Tableau III: Pourcentages de réduction de la parasitémie des extraits de feuilles de *C.multiflorum* 29

Tableau IV : Poids des souris 32

I-Introduction

Le paludisme est une maladie causée par des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à l'autre par des piqûres de moustiques du genre *Anophèles* infectés, appelés vecteurs du paludisme. Les principaux vecteurs en Afrique sont représentés par le complexe *Anopheles* qui regroupe *Anopheles Gambiae s.s, Anopheles arabiensis ; Anopheles melas, Anopheles merus, Anopheles bwambae, Anopheles quadriannulatus A et B, Anopheles funestus, Anopheles nili et Anopheles moucheti* (Githeko, Service et al. 1996). *Anopheles gambiae SS* est le plus important vecteur du paludisme (Githeko, Service et al. 1996).

Il existe cinq types de *Plasmodium* humain*: Plasmodium falciparum; Plasmodium vivax; Plasmodium malariae; Plasmodium ovale ; Plasmodium knowlesi. Plasmodium vivax* et *P. falciparum* sont les espèces les plus répandues. Mais *Plasmodium falciparum* reste le plus mortel (PNLP, 2011)
Le paludisme sévit de façon endémique dans les régions tropicales et subtropicales :
- de l'Afrique sub-saharienne (90% de la population atteinte),
- sur une grande partie du sous-continent indien, en Asie du Sud et en Océanie.
- dans les états d'Amérique centrale, ainsi que dans les pays d'Amérique du Sud *(OMS, 2011).*

L'intensité de la transmission du paludisme dépend de l'écologie du vecteur qui est déterminé par les changements climatiques, l'irrigation, l'agriculture périurbaine, les migrations et le degré d'efficacité des systèmes de santé (Marsh and Snow 1999; Sutherst 2004). La transmission est aussi dépendante du taux de personnes infectées (Traore 2008) et est plus intense dans les zones où les vecteurs ont une durée de vie relativement longue. Par exemple, la longue durée de vie et la forte préférence pour l'homme des espèces africaines de vecteurs expliquent que plus de 90% des décès par paludisme enregistrés dans le monde surviennent en Afrique (PNLP, 2011).

Le nombre de décès par paludisme s'est accrue considérablement avec l'apparition de *Plasmodium falciparum* résistant à la plupart des antipaludiques couramment utilisés comme la chloroquine, méfloquine, sulfadoxine –pyryméthamine (Guiguemde, Aouba et al. 1994; Sirima, Tiono et al. 2003; Tinto, Sanou et al. 2005; Beiersmann, Sanou et al. 2007).

Malgré cette résistance, la chimiothérapie reste la voix principale de lutte contre le paludisme, en témoigne le succès des antipaludiques comme la quinine extraite de la plante Chinchona et l'artemisinine extrait de *Artemisia annua*. L'historique et le succès de ces deux médicaments ont montré l'immense potentialité que représente la médecine traditionnelle dans la recherche de nouvelles molécules antipaludiques.

En Afrique, Les malades du paludisme sont préférentiellement traités à la maison par les plantes et les antipaludiques modernes (Beiersmann, Sanou et al. 2007) .

Mais, la cherté des antipaludiques moderne et l'insuffisance d'infrastructure sanitaire adéquate a amené la grande majorité de la population à se tourner vers la médecine traditionnelle comme premier choix dans le traitement du paludisme (Diallo, Graz et al. 2006) .

Malgré cet état de fait peu d'études cliniques ont été réalisées quand à l'évaluation de l'efficacité des antipaludiques de la médecine traditionnelle (Traoré *et al.*, 2008).

Un besoin urgent se pose donc pour beaucoup plus d'investigations dans la recherche de nouvelles molécules à partir de la médecine traditionnelle.

Des études menées au Burkina Faso sur les plantes médicinales locales ont démontré que certaines de ces plantes avaient une activité antiplasmodiale intéressante (Balin *et al* ,2002).

Des études ethnobotaniques menées au Burkina Faso en collaboration avec les traditérapeutes ont révélé que la plante qui fait l'objet de cette étude à savoir *Canthium multiflorum* (Schumach. & Thon.) Hiern (Rubiaceae) est beaucoup utilisée dans la médecine traditionnelle comme fébrifuge et pour le traitement du paludisme (Aké Assi et Guinko, 1991, Nacoulma, 1996, Burkill, 1997)

Les investigations précliniques *in vitro* ont montré que *C. multiflorum* avait une activité antiplasmodiale et bactéricide (Traoré *et al*, 2008b, Akomo *et al*, 2009).

Le screening phytochimique de *Canthium multiflorum* a révélé la présence de saponosides, tanins ; flavonoïdes ; alcaloïdes ; coumarines ; terpènes ; caroténoïdes etc....(Traore 2008; Akomo, Zongo et al. 2009). Un sesquiterpène, le 3-oxo-15-alpha,19-alpha-dihydroxy-ursa-1,12-dien-28-oic isolé de l'extrait actif au

dichlorométhane avait montré une activité modérée (IC_{50} 26 µg/ml) *in vitro* sur la souche 3D7de *Plasmodium falciparum* (Traore, Jaroszewski et al. 2008).

La présente étude est la poursuite des investigations sur la plante pour confirmer l'activité antipaludique des extraits de la plante *in vivo* dans le model animal.

II-Objectifs

2.1. Objectif général

Evaluer l'activité antipaludique *in vivo* chez les souris NMRI des extraits de feuilles de *C. multiflorum*.

2.2. Objectif spécifiques

1. Déterminer l'activité antiplasmodiale *in vivo* sur *P. berghei* des extraits de la plante
2. Déterminer la dose effet 50 (DE_{50}) de l'extrait le plus actif
3. Déterminer la toxicité de l'extrait le plus actif pour établir son indexe thérapeutique

III Données bibliographiques

3.1. Définition

Les Plasmodiums sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des Sporozoaires et à l'ordre des Haemosporideae. Trois espèces sont exclusivement humaines: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax et Plasmodium ovale.* Les espèces *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* sont humaines et simiennes.

3.2 Ecologie du Plasmodium

L'écologie de *P. falciparum* a été assez étudiée. C'est un parasite qui se développe suivant un cycle complexe (Figure1). Le cycle du Plasmodium implique deux hôtes, l'homme, hôte intermédiaire, héberge la multiplication asexuée ou schizogonique du parasite. Le moustique du genre Anopheles est l'hôte définitif chez lequel s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonique.

La phase asexuée érythrocytaire consiste à l'infestation des globules rouges par des mérozoïtes libérés après la multiplication asexuée hépatique. Les mérozoïtes effectuent un cycle du parasite appelé cycle asexué érythrocytaire. L'éclatement des globules rouges pour libérer de nouveaux mérozoïtes déclenche les accès de fièvre caractéristiques de la maladie.

3.3. Le cycle du plasmodium

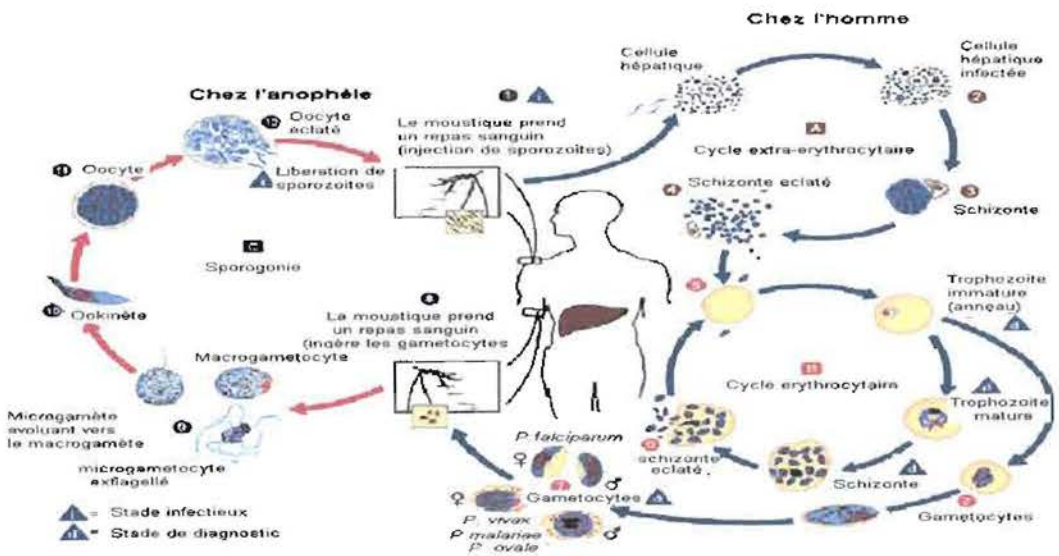


Figure 1 : cycle du parasite (www.cdc;gov/malaria/biology/life_cycle.htm)

Pendant le repas sanguin l'Anophèle femelle infecté inocule les sporozoïtes à l'hôte humain❶. Les sporozoïtes infectent les cellules du foie❷ et deviennent des schizontes après maturation❸, qui libèrent après rupture des mérozoïtes ❹. Chez *P.vivax* et *P. ovale* on note un stade dormant appelé hypnozoïte qui peut persister dans le foie pendant des semaines ou même des années). Après cette multiplication initiale dans le foie (exo-érythrocytaire schizogonique 🅰), le parasite amorce une multiplication asexuée dans les érythrocytes (phase érythrocytaire schizogonique 🅱).).Les mérozoïtes infectent les globules rouges. ❺. Les trophozoïtes se différentient en schizontes et libèrent des mérozoïtes lors de la rupture❻. Certains parasites se différentient en gamétocytes❼La phase érythrocytaire du parasite est responsable de la manifestation clinique de la maladie. Les gamétocytes mâle (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes sont ingérés par l'Anophèle pendant son repas sanguin ❽. La multiplication des parasites chez le moustique se fait par un cycle sporogonique🅲. Dans l'estomac du moustique les microgamétocytes pénètrent dans les macrogametocytes pour donner des zygotes❾. Les zygotes deviennent mobiles et s'allongent (ookinetes)❿ qui envahissent l'œsophage du moustique et se développent en oocystes⓫. Les oocystes s'accroissent se rompent et libèrent les sporozoïtes ⓬, qui cheminent jusqu'aux glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes seront inoculés❶ chez l'hôte humain perpétuant ainsi le cycle du parasite.

3.4. Classification

Règne : Protozoaire (protiste)

Embranchement : Apicomplexa

Classe : Sporozoaire (Haemosporidea)

Sous-classe : Coccidiasina

Ordre : Eucoccidies (Haemosporida)

Sous-ordre : Haemosporina

Famille : Plasmodidae

Genre : *Plasmodium*

3.5. Rappels sur la pathologie

3.5.1. Symptômes

La période d'incubation, délai entre l'infection et l'apparition des manifestations cliniques, dure en moyenne 12 jours mais peut varier entre 9 jours et 12 mois selon l'espèce. La phase hépatique est asymptomatique, les signes cliniques sont liés à la phase de Schizogonie érythrocytaire. Les manifestations cliniques dépendent de l'espèce plasmodiale en cause, de l'immunité de l'hôte, de la parasitémie et de divers autres facteurs.

3.5.2. Paludisme non compliqué

C'est la forme la plus fréquente. *Toutes les espèces* peuvent être responsables de paludisme simple ou non compliqué. La fièvre est toujours présente et souvent associée à divers symptômes : syndrome pseudo-grippal (asthénie, algies multiples, céphalées) et digestif (vomissements et parfois diarrhées).
La primo-invasion apparaît chez des sujets non immunisés c'est-à-dire des enfants de 4 mois à 6 ans en zone d'endémie et des adultes non immunisés. L'accès palustre ou accès à fièvre périodique, est la forme classique chez les sujets adultes immuns. Cette forme peut évoluer avec des phases de rémission et recrudescence. Chez les sujets faiblement immunisés, il existe à tout moment un risque de passage à la forme grave ou compliquée (WHO, 2000).

3.5.3. Paludisme grave ou compliqué

Le paludisme grave est essentiellement un paludisme à *Plasmodium falciparum.* Si cette forme peut être retrouvée à tout âge, quelque soit le sexe, elle est plus souvent rencontrée chez les enfants de moins de cinq ans.

Le paludisme grave peut apparaître de façon brutale, parfois foudroyante, avec une fièvre, des convulsions et un coma qui constituent la triade symptomatique caractéristique. L'évolution de cette forme dépend de la rapidité et de la qualité de la prise en charge. En l'absence de traitement, la mort survient en deux ou trois jours (WHO ,2000).

3.6. Traitement du paludisme par les molécules modernes

Pour faire face au risque d'une résistance de *P. falciparum* aux monothérapies et pour améliorer l'issue du traitement, les combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) sont désormais recommandées par l'OMS pour le traitement du paludisme simple à *P.falciparum*. Le traitement est administré par voie orale et les CTA recommandées sont : l'Artemether + Lumefantrine, l'Artesunate + Amodiaquine, l'Artesunate + Mefloquine, l'Artesunate + sulfadoxine-pyriméthamine, Dihydroartemisinine + Piperaquine (OMS, 2006)

En cas de paludisme grave, le traitement de première intention recommandé est l'Artesunate ou l'Artemether, ou la Quinine par voie intra musculaire ou intra veineuse (OMS, 2006).

3.7. Le modèle *P. berghei* / souris NMRI

Plasmodium berghei est l'une des nombreuses espèces parasites des rongeurs. Les souris albinos NMRI sont des animaux consanguins d'expérimentation. Le model *P. berghei* /souris NMRI est un des modèles utilisés dans les études expérimentales sur le paludisme. Les études ont montré que ce parasite avait beaucoup de similitude avec le Plasmodium humain : similitudes de structure, physiologique et du cycle de vie (Diggs, Aikawa et al. 1977). Malgré ces similitudes de petites différences subsistes. Par exemple il existe une variation au niveau de certaines protéines de surface qui permettent l'invasion des globules rouges. Le cycle du *Plasmodium berghei* implique deux hôtes, un rongeur, hôte intermédiaire, héberge la multiplication asexuée ou schizogonique du parasite. Le moustique du genre Anophèles est l'hôte définitif chez lequel s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonique.

L'un des vecteurs de ce parasite est *Anophèles stephensi.*

3.8 .Les plantes médicinales

Les plantes ont toujours été d'une grande importance pour la survie de l'humanité, pour l'alimentation, la protection et surtout le traitement des douleurs et maladies.

De nos jours, la recherche scientifique a permis d'isoler les différents principes actifs des métabolites secondaires des plantes et de moderniser l'utilisation médicinale des plantes. En médecine moderne, 25% des molécules pharmaceutiques dérivent des plantes ou sont des dérivés synthétiques de composés extraits de plantes (Vitalini, Tome *et al.* 2009).

3.8.1 Les métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques très diversifiés issus de la transformation des produits du métabolisme chez les plantes pour les protéger contre les divers agresseurs extérieurs et permettent aussi les interactions synécologiques. Ils sont très variables d'une plante à l'autre et dépendent des conditions écologiques, édaphiques et climatiques. On distingue trois principaux groupes : les composés phénoliques, les terpenoïdes et les alcaloïdes.

3.8.1.1. Composés phénoliques

a) Les acides phénols

Le terme acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.
Les acides phénols sont antibactériens, antifongiques à l'égard des organismes phytopathogènes et participent chez de nombreuses graines aux mécanismes d'inhibition tégumentaire (Bruneton, 1993).

b) Les tanins

Ce sont des composés hydrosolubles ayant la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines telles que les glycoprotéines salivaires, les protéines du lait, la cellulose et les pectines, ainsi que les métaux lourds. Ils sont abondants dans les organes végétaux jeunes.
Sur le plan chimique et biochimique on distingue deux types de tanins :
-les tannoïdes ou tanins hydrolysables sont des polymères de l'acide gallique (tanins galliques) ou de l'acide ellagique (tanins ellagiques). Ils sont caractéristiques des Angiospermes dicotylédones.

-les tanins vrais, non hydrolysables sont des polymères de certains flavanols tels que les catéchines ou catéchols et les proanthocyanidols qui donnent par ébullition des composés insolubles amorphes et de couleur rouge appelées phlobaphènes ou rouges de tanins.

Les propriétés des tanins sont liées à leur astringence et au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules (enzymes, albumines, gélatine, pectines, alcaloïdes, caséine, protéines fongiques ou virales). En favorisant la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, les tanins raffermissent, tonifient la peau dans certains cas de rides (Nacoulma, 1996). Certains tanins peuvent induire l'apoptose (mort programmée de la cellule par fragmentation de l'ADN) de certaines cellules leucémiques humaines (Sakagami *et al*, 1995).

c) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi-universels des végétaux, responsables de la coloration des fleurs, fruits et parfois des feuilles. On peut les classer en composés jaunes (flavanols, flavones, chalcones, aurones) et les anthocyanosides rouges, bleus ou violets (selon le pH).

Les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. Ceux qui imprègnent les bois de cœur ont des propriétés fongicides et insecticides qui protègent le végétal contre les champignons et les insectes. Ils sont d'une grande importance écologique car en donnant leur couleur aux fleurs et aux fruits ils participent aux processus de pollinisation et de dispersion.

Ils ont des propriétés vitaminiques P, potentiellement veino-actifs et diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Ils sont anti-inflammatoires, anti-allergiques, antibactériens, inhibiteur de certaines enzymes et piégeurs de radicaux libres (Bruneton, 1993).

Les génines des flavonoïdes sont, pour la plupart solubles dans les solvants organiques apolaires tandis que les formes hétérosidiques le sont dans les solvants moyennement polaires.

d) Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka (*Dipteyx odorata* Willd., Fabaeae) d'où fut isolée, en 1820, une coumarine. Elles sont rependues dans les racines et les écorces des angiospermes. Comme tous les autres dérivés phénylpropaniques, les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via l'acide *p*-coumarique. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques et les formes hétérosidiques sont plus ou moins hydrosolubles (Bruneton, 1993). Elles ont un spectre UV caractéristique ; une fluorescence variant du bleu au vert à 365nm (Ciulei, 1982). Les coumarines sont anticoagulantes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiradicalaires, veinotonique et vasculoprotecteur (Bruneton, 1993).
Dans le domaine de l'activité antivirale, il a été montré que les coumarines Calanolide A et Inophyllum, représentent une nouvelle sous-classe de composés non nucléosidiques, ayant un fort pouvoir anti-transcriptase reverse (Jassim & Naji, 2003). Les furanocoumarines sont douées de propriétés antivirales sur des virus à ARN et à ADN, par photoinactivation (Hudson, 1995). La coumarine est également utilisée dans le traitement adjuvant du lymphoedème post-mastectomie, en complément des méthodes de contention. Son action antioedématique résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages. Le 4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophényl)-3-oxobutyl], coumarine usuellement appelée acénocoumarol, est antagoniste de la vitamine K et inhibiteur de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamino-K-dépendants. Ses propriétés anticoagulantes sont utilisées dans la thérapie des maladies thromboemboliques (Bruneton, 1993). Les coumarines assurent également la protection de l'organisme humain contre l'oxydation de l'acide linoléique (Kaneko *et al.* (2003).

3.8.1.2 Terpénoïdes et stéroïdes

Ce sont des métabolites spécifiques aux végétaux dont le précurseur commun est le mévalonate. Tous les terpènes et les stéroïdes sont formés par un assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques (Bruneton, 1993). L'unité isoprénique ou 2-methyl -1,3-butadiène à 5 atomes de carbone est à la base du concept de la règle

isoprénique énoncé en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et al.,1958 et Bloch et al., 1959

Les divers squelettes terpéniques sont classés par le nombre de chaînons isoprépiques qui les composent. Nous avons les classes suivantes :

Les monoterpènes en C10 (2 unités)(huiles essentielles ; oléorésines, les iridoïdes),

Les sesquiterpènes en C15 (3 unités) (huiles essentielles, les lactones sesquiterpéniques),

Les diterpènes en C20 (4 unités),

Les triterpènes et stéroïdes C30 (2 sesquiterpènes) (les hétérosides cardiotoniques, les saponosides),

Et les caroténoïdes en C40.

a) Les hétérosides cardiotoniques

Ce sont des glycosides cardiotoniques généralement d'origine végétale. En Afrique et en Asie, on les utilise dans la composition des poisons de flèches (poisons sagittaires) où on les associe fréquemment à d'autres cardiotoxiques et autres substances irritantes favorisant la diffusion tissulaire des principes toxiques. Ces composés sont exceptionnels chez les animaux bufadiénolides chez les crapauds, les lucioles et des cardénolides chez les lépidoptères (mites, papillons). Ils sont hydrosolubles et sont tous amers. Ce sont des composés toxiques pour l'homme et pour les animaux. Par leur amertume et leur toxicité, ils protègent la plante contre les prédateurs. Leurs propriétés « fortifiantes du coeur », connues depuis longtemps sont exploitées en thérapeutique pour les soins de l'insuffisance cardiaque. Ils sont cardiotoniques, sédatifs du système nerveux central et des toux rebelles, analgésiques, anesthésiques et améliorent la circulation rénale (Bruneton, 1993).

b) Les saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives: ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques et toxiques à l'égard des animaux à sang froid, principalement les poissons (Bruneton, 1993).

Autrefois, les gens se lavaient et nettoyaient leurs vêtements avec des pâtes et solutions de plantes riches en saponosides. En effet, ils sont antimycosiques

(mycoses digestives dues à *Candida albican*), antifongiques (psoriasis, eczéma, dermatophytes, maladie de la peau), antibiotiques (bactérie gram+), anti-inflammatoires, anthelminthiques, cicatrisants (Nacoulma, 1996).

Les saponosides assurent la défense du végétal contre les attaques microbiennes ou fongiques. Selon la nature de la génine, ces hétérosides peuvent être classés en deux grands groupes :

-Triterpéniques (alcools et acides triterpéniques); les plus nombreux.

-Steroïdiques (spirostanes, furostanes, solanines, solanidanes)

3.8.1.3. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIXe siècle pour designer les substances naturelles réagissant comme des alcalis (de l'arabe *al kali,* la soude et du grec *eidos*, l'aspect).

Par définition, un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétal), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées.

Les alcaloïdes sont des composés présents essentiellement chez les angiospermes, exceptionnellement chez certaines bactéries et rarement chez les champignons. Par leurs propriétés pharmacologiques, les alcaloïdes agissent :

-Au niveau du système nerveux central comme dépresseurs (morphine, scopolamine...) ou stimulants (strychnine, caféine...)

-Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétique (éphédrine) ou sympatholytique (yohimbine), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anti cholinergiques (atropine, hyoscyamine), ganglioleptiques (spartéine, nicotine).

Certains sont curarisants, anesthésiques locaux (cocaïne), antifibrillants (quinidine), anti tumoraux (vinblastine, ellipticine).

Toutes ces propriétés pharmacologiques conduisent à une importante utilisation des plantes pourvues d'alcaloïdes (Bruneton, 1993).

3.8.2. *Canthium multiflorum*

3.8.2.1. Classification

Règne : Végétal

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Gentianales

Famille : Rubiaceae

Genre : Canthium

Espèce : multiflorum

3.8.2.2. Description et distribution *de Canthium multiflorum*

Le nom local de *Canthium multiflorum* est Ladji fofana. Le genre Canthium représente près de 200 espèces reparties dans les régions tropicales d'Europe, en Afrique, en Asie et en Australie. *Canthium multiflorum* est un arbuste (Photo 1) qui porte des feuilles opposées et des fleurs au niveau des cymes axillaires. Elle est généralement bisexuée avec des petits fruits ronds ou lobés qui sont souvent colorés en orange ; rouge ou noir clair.

En Afrique, *C. mutiflorum* s'étend du Sénégal au Soudan, du Gabon à la république Centrafricaine. Elle se développe préférentiellement sur les sols latéritiques, au bord des rivières.

Au Burkina Faso, *Canthium multiflorum* se retrouve en grande proportion à l'Ouest.

Figure 2:Photo de *Canthium multiflorum*,Tin ,juin 2012

Source : site d'orodara, juin 2012

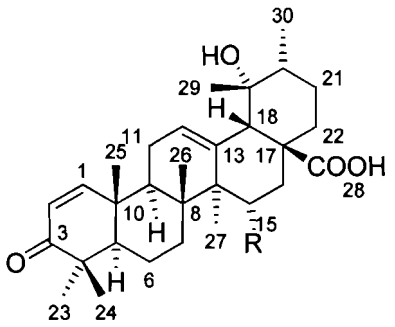
3.6.2.3. Utilisations traditionnelles

Le genre *Canthium* est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies comme la toux, le diabète et l'hypertension (Dongo *et al*, 1989). En Afrique de l'Ouest, *Canthium sp.* est utilisée dans le traitement de la fièvre, l'angine et les pharyngites. En Afrique Centrale, la plante est utilisée pour le traitement de la toux, la pneumonie et les bronchites (www.meta fro.be/prelude/view_plant).

3.8.2.4. Composés chimiques identifiés chez la plante

Des étude phytochimiques ont révélé une forte concentration des métabolites secondaires comme les saponosides, les tanins , les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les triterpènes (acide 3-oxo-15alpha,9alpha-dihydroxy-urs-1,12-dien-28oic et l'acide 3-oxo-9alpha-hydroxy-urs-1,12-dien-28oic) Traoré *et al* 2008b (Figure 3), les caroténoïdes (Traoré et al 2008b et Karou et al 2009), et des

coumarines (5,6,7trimethoxycoumrin ;6 ,7dimethoxcoumarin ;6-hydroxy-7-methoxycoumarin)



1 R = H, **2** R = OH

Figure 3: acide 19α-hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic (1) & acide 15α,19α-dihydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic (2).

3.8.2..5. Activité pharmacologique

Les extraits au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle des racines et feuilles de *Canthium multiflorum* testés *in vitro* contre *P. falciparum* ont montré une activité antiplasmodiale intéressante avec une CI_{50} de l'ordre de 7µg/ml (Traore 2008).

Les fractions pures isolées des extraits bruts actifs ont donné une activité antiplasmodiale inférieure à celle des extraits bruts. Parmi les molécules isolées, seul le triterpène l'acide 15α,19α-dihydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic a montré une activité inhibitrice modérée *in vitro* (CI_{50} = 26 µg/ml sur *P. falciparum* (Traore, Jaroszewski et al. 2008).

IV MATERIEL ET METHODES

L'étude a eu lieu au laboratoire de pharmacologie et de thérapeutique alternative de l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS), direction régionale de Bobo-Dioulasso

4.1. Matériels

4.1.1. Matériel végétal

4.1.1.1. Récolte

Les feuilles, les écorces de racines de *Canthium multiflorum* ont été collectées dans le village de Tin à quelques kilomètres d'Orodara en 2012. Les plantes ont été identifiées par un technicien en botanique et les échantillons conservés) à la station de Farakoba de l'INERA sous le numéro d'identification CM1-08 et CM2-12.

4.1.1.2. Séchage

Les échantillons de plantes prélevés sur le terrain ont été lavés pour être débarrassés d'éventuelles impuretés (poussière, débris végétaux). Le séchage a été fait sur un séchoir à l'ombre à l'abri des rayons solaires et de l'humidité. Les échantillons séchés ont ensuite été pulvérisés à l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement nettoyés. La poudre obtenue est pesée et conservée dans un emballage plastique à l'abri de la lumière et de l'humidité en attente des différentes extractions.

4.1.2. Matériel biologique

Les souris

Des souris albinos NMRI femelles de 3 mois ayant un poids de 25±3 grammes obtenues à l'animalerie du Centre International de Recherche Développement sur l'Elevage en Zone Subhumide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso ont été utilisées pour les tests. Pour l'ensemble des tests, les souris ont été gardées à une température de

25°C avec une alternance de la lumière et de l'obscurité toutes les 12 heures et nourries de façon adéquate.

Les parasites

P. berghei (souche ANKA) obtenue du MR4 (signification) est maintenue continuellement au laboratoire par un passage acyclique chaque semaine, de souris infectées à des souris saines à travers une injection de sang parasité. Un passage cyclique est réalisé tous les deux mois. Les moustiques *Anopheles stephensi* sont infectés lors de la prise de leur repas sanguin sur des souris infectées au stade gamétocytaire. Trois semaines après, des souris saines sont infectées par piqûres de moustiques préalablement infectés. Les moustiques infectés par *P. berghei* sont gardés à 19±1°C. Les colonies de moustiques sont maintenues à 30°C avec une humidité relative de 95% (Yerbanga et al., 2012).

4.2. Méthodes

4.2.1. Extractions

Nous avons réalisé des extractions solide-liquide par macération et ou par décoction. Les solvants utilisés étaient: l'eau distillée, l'éthanol, le dichlorométhane.

a)Macération

- Macéré aqueux

100 g de poudre de *feuilles de Canthium multiflorum* ont été extraits par 500 ml d'eau distillée à froid pendant 24 heures. Le mélange obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre pour récupérer l'extrait qui est conservé au congélateur en attendant la lyophilisation.

- **Extraits éthanoliques**

100 g de poudre de feuilles de *Canthium multiflorum* sont extraits par 500ml d'éthanol à froid pendant 24 heures. L'extrait obtenu par filtration est concentré et séché à l'aide du Rotavapor type Buchii.

- **Extrait au dichlorométhane**

100 g de poudre de feuilles de *C. multiflorum* sont extraits par 500ml de dichlorométhane à froid pendant 24 heures. Filtré à l'aide de papier filtre, l'extrait est ensuite concentré par évaporation.

b) Décoction

A 100g de poudre de feuilles de *C.multiflorum,* nous avons ajouté 500 ml d'eau distillée, puis le tout a été porté à ébullition pendant 10 à 15 minutes.

Après refroidissement le décocté est filtré à l'aide de papier filtre et le filtrat conservé au congélateur pour être lyophilisé plus tard.

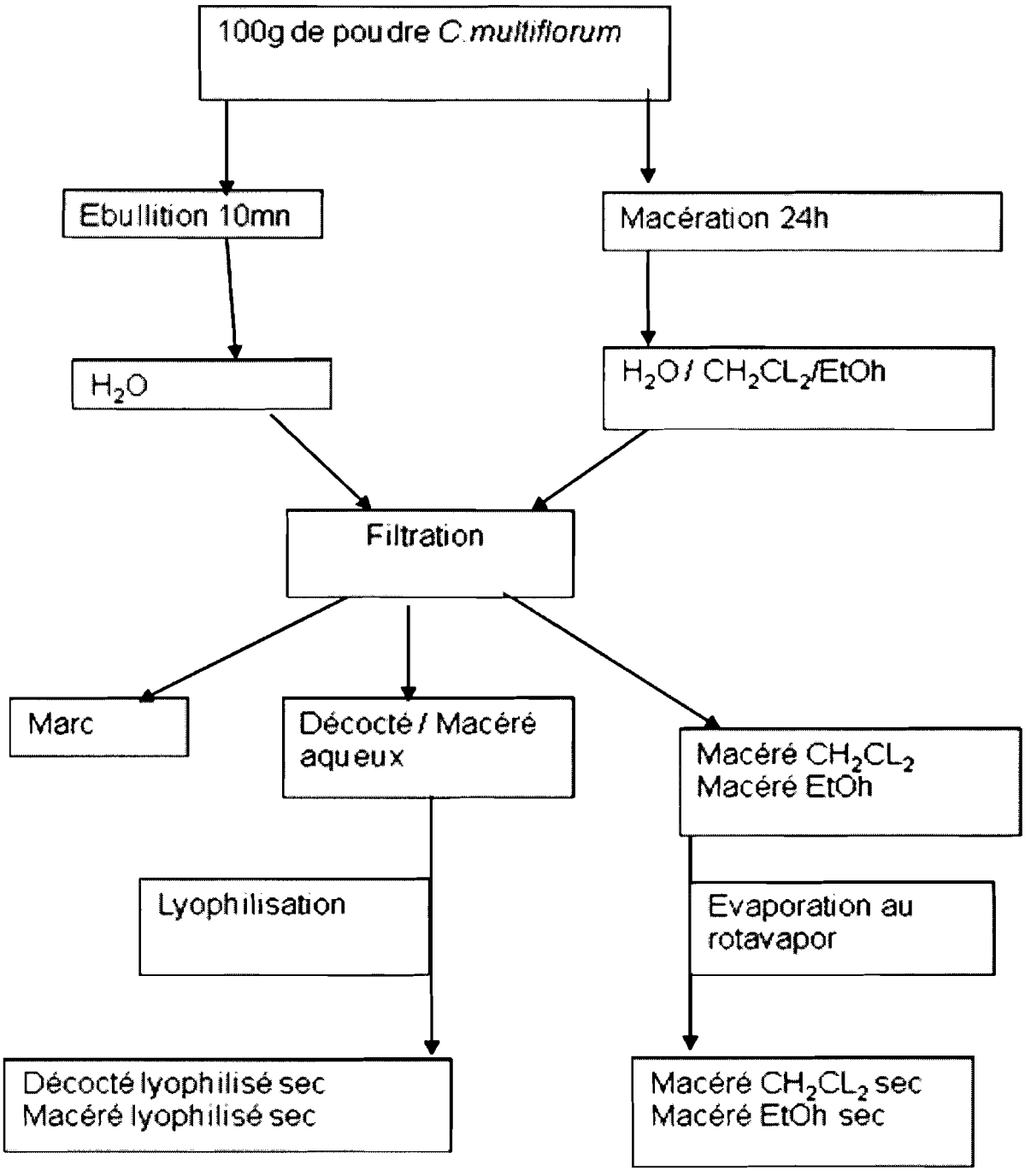


Figure 4: Diagramme global d'extraction

c) Concentration des extraits

Les extraits aqueux et organiques obtenus ont été concentrés, pesés pour calculer plus tard le rendement de chaque extraction ; et conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité. Différentes techniques de concentration des extraits ont été utilisées.

- **L'évaporation**

La concentration des extraits par évaporisation se fait grâce au rotavapor qui est un appareil qui permet d'éliminer rapidement le solvant d'extraction volatile. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition sous pression réduite (sous vide). La vitesse de rotation du ballon d'évaporation accroît la surface d'évaporation donc accélère le processus.

- **La lyophilisation**

  La lyophilisation, ou séchage à froid, est un procédé qui permet de retirer l'eau contenu dans un extrait afin de le rendre sec et stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation.

Principe :

La lyophilisation utilise un principe physique qu'on appelle la sublimation. La sublimation est le passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux directement sans passer par l'état liquide. Dans le cas de l'eau que l'on veut retirer des extraits, l'opération de lyophilisation consiste à:

-Congeler les extraits pour que l'eau qu'ils contiennent soit sous forme de glace.

-Ensuite sous l'effet du vide, sublimer la glace directement en vapeur d'eau.

-Une fois que toute la glace est sublimée, les extraits sont séchés à froid et on peut les retirer du lyophilisateur.

d). Calcul du rendement

Le rendement (pourcentage) exprime la quantité d'extraits secs obtenue par unité de poids sec de l'échantillon de départ.

Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse de résidu d'extrait sec}}{\text{Masse de poudre végétale sèche}} \times 100$$

4.2.2 Tests pharmacologiques pour la mise en évidence de l'activité antiplasmodiale

Le test a été effectué selon la méthode de Peter et Robinson, 1975.

a) Préparations des extraits pour le traitement

Les extraits secs et les lyophilisats des feuilles et racines de *Canthium multiflorum* ont été solubilisés avant leur administration aux souris. Les extraits méthyliques ont été dissous dans l'eau distillée contenant 5% de DMSO et 7,5% de Tween 80. Les extraits éthanoliques et aqueux ont été dissous dans l'eau distillée.

b) Infestation des souris

- *Préparation des souris donneuses*

Le sang parasité de souris donneuses constamment entretenues au laboratoire est utilisé pour infester les souris tests. La parasitémie de chaque souris donneuse est évaluée afin de déterminer la quantité de sang parasité nécessaire pour obtenir 10^7 globules rouges parasités à injecter aux souris tests. Pour cela, des frottis sanguins ont été réalisés à partir de sang prélevé au niveau de la queue des souris donneuses, fixés à l'aide du méthanol; colorés au Giemsa 10% et lus au microscope optique au grossissement 100X. La détermination de la parasitémie s'est faite par lecture de 10 champs contenant chacun 100 globules rouges par champ (Zucker and Campbell 1993) .

- *Numération des globules rouges*

5µl de sang sont prélevés à partir du bout sectionné de la queue de la souris et dilués au 1/5000. Ensuite, 6 à 10 microlitres de sang dilués sont introduits entre la cellule de Neubauer et la lame par capillarité. La solution sanguine est laissée à sédimentation pendant 10 minutes sur un plan horizontal, puis les éléments sont comptés au microscope au grossissement 400 X.
Les globules rouges sont comptés dans un quadrillage de 16 cellules. Les globules rouges obtenus représentent le nombre de globules rouges dans 0,1ul de sang dilué. Le nombre de globules rouges par microlitres de sang chez la souris est obtenu par multiplication avec le facteur de dilution.

- *Infestation des souris tests*

Le jour du test, les souris donneuses NMRI préalablement infectées par *Plasmodium berghei* sont introduites successivement dans un bocal hermétiquement fermé, dans lequel on a pris soin de mettre un coton imprégné d'éther diéthylique. Quelques minutes après, la souris endormie est retirée du bocal. Le sang de chaque souris donneuse est prélevé successivement à l'aide d'une pipette pasteur à travers la veine oculaire et introduit dans un tube hépariné. Le sang parasité recueilli est dilué en tenant compte de la parasitémie du sang recueilli et de la numération des globules rouges dans de l'eau physiologique de sorte que 200 µl de sang contiennent 10^7 globules rouges infectés.

Les souris ont été réparties en 20 lots de 6 souris. Chaque lot de souris reçoit une dose de l'extrait à tester et les lots témoins, la solution utilisée pour diluer l'extrait. 3 doses par extrait (100; 250; 500 mg/kg de poids corporel des souris) ont été testées. Toutes les souris des lots tests y compris le groupe contrôle reçoivent 200µl de sang parasité par voie intrapéritonéale, soit 10^7 globules rouges parasités par souris.

Tableau I: Répartition des souris pour le traitement

Lot de souris	Nombre de souris	Extrait/dose/mg/kg
I (lot témoin)	6	1.2ml H_2O
II	6	100
III	6	250
IV	6	500

Figure 45: Infection de souris, Avril 2012

c) Traitement des souris

Deux heures après l'infestation, les souris à l'exception du groupe contrôle reçoivent par voie orale, la dose d'extrait (100 ; 250 ; et 500mg/kg) destinée au groupe et le groupe contrôle reçoit la solution de dilution de l'extrait. La dose est administrée une fois par jour pendant 4 jours successifs de J_0 à J_3. Les animaux sont mis en observation durant les 4 jours pour noter d'éventuels changements de comportement. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, des frottis minces ont été réalisés avec le sang des souris des différents groupes testés.

Figure 6 :Traitement oral des souris, Avril 2012

d) Fixation – coloration et lecture des lames

Les frottis minces sont fixés par le méthanol, séchés puis colorés par la solution de Giemsa 10% pendant 10 minutes puis examinés au microscope optique (objectif 100x).

Figure 7:Photos de coloration des lames au Giemsa

e) Evaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits sur *P. berghei*

La parasitémie de chaque lame est obtenue par la médiane des résultats de la lecture de trois champs contenant 100 globules rouges. Une moyenne de trois lectures réalisées par des personnes différentes a été faite. L'activité des extraits sur les parasites est exprimée en fonction de la réduction de la parasitémie des souris traitées par rapport aux souris du groupe contrôle. Le pourcentage de réduction (PR) de la parasitémie par souris est calculé suivant la formule:

$$PR = \frac{\text{parasitemie du groupe controle} - \text{parasitemie du groupe test}}{\text{parasitemie controle}} \times 100$$

4.2.3. Recherche de l'extrait le plus actif

Pour la recherche de l'extrait le plus actif, une comparaison des pourcentages réduction de la parasitémie a été faite entre les extraits testés aux mêmes doses.

4.2.4. Détermination de la dose effet 50 de l'extrait le plus actif

L'activité de l'extrait le plus actif s'exprime en dose effet cinquante (DE50) c'est dire la dose d'extrait qui entraîne la réduction de cinquante pour cent la parasitémie des souris testées par rapport aux souris contrôles. La dose effet 50 (DE50) a été déterminée à l'aide des courbes dose- réponse avec en abscisse le log (doses) et en ordonné les pourcentages de réduction.

4.2.5. Détermination de la toxicité des extraits

4.2.5.1 Dose létale 50 (DL50)

Le potentiel toxique à court terme c'est-à-dire la toxicité aiguë a été déterminée avec l'extrait le plus actif, à savoir l'extrait alcoolique. Pour cela, les souris femelles, âgées de 8 à 12 semaines, ont été traitées par voie orale avec des doses croissantes de l'extrait le plus actif. A partir de la dose de 500 mg/kg de

poids corporel donnant 80,9% de réduction de la parasitémie, des doses croissantes de raison géométrique 1,5 ont été calculées et administrées en une seule fois aux animaux expérimentaux.

La dose létale cinquante pour cent (DL50) qui est la dose qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai a été estimée selon la méthode décrite par Lorke (Lorke et al.1983).

30 souris reparties en 5 groupes de six souris que nous avons dénommé groupe A à groupe E ont été utilisées. Après avoir soumis les animaux à un jeûne de 24 heures, les différentes doses de l'extrait (3796,87 ; 5695,31 ; 8542,96 ; et 12814,45 mg /Kg) sont administrées par voie orale. Un pré test de toxicité réalisé à la dose de 5000 mg/Kg, soit 10 fois la dose ayant donné une bonne activité, a permis de fixer la première dose d'extrait à tester qui était de 3796,87 mg/Kg. Les autres doses testées ont été calculé en suivant une progression géométriquement de raison 1,5. L'administration de l'extrait à tester a été faite par gavage à l'aide d'une sonde. Les souris du groupe E , le groupe contrôle ont reçu seulement la solution de dissolution de l'extrait à tester par voie orale. Les animaux ont été survis en surveillant tout changement comportemental pour plus de 72 heures de temps. Le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatiques ont été notés. En cas de mort, l'animal était autopsié et un examen macroscopique des organes internes réalisé pour détecter toute anomalie. Les animaux ont été suivis pendant 14 jours avec une prise de poids au jour 0 ; 7 et 14. Tous les animaux ont été sacrifiés à la fin des 14 jours et autopsiés.

4.2.5.2 Détermination de l'indice thérapeutique

L'indice thérapeutique est le rapport entre la dose toxique (DL50) et la dose curative (DE50). Un indice thérapeutique élevé signifie que la marge de sécurité existant entre les doses bénéfiques et toxiques est grande. Il permet d'évaluer l'intérêt clinique d'un médicament par comparaison aux stratégies thérapeutiques de références.

4.2.6. Analyses statistiques

Les pourcentages de réduction de la parasitémie et les pourcentages de mortalité des animaux testés sont exprimés en moyenne plus ou moins écart type. Le test de Student a été utilisé dans les cas de comparaison de moyenne.

V. Résultats

5.1. Extractions et rendements

Au total 4 type d'extraits ont été obtenus dont les rendements sont présentés dans le tableau ci- dessous. Le décocté aqueux des feuilles présente le rendement le plus élevé.

Tableau II: Rendements des extraits

Type d'extrait	*Masse de l'extrait(g)*	*Rendement(%)*	*Partie de la plante*
Macéré DCM	4,13	4,13	Feuilles
Macéré EtoH	16,60	16,60	Feuilles
Macéré H_2O	14,55	14,55	Feuilles
Décocté H_2O	23,00	23,00	Feuilles

5.2. Résultats des tests pharmacologiques

5.2.1 Activité antiplasmodiale

D'une manière générale, les tests réalisés *in vivo* avec les extraits organiques et aqueux ont montré une réduction de la parasitémie chez les souris infestées et traitées. La réduction observée était proportionnelle aux doses administrées. Les pourcentages de réduction de la parasitémie avec les extraits éthanoliques étaient de 22,5 ; 30,8 et 81,9% respectivement aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg de poids corporel des animaux. A la dose de 250mg/kg, l'extrait au dichlorométhane a donné une inhibition des parasites de l'ordre de 2,4%. Le décocté aqueux aux doses de 100, 250 et 500 a donné respectivement un pourcentage de réduction de la parasitémie de 10,1 ; 25.9 et 74,2 et le macéré aqueux 9,9; 28,7 et 22,8 pour les mêmes doses.

Tableau III: Pourcentages de réduction de la parasitémie des extraits de feuilles de *C.multiflorum*

Extraits de feuilles	Dose (mg/kg) par groupe	Parasitémie (IC95%)	% Reduction
Extraits organiques			
DCM	Groupe contrôle	33,2 (22,0-44,3)	-
	100	33,4 (23,1-42)	ND*
	250	32,4 (25,1-39,7)	2,4*
	500	21,5 (7,7-37,3)	35,2**
EtOH	Groupe contrôle	24,8 (21,1-28,8)	_
	100	19,3 (13,0-25,6)	22,5*
	250	17,2 (8,9-25,5)	30,8**
	500	4,5 (1,7-7,3)	81,9**
Extraits aqueux			
Décocté	Groupe contrôle	24,8 (21,1-28,8)	-
	100	22,3 (20,7-23,9)	10,1*
	250	18.3 (14,6-222,0)	25.9*
	500	6,4 (2,6-10,2)	74,2**
Macéré	Groupe contrôle	24,8 (21,1-28,8)	-
	100	22,4 (18-26,8)	9,9*
	250	17,7(12,1-23,3)	28,7*
	500	19,2(13,9-24,5)	22,8*

***Non significatif; **P<0.05 (significatif)**

5.2.2. Extrait le plus actif

La comparaison des pourcentages de réduction de la parasitémie entre les extraits testés de *Canthium multiflorum* (Figure 10) montre que les extraits éthanoliques présentent les pourcentages de réduction de la parasitémie

significativement plus élevés comparativement aux extraits au dichlorométhane (p=0.08).

A la dose de 250mg/kg, l'extrait au dichlorométhane a présenté une très faible activité (2,4%) et l'extrait éthanolique une activité modérée (30,8%)

L'extrait le plus actif en termes de pourcentage de réduction de la parasitémie est l'extrait éthanolique des feuilles.

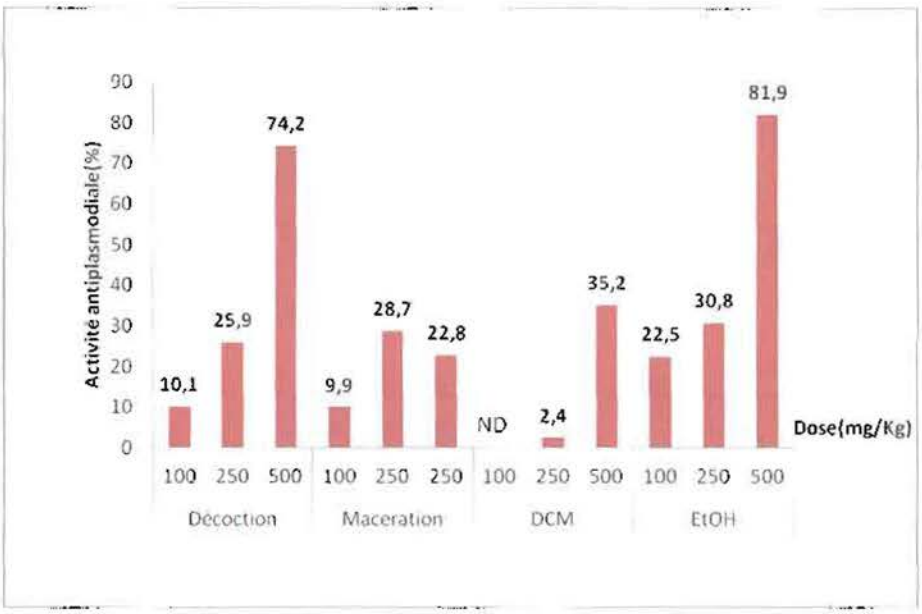


Figure 8: Comparaison de l'activité antiplasmodiale des extraits testés

5.2.3. Dose effet 50 de l'extrait le plus actif

La dose d'effet 50 de l'extrait le plus actif à savoir l'extrait éthanolique des feuilles déterminé graphiquement était de l'ordre de 267.73mg/kg de poids corporel des souris (Figure 12)

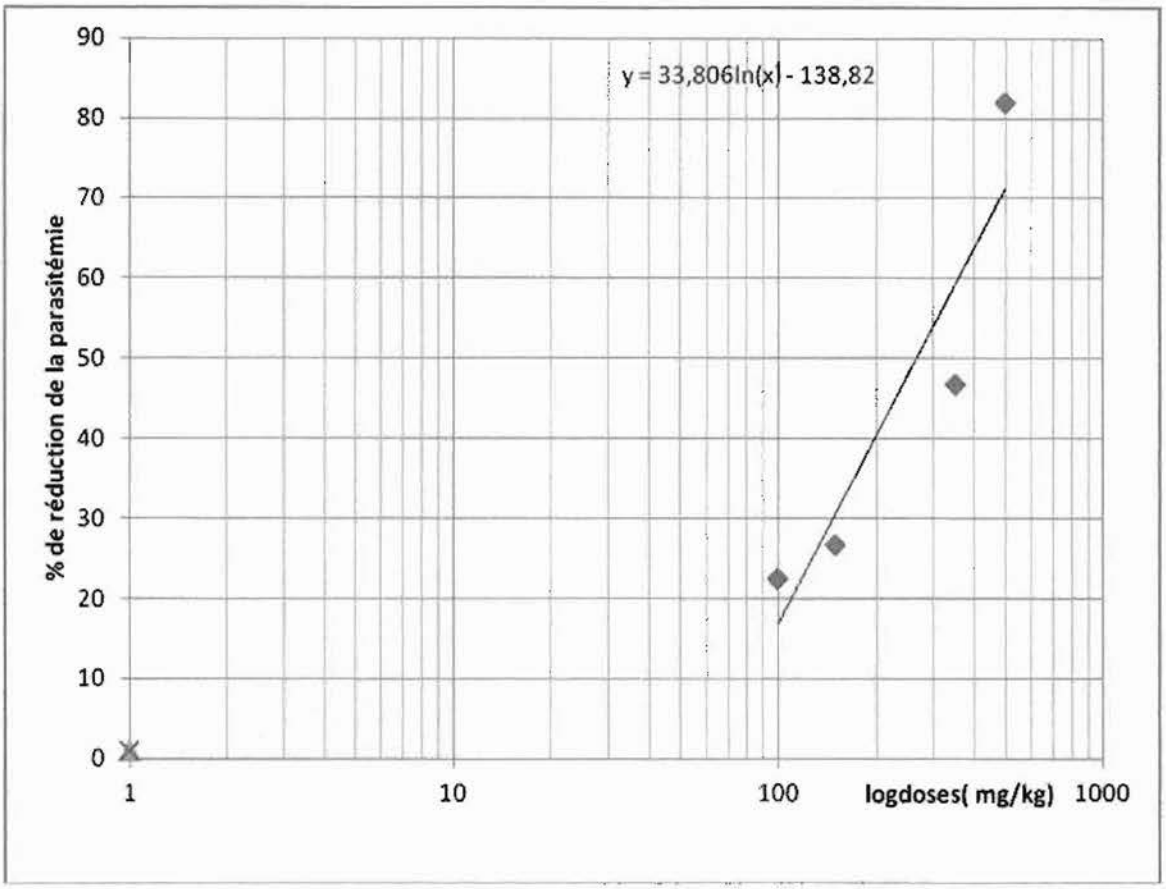


Figure 9: Courbe de détermination de la Dose Effet 50 de l'extrait éthanolique

5.2.4. Toxicité de l'extrait le plus actif

Dose létale 50 (DL50)

Au pré test de toxicité à la dose de 5000 mg/Kg de poids corporel, aucune mortalité n'a été constatée dans le groupe expérimental. Aux doses testées (3796,87 ; 5695,31 ; 8542,96 ; et 12814,45 mg /Kg) pour la détermination de la dose effet 50, aucune mortalité n'a été constatée au bout des 14 jours de suivi. Au vu des résultats, la dose maximale de non létalité (DMNL) est supérieure à 12814,45 mg/kg de poids corporel des souris. Cependant, un changement dans l'activité physique et dans le comportement des souris a été observé aux fortes doses d'extrait. En effet, une hyper activité pendant une trentaine de minutes dans tous les groupes testés et une piloérection des animaux qui ont reçu une dose orale supérieure à 8 g/kg ont été observées. Aucune variation importante de poids n'a été

observée chez les animaux au cours du suivi. Le tableau suivant donne un récapitulatif des doses testées et les poids moyens dans chaque groupe.
La différence en gain de poids par rapport au groupe contrôle n'est pas significative.

Tableau IV : Evolution du poids des souris

Groupes	Doses (mg/kg)	Souris testées	Souris mortes	Poids moyen Jo	Poids moyen J7	Poids moyen J14	Gains de poids
E	Témoin	6	0	30,3 ±1.4	30,0 ± 1*	31,1± 1.8*	0.8
D	3796,87	6	0	28,6±0.94	27,0±1.48 *	28,7±1.7 *	0.1
C	5695,31	6	0	32,6±0.9	32,4 ±1.4*	32,8 ±1.5*	0.2
B	8542,96	6	0	31,0 ±1.1	28,1±1.0*	31,0±1.3 *	0
A	12814,45	6	0	31,9± 1.6	31,3±1.5 *	31,6±1.1 *	-0.3

*non significatif

Index thérapeutique

Le calcul de l'indexe thérapeutique (DL50/DE50) de l'extrait le plus actif est de l'ordre de 95,72. Cet indexe élevé correspond à un indice de toxicité de 6 selon l'échelle de Hodge et Sterner décrit en 1980. Il permet de considérer l'extrait éthanolique comme relativement inoffensif en administration orale.

VI. DISCUSSION

6.1-Etude des plantes et quelques résultats probants

La médecine traditionnelle dont l'une des bases est l'utilisation des plantes selon des vertus thérapeutiques découvertes empiriquement est encore d'actualité dans les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'études précliniques et cliniques systématiques. La recherche scientifique dans le domaine consiste à la mise en évidence des propriétés biologiques des extraits de plantes, à l'identification et à l'isolement des molécules actives pouvant déboucher sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments

Dans le cas du paludisme, des tests pharmacologiques ont été validés pour permettre la mise en évidence de l'activité antiplasmodiale des extraits de plante Desjardins *et al.* in 1979 (O'Neill *et al.*, 1985). Il s'agit du test *in vitro* avec *Plasmodium falciparum* accompagné de la détermination de la cytotoxicité et du test *in vivo* chez les souris accompagnée de la détermination de la toxicité aiguë. Les extraits actifs à l'issu des tests biologiques font l'objet de fractionnement bioguidé pour isoler les molécules actives. La quinine extraite de l'espèce *Chinchona* et l'artémisinine extrait d'*Artemisia annua* sont des résultats probants de cette recherche. Depuis la découverte de l'artémisinine, beaucoup d'études précliniques sur les plantes antipaludiques ont été conduites en Afrique. Un article publié récemment fait cas de 48 études conduites en Afrique de l'ouest entre 1987 et 2007 et qui ont démontré la très bonne activité antiplasmodiale (CI50<5µg/ml) de 94 extraits de plante (P.N. Soh, F. Benoit-Vical 2007).

Les extraits au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle des racines et des feuilles de *Canthium multiflorum* testés *in vitro* contre *P. falciparum* ont présenté une activité antiplasmodiale intéressante avec une CI50 de l'ordre = 7µg/ml (Traoré et al., 2008). Cependant, les fractions pures isolées des extraits bruts actifs ont donné une activité antiplasmodiale inférieure à celle des extraits bruts. Parmi les molécules isolées, seul le triterpene 3-oxo-19alpha-hydroxy-urs-1,12-dien-28oic a montré une activité modérée *in vitro* (CI_{50} = 26 µg/ml). Les auteurs ont conclu que cette différence d'activité pouvait s'expliquer par une synergie d'action des constituants chimiques présents dans les extraits bruts (Traore, Jaroszewski et al. 2008).

La présente étude a été conduite dans le but de confirmer l'activité antiplasmodiale *in vivo* des extraits totaux de la plante dans le modèle animal.

6.2- Extractions et rendement

L'extraction aqueuse par décoction a donné le rendement le plus élevé (23%) par rapport aux trois autres extraits (macéré aqueux, éthanolique et au dichlorométhane). La différence en rendement du décoté par rapport au macéré aqueux, 14%) préparé à la température ambiante serait due à la température (100°C) qui augmenterait la solubilité des composés chimiques (Bassène,E, *et al*, 2012). En effet, le décocté aqueux a été porté à la température de 100°C pendant 10 à 15 minutes ce qui a permis l'extraction plus ou moins important des constituants chimiques d'intérêt. Cependant si la température améliore le rendement d'extraction, certains auteurs recommandent l'extraction à froid car la température détruirait certains composés chimiques (Bassène, E., *et al*, 2012).

L'extraction par macération éthanolique (polarité intermédiaire) a donné le rendement le plus élevé après la décoction. Le rendement élevé pourrait résulter de la polarité de l'éthanol qui permet l'extraction des composés polyphénoliques tels que les tanins, les flavonoïdes, les coumarines et les saponines (Ciulei, 1982). . L'éthanol est généralement recommandé pour l'extraction car il est facilement évaporable et peu toxique à faible dose.

L'extraction par macération au dichlorométhane a présenté le plus faible rendement (4,13%) par rapport aux autres extractions. Le dichlorométhane étant le solvant le moins polaire ne retient que les composés apolaires. Ce faible rendement pourrait s'expliquer par le fait que les composés présents dans *Canthium multiflorum* ne sont pas très solubles dans les solvants moins polaires.

6.3-Toxicité des extraits – signes physiques de toxicité au cours des tests

Les tests de toxicité ont permis d'estimer la DL50 de l'extrait éthanolique à une valeur au moins supérieure à 2 fois la DMNL (12814,45mg/kg), soit 25628,9 mg/kg de poids corporel des souris. Il ressort alors que l'indexe thérapeutique (DL50/DE50) de l'extrait est très large (95,39) qui correspond sur l'échelle de

Hodge et Sterner 1980, à un indice de toxicité de 6. L'extrait éthanolique peut donc être considéré comme relativement inoffensif et l'activité antiplasmodiale observée est loin d'être due à la toxicité. Il peut alors être utilisé à forte dose sans risque de toxicité.

6.4-Efficacité parasitologique de *Canthium multiflorum*

D'une manière générale, les tests d'activité antiplasmodiale réalisés *in vivo* chez les souris infectées par *P. berghei* (souche ANKA) montrent une réduction dose dépendante de la parasitémie des souris parasitées par les extraits testés. Les pourcentages de réduction les plus élevées ont été obtenus aux fortes concentrations des extraits (5OO mg /kg de poids corporel). Les études préalablement réalisées ailleurs présentent la même tendance (Traoré, M., 2008 ; Akomo, E.et al 2009)

L'échelle d'appréciation de l'activité antiplasmodiale des extraits de plante établie par Rosanaivo et al en 2004, nous permet de statuer sur l'efficacité parasitologique de nos extraits. Ainsi, pour un extrait testé à dose 250mg/kg et en fonction des pourcentages de réduction de la parasitémie obtenus, l'extrait sera considéré:

-Très actif, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 100 et 90.

-Actif à modéré, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 90 et 50.

-Modéré à faible, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 50 et 10.

-Inactif si le pourcentage de réduction de la parasitémie est 0.

Ainsi, l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *Canthium multiflorum* qui a donné un pourcentage de réduction de l'ordre de 2,4 % à la dose de 250 mg/kg de poids corporel possède une activité faible.

Par rapport à l'échelle de Rosanaivo 2004, l'activité antiplasmodiale des extraits éthanoliques (30,8%) à la dose de 250mg/kg même si elle était élevée comparativement aux autre extraits, reste un extrait à activité modérée Pour le décocté aqueux des feuilles de *Canthium multiflorum* , la réduction de la parasitémie

observée à la dose de 250 mg/kg était de 25.9 % traduisant une activité antiplasmodiale modérée (Figure 5). Le macéré aqueux des feuilles (28,7 % de réduction à la dose de 250mg/kg) présente une activité modérée sur les parasites testés.

Dans l'ensemble, les quatre extraits de *Canthium multiflorum* testés sur *Plasmodium berghei* ont présenté une activité antiplasmodiale faible à modérée selon l'échelle établie par Rosanaivo et al. en 2004.

Cette activité faible à modérée, observée avec les différents extraits de la plante pourrait être lié à la nature des constituants chimiques présents dans chaque type d'extrait. Les composés chimiques susceptibles d'être présents dans l'extrait au dichlorométhane (faible rendement) qui est un solvant de polarité intermédiaire sont les terpénoïdes et les stéroïdes. Les terpénoïdes ont été effectivement mis en évidence par Traoré et al en 2008b. Une des molécules isolée (19□-Hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic acid), un triterpène avait une activité modérée sur *Plasmodium falciparum* (Traoré et al, 2008). Les extraits éthanoliques et aqueux au vu de leurs rendements dans notre expérimentation et de leur polarité pourrait contenir des composés chimiques différents de ceux des extraits au dichlorométhane. Les travaux de Traoré et al, en 2008a ont effectivement montré la richesse des extraits éthanoliques et aqueux des racines et des feuilles en coumarines, tanins, saponines, composés qui dans la littérature apparaissent comme des inhibiteurs faibles à modérés des parasites du paludisme (Khalid *et al.* 1986) (Cubukcu *et al.* 1990) (Traoré et al 2009).

D'une manière générale, les résultats de l'évaluation *in vivo* confirment une inhibition des parasites du Plasmodium par les extraits de feuilles de *Canthium multiflorum* même si cette inhibition reste faible à modéré selon les normes établies.

L'activité faible à modérée pourrait être due aussi à une faible biodisponibilité de certaines molécules chimiques par voie orale. La dose létale 50 aussi bien que l'indexe thérapeutique (DL50/DE50) de 95,72 obtenus avec l'extrait éthanolique, l'extrait le plus actif sur *P. berghei* confirment également la non toxicité par voie orale.

L'observation macroscopique ou microscopique des organes prélevés au cours du test de toxicité ne montre aucun changement au niveau des organes comparativement au groupe contrôle.

VII.CONLUSION & PERSPECTIVES

La médecine traditionnelle comme toujours offre une grande opportunité de recherche de nouvelles molécules antipaludiques. *Canthium multiflorum* appartenant à la famille des Astéracées est largement utilisé sous forme de décocté pour le traitement du paludisme dans l'ouest du Burkina Faso. Les investigations préliminaires *in vitro* ont montré une bonne activité des extraits organiques de la plante par rapport aux extraits aqueux. Pour la présente étude des extraits organiques et aqueux des feuilles de *Canthium multiflorum* ont été préparés. Les tests d'inhibition parasitaire réalisés *in vivo* sur *Plasmodium berghei* chez les souris albinos NMRI ont révélé que l'extrait éthanolique des feuilles de *Canthium multiflorum* avait l'activité antiplasmodiale la plus élevée, suivi des extraits aqueux. Cependant cette activité reste modérée (DE50 = 267.73 mg/Kg). Les composés chimiques actifs de la plante *in vivo* au vu des résultats seraient des composés polaires à moyennement polaires. Par contre, les extraits actifs *in vitro* étaient des composés apolaires à moyennement apolaires.

La DL50 (25628,9 mg/kg) ainsi que l'indice de toxicité de 6 indiquent un extrait inoffensif en administration orale.

Ces résultats nous permettent de conclure que bien que présentant une activité faible à modérée sur *Plasmodium Berghei in vivo* et une activité bonne *in vitro*, C*anthium multiflorum* a une possible activité antiplasmodiale. Des extraits standardisés organiques comme aqueux concentrés pourront être préparés et recommandés.

L'acquisition de l'immunité chez les adultes accompagnée d'une activité modérée des extraits de la plante pourrait expliquer les guérisons relevées par les tradipraticiens de santé.

PERSPECTIVES

Les extraits organiques de *Canthium multiflorum* ont montré une bonne activité antiplasmodiale aussi bien *in vivo* que préalablement *in vitro* par rapport aux extraits aqueux qui sont les formes généralement utilisées en médecine traditionnelle.

Cependant des études complémentaires au plan chimique (établir le finger print), toxicologique et parasitologique avec une diversification des solvants organiques et

un suivi direct des patients traités en collaboration avec les tradithérapeutes s'avèrent encore indispensable pour proposer un phytomédicament antipaludique standardisé.

IX-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akomo, E. F., Zongo C., Karou,S.D.,et al. (2009). "In vitro antiplasmodial and antibacterial activities of *Canthium multiflorum* Schum and Thonn (Rubiacea) extracts." Pak J Biol Sci 12(12): 919-923.

Ballin Nicolai Zederkopff, Traoré Maminata, Halidou Tinto, Archibald Sittie, Per Mølgaard, Carl Erik Olsen, Lars Hviid, Arsalan Kharazmi and Søren Brøgger Christensen. Antiplasmodial compounds from *Cochlospermum tinctorium. Journal of Natural products,* Vol. 65, N°9, 2002, pp 1325- 1327

Bassène,E .(2012). "Initiation à la recherche sur les substances naturelles :extraction,Analyse,Assaie biologiques " :24-25.

Beiersmann, C., Sanou A., et al. (2007). "Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behaviour." Malar J 6: 106.

Bruneton J., (1993)." Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.2ème Ed.Tec et Doc. Lavoisier, Paris 915p".
CIULEI I., 1982. "Methodology for analysis of vegetable drugs". Ministry of Chemical industry, Bucharest, p. 67.

Cubukcu B., Bray D.H., Warhust D.C., Mericli, A.H., Ozhatay N., Sariyar G., (1990). *Phytother. Res.* 4, 203-204.

Desjardins R.E., Canfield C.J., Haynes J.D., Chulay J.D., (1979). *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710-718.

Diallo, D., B. Graz, et al. (2006). "Malaria treatment in remote areas of Mali: use of modern and traditional medicines, patient outcome." Trans R Soc Trop Med Hyg 100(6): 515-520.

Diggs, C. L., Aikawa M., et al. (1977). "Ultrastructure and viability of cryopreserved *Plasmodium falciparum.*" Bull World Health Organ 55(2-3): 299-304.

Dongo E.,Johnson F., et al.(1989) "journal of natural product."52,840-3

Githeko, A. K.,. Service M. W, et al. (1996). "Resting behaviour, ecology and genetics of malaria vectors in large scale agricultural areas of Western Kenya." Parassitologia 38(3): 481-489

Guiguemde, T. R., Aouba A., et al. (1994). "Ten-year surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991)." Am J Trop Med Hyg 50(6): 699-704

Guiguemde, T. R., Toe A. C., et al. (1992). "[Variation of the parasite density of P*lasmodium falciparum in* asymptomatic carriers: consequences for malaria chemoresistance studies]." Med Trop (Mars) 52(3): 313-315.

Khalid S.A., Farouk A.,Geray T.G., Jensen J.B., 1986. *J. Ethnopharmacol.* 15, 201-209.

Lorke,D., et al (1983) "A new approach to praticale acute toxicity testing"

Marsh, K. and. Snow R. W (1999). "Malaria transmission and morbidity." Parassitologia 41(1-3): 241-246.

Nacoulma/Ouedraogo O.G., (1996). "Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso : cas du plateau central". Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Thèse de Doctorat d'état,Tome I :1-320.

OMS, (2006). "Directives pour le traitement du paludisme"." 1ère Ed. 282p

O'Neill M.J., Bray D.H., Boardman P., Phillipson J.D., Warhurst D.C., 1985. *Planta Med.* 5, 394-398.

Peters, W. and Robinson B. L. (1992). "The chemotherapy of rodent malaria. XLVII. Studies on pyronaridine and other Mannich base antimalarials." Ann Trop Med Parasitol 86(5): 455-465.

PNLP, rapport (2011). "Plan strategique 2011-2015 du programme national de lutte contre le paludisme au Burkina Faso".

Rasoanaivo P., Deharo E., Rasitmamanga-Urverg, Frappier F., (2004).

Guidelines for the nonclinical evaluation of the efficacy of traditional antimalarials: in Traditional Medicinal plants and malaria, 255-270.
Ruzicka, L. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds " completer livre ou rapport nombre de page

Sirima, S. B., Tiono A. B., et al. (2003). "Efficacy of artesunate plus chloroquine for the treatment of uncomplicated malaria in children in Burkina Faso: a double-blind, randomized, controlled trial." Trans R Soc Trop Med Hyg 97(3): 345-349.

Soh P.N., Benoit-Vical F., (2007). Are West African plants a source of future antimalarial drugs? J Ethnopharmacol., 114(2):130-40.

Sutherst, R. W. (2004). "Global change and human vulnerability to vector-borne diseases." Clin Microbiol Rev 17(1): 136-173.

Tinto, H., Sanou B., et al. (2005). "Usefulness of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter T76 genotype failure index for the estimation of in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso." Am J Trop Med Hyg 73(1): 171-173.

Traoré Maminata, Hanne L. Ziegler, Carl Erik Olsen, Millogo Hassanata, Guissou I. Pierre, Odile G. Nacoulma, T. Robert Guiguemdé, and S. Brøgger Christensen, 2008. 19α-Hydroxy-3-oxo-ursa-1,12-dien-28-oic acid, an antiplasmodial triterpenoid isolated from *Canthium multiflorum; Nat Prod Res.* 2009, 23 (12):1108-1111.

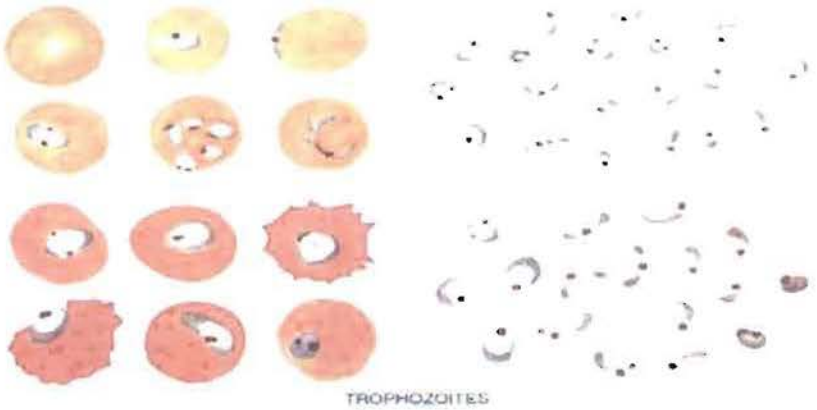
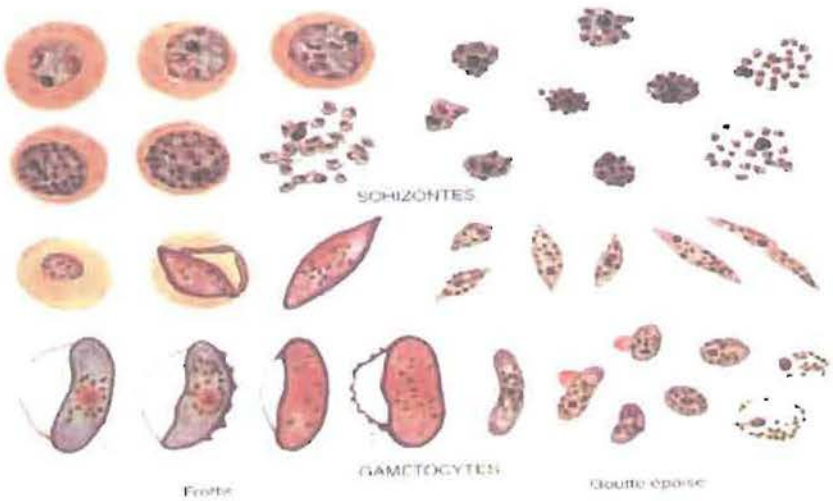
Traore, Maminata. (2008a). Phytochemical studies of plants used as antimalarials in Burkina Faso. Faculty of pharceutical sciences. COPENHAGEN, University of COPENHAGEN. PhD: 144.

Traore, M., Jaroszewski J. W., et al. (2008b). "A new oxygenated ursane derivative from *Canthium multiflorum.*" Planta Med 74(5): 560-562.

Vitalini, S., Tome F., et al. (2009). "Traditional uses of medicinal plants in Valvestino (Italy)." J Ethnopharmacol 121(1): 106-116.

WHO, (2000). "Severe falciparum malaria, third edition. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and hygiene 94:1-90.
Yamanaka., et al.(1990). "A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. Archives of Toxicology", 1990, 64 : 262-268)

Zucker, J. R. and Campbell C. C. (1993). "Malaria. Principles of prevention and treatment." Infect Dis Clin North Am 7(3): 547-567.

Yerbanga, S.R. et al.(2011). "Antimalarial plant remedies from Burkina Faso: Their potential for prophylactic use".

Annexe: *P. berghei ou falciparum* à divers stades sur frottis et goutte épaisse, colorés au Giemsa