



**ETUDE PHYTOCHMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE
PLANTES ANTIPALUDIQUES UTILISEES EN MEDECINE
TRADITIONNELLE CONGOLAISE**

Mariano LUSAKIBANZA MANZO

Promoteur : Professeur Michel FREDERICH

Co-promoteur : Professeur Gaston TONA LUTETE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2011-2012

*L'homme se découvre quand il se mesure avec l'obstacle
(Antoine de Saint Exupéry)*

Ce sont les pierres qui font les chemins (René Bazin)

La vie est un combat (Victor Hugo)

L'homme se forme par la peine (Alain)

Vaincre sans péril, on triomphe sans gloire (Pierre Corneille)

Il est comme un arbre planté près des ruisseaux: il donne du fruit en sa saison et son feuillage ne se flétrit pas; il réussit tout ce qu'il fait (Ps:1,3)

«Sur le torrent, sur ses bords de chaque côté, croîtrons toutes sortes d'arbres fruitiers... leurs fruits serviront des nourritures et leurs feuilles des remèdes.» Ezékiel: 47,12

DÉDICACE

A Dieu le Père Tout Puissant, Maître du temps et des circonstances, plein d'amour, de tendresse et de bonté,

A mon bien aimé père Jean Salomon Lunsongadio qui avait souhaité vivre le grand jour, hélas la volonté de Dieu a été tout autre,

A ma très chère épouse Pauline Bébé Ntambani qui a accepté la charge de nos enfants durant cette longue et difficile épreuve, à tous les enfants Lusakibanza (Santa, Marcellin, Gracelia) et Luzolo (Chadrac, Mavie, Deborah, Plamedie, Charone et Johnson),

A ma très chère mère Marie Nsenga qui à chaque appel téléphone ne me posait qu'une question après salutations Comment évolue ton travail? et elle terminait par prends courage mon fils,

A mes frères et sœurs John Luzolo, Dady Mbayi, Godelive Lunsongadio, Anastasie Mena, Blandine Lelo, Dora Mamie Sita,

A mes oncles, tantes, cousins, cousines, beaux frères, belles sœurs, nièces et neveux,

Je dédie ce travail.

REMERCIEMENTS

L'information et la formation ne sont que directives mais le fruit et l'épanouissement en sont la résultante.

Ce travail de thèse a atteint son terme grâce à l'assistance et à la collaboration de nombreuses personnes. Je profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin ou de près ont contribué.

Je veux exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Luc Angenot qui a tout d'abord accepté la collaboration entre l'Université de Liège et l'Université de Kinshasa et en suite la conduite et la direction de ma thèse, par sa rigueur scientifique, par ses conseils et ses encouragements, il m'a toujours aidé à aller de l'avant et me réconfortait en ce terme: **«A vaincre sans péril, on triomphe sans gloire.»**

Ma profonde gratitude va à Monsieur le Professeur Michel Frédéric qui a accepté d'être co-promoteur puis promoteur, durant ces quatre années passées. Il a bien voulu diriger mes travaux en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de sa sagesse, de ces encouragements, de ces conseils et en m'accordant la liberté et la confiance. Je tiens à le remercier au plus profond de mon cœur pour son soutien dans l'achèvement de ma thèse et pour m'avoir permis de présenter quelques uns de mes résultats aux congrès internationaux, nationaux et au Forum de jeunes chercheurs (CIRM).

Mes remerciements vont chaleureusement à Madame le Professeur Monique Tits qui a toujours tenu son bâton de la mère éducatrice par ses conseils, sa rigueur scientifique, ses orientations et surtout par son soutien moral de tous les jours au laboratoire et pour avoir accepté la place de secrétaire du jury de cette thèse.

Que Monsieur le Professeur Tona Lutete Gaston, Chef de Service de Pharmacologie de la Faculté de Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Kinshasa et co-directeur local trouve ici ma considération à mon attachement pour sa large contribution dans la présélection des plantes qui ont fait l'objet de ce travail de thèse, pour ses conseils, directives et contributions, de fond de mon cœur je vous remercie.

Je remercie Monsieur le Professeur Gauthier Mesia Kahunu pour sa contribution matérielle ainsi que pour ses conseils pratiques, encouragements et orientations.

J'exprime ma profonde gratitude au comité d'accompagnement qui a suivi mes travaux année par année pour leurs remarques, orientations et conseils très pertinents durant mes séjours en Belgique

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Patrick De mol pour avoir accepté que la culture de *Plasmodium* soit effectuée dans son laboratoire de Microbiologie au début de ma thèse et Dr Alain Chariot pour les essais de cytotoxicité effectués au Giga sous sa direction.

J'exprime ma profonde gratitude aux professeurs François Bailleul de l'Université de Lille (Service de Pharmacognosie) et Professeur Pierre Duez de l'Université libre de Bruxelles (Service de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition) pour avoir accepté de juger cette thèse.

Je remercie le Professeur Luc Van Meervelt et son doctorant Piet Mangwala pour leur contribution dans la détermination des structures par diffraction aux rayons X

Je remercie profondément Monsieur le Professeur Philippe Hubert pour sa compassion à amener cette thèse à terme et pour avoir accepté la place du Président du comité d'accompagnement à mi-chemin et enfin Président du jury de cette thèse.

Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur Sébastien Luyindula et à tous ses assistants, techniciens de laboratoire pour tant de services rendus en matériel, réactifs, solvants et broyage de plantes.

Je tiens à remercier Monsieur Jean - Noël Wauters pour tous les sacrifices et temps consacrés et pour ses grandes compétences en HPLC m'ayant permis d'identifier et d'isoler quelques composés de mes plantes.

Je remercie les Docteurs Alembert Tchinda et Marie-Caroline Jonville pour leur contribution à la détermination de structures de quelques composés isolés de mes plantes.

Je tiens à remercier le Dr Roland Marini et Mr Pierre Lebrun pour leur contribution dans le traitement des données statistiques.

Je remercie le Dr Eric Ziemons pour la prise de spectres Infra – rouge.

Je remercie le Dr Pascal de Tullio pour sa gentillesse, sa grande ouverture dans le partage de ses compétences en RMN et LC-SPE-RMN.

Que les Ingénieurs Joelle Widart et Jean - Claude Van Heugen trouvent ici ma profonde gratitude pour leur contribution dans la détermination de masse de composés isolés.

Je remercie le Dr Pierre Francotte et Eric Goffin pour leur contribution.

Mes remerciements et ma reconnaissance aussi, à tous les collaborateurs et membres du service de Pharmacognosie de l'Université de Liège qui malgré la distance qui me séparait de la R.D.Congo et de ma famille restreinte, la grande famille de Pharmacognosie m'a toujours soutenu et m'a été un signe d'amour incommensurable.

Mes remerciements vont également à Delphine, Virginie, Olivia, Ewa, César, Raymond, Martine, Gené, tous les stagiaires et Nathalie Matagne pour leurs contributions inoubliables dans mon cheminement.

J'exprime ma profonde gratitude à toutes les familles de la communauté UNIPHAR: Bazeka, Kiamuangana, Mputu, Ndombe, Nguima, Nsompî pour leur soutien infini.

Je remercie les familles Muanga, Lokosa, Ndombasi, Nsuadi, Mwane, Kamba, Nsumbu, Kavungu, Aberi, Makry, Lelo, Basunga, Ndonga, Kasamba, Makiadi, Malenga, Maswaku, Mulangu, Lohose, Masala, Kambale, Diakanua, Mupote, Maleka , Mavitu, Liswa, Kwele, Diyayidi, Makila, Tungulu, Tangou pour leur soutien et encouragement

Je remercie vivement le Technicien Lokombe Jean-Pierre pour sa contribution dans la réalisation de l'étude in vivo et ex-vivo, il comptait vivre le grand jour mais hélas, la volonté de Dieu s'est accomplie

Je remercie toutes les familles du renouveau charismatique Christ lumière, les amis du rosaire, les jeunes de Lumière (BYM), la communauté de l'église St Christophe de Liège ainsi que tous les étudiants et administratifs du foyer international pour leur soutien moral, spirituel et matériel.

Je remercie vivement les médecins et pharmaciens du Service de Pharmacologie clinique- Usages rationnels des médicaments et Pharmacovigilance,

Que Mr le professeur Mampunza, Dr Georgette Songo Biebie, Yves Lula, Tom Nanga, Félicité Makila, Bibiche Mbete, Thérèse Mpiempie, Sandrine Bazundama, Begin Salumu, Sengi Ntambyaliro, Gerry Liwono, David Lenda, Flory Muanda, Didier Nzolo, Joe Miantezila retrouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour leur assistance.

Que les collègues de Pharma-House, tous les amis pharmaciens et tous les pharmaciens de ma promotion, les médecins et techniciens de l'INRB trouvent ici l'expression de ma profonde considération.

Mes remerciements vont à l'endroit de tous les Professeurs de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, les chefs des travaux, les assistants et administratifs ainsi que tous les amis médecins des Cliniques Universitaires de Kinshasa (C.U.K) et d'ailleurs pour leur soutien et encouragement.

J'exprime mes vifs remerciements à la Coopération Technique Belge (CTB) pour m'avoir octroyé la bourse de doctorat mixte, à la fondation A. Seghers et le patrimoine de l'Université de Liège pour leur soutien dans la finalisation de cette thèse.

A vous tous qui continuent à me soutenir, un grand merci.

RÉSUMÉ

Cette thèse a été réalisée au sein du service de pharmacognosie de l'Université de Liège, dont les travaux de recherche sont principalement axés sur la découverte de nouvelles molécules à potentialité antipaludique.

La première partie de ce travail est consacrée à une enquête ethnobotanique réalisée en R.D.Congo et qui s'est intéressée aux plantes utilisées en médecine traditionnelle pour soigner différentes maladies, en particulier le paludisme. De cette étude, cinq plantes utilisées dans le traitement de la fièvre, de l'inflammation, des céphalées, de la malaria ont été présélectionnées. Un criblage antiplasmodial *in vitro* des différents extraits a été réalisé sur les souches chloroquino-sensible (3D7) et chloroquino-résistante (W2) de *Plasmodium falciparum*. Il a permis de sélectionner deux de ces cinq plantes qui se sont révélées très actives et qui n'avaient pas encore été étudiées sur la malaria : *Anisopappus chinensis* (Asteraceae) et *Physalis angulata* (Solanaceae). L'activité antiplasmodiale de ces deux plantes a été confirmée par un test *in vivo* sur les souris NMRI et SWISS infestées par le *Plasmodium berghei berghei*. Des essais de cytotoxicité *in vitro* sur des fibroblastes de poumons humains (souche WI-38) ont également été réalisés ainsi que la détermination de la DL₅₀ sur les rats wistar (DL₅₀ > 5g/kg pour les deux plantes).

La deuxième partie du travail consiste en l'étude phytochimique bio-guidée de ces deux plantes. A partir de *Physalis angulata* (extrait CH₂Cl₂, CI₅₀ < 2 µg/ml) nous avons pu isoler deux séco-stéroïdes (Physaline B et 5β-6β-époxyphysaline B) présentant une activité antiplasmodiale très intéressante sur la souche 3D7 (CI₅₀ < 3µM). Ces composés confirment l'activité antipaludique de cette plante. De la seconde plante, *Anisopappus chinensis* (extrait CH₂Cl₂, CI₅₀ < 7µg/ml), deux flavones méthoxylées, deux diterpènes et l'acide linoléique ont été isolés et identifiés. Ces composés possèdent une activité antiplasmodiale modérée (18 > CI₅₀ < 30 µg/ml). Par ailleurs, plusieurs acides phénols ont également été identifiés dans l'extrait MeOH. Des études complémentaires pourraient aboutir à l'isolement de substances plus actives. Tous ces composés, de classes phytochimiques très différentes, contribuent vraisemblablement à l'activité antipaludique de la plante, ce qui nous fait penser qu'ils agissent en synergie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL	1
CHAPITRE I: MALARIA	4
I.1. DÉFINITION.....	4
I.2. HISTORIQUE.....	4
I.3. MALARIA DANS LE MONDE.....	7
I.4. EPIDÉMIOLOGIE	8
I.5. LES VECTEURS.....	9
I.6. LE <i>PLASMODIUM</i>	10
I.6.1. <i>Les espèces de Plasmodium humain</i>	11
I.7. CYCLE ÉVOLUTIF DU <i>PLASMODIUM</i>	12
I.7.1. <i>Cycle asexué (Hôte vertébré)</i>	13
I.7.2. <i>Cycle sexué</i>	14
I.8. MALARIA EN RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE DU CONGO (R.D.C)	15
I.9. MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	16
I.10. DIAGNOSTIC.....	17
I.11. IMMUNITÉ DANS LE PALUDISME	17
I.12. MALARIA ET VIH	17
I.13. MALARIA ET TUBERCULOSE	18
I.14. TRAITEMENT.....	18
I.14.1. <i>Quinolines</i>	18
I.14.2. <i>8-amino-quinoléines</i>	20
I.14.3. <i>Antimétabolites</i>	20
I.14.4. <i>Artémisinine et dérivés</i>	22
I.14.5. <i>Naphtoquinones</i>	23
I.14.6. <i>Antibiotiques</i>	24
I.15. MÉCANISME D'ACTION DES ANTIPALUDIQUES	24
I.16. CHIMIOPROPHYLAXIE	26
I.16.1. <i>Vaccin antipaludique</i>	26
I.17. MÉCANISME DE RÉSISTANCE DE <i>PLASMODIUM</i> AUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES	26
I.18. MALARIA ET FEMME ENCEINTE.....	29
CHAPITRE II : ETUDE ETHNOBOTANIQUE REALISEE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO.....	31
II.1. INTRODUCTION.....	31
II.2. OJECTIFS	31
II.3. RÉALISATION DE L'ENQUÊTE	32
II.3.1. <i>Lieu de l'enquête</i>	32
II.3.2. <i>Organisation de l'enquête</i>	33
II.4. RÉSULTATS	34
II.5. DISCUSSION	47
CHAPITRE III : PHARMACOLOGIE DES PLANTES SELECTIONNEES LORS DE L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE	48

III.1. INTRODUCTION.....	48
III.2. DESCRIPTION BOTANIQUE DES PLANTES SÉLECTIONNÉES.....	48
III.2.1. <i>Anisopappus chinensis</i> Hook & Arn (Asteraceae).....	48
III.2.2. <i>Entandrophragma palustre</i> STANER (Meliaceae).....	51
III.2.3. <i>Melia azedarach</i> L. (Meliaceae).....	53
III.2.4. <i>Physalis angulata</i> L. (Solanaceae).....	54
III.2.5. <i>Strychnos icaia baill</i> (Loganiaceae).....	57
III.3. SCREENING ANTIPLASMODIAL <i>IN VITRO</i>	58
III.3.1. Résultats.....	58
III.3.2. Discussion.....	60
III.4. TEST DE CYTOTOXICITÉ <i>IN VITRO</i>	61
III.4.1. Discussion.....	61
III.5. SCREENING ANTIPLASMODIAL <i>IN VIVO</i>	62
III.5.1. Résultats.....	62
III.5.2. Discussion.....	68
III.6. SCREENING ANTIPLASMODIAL <i>EX-VIVO (IN VITRO)</i>	68
III.6.1. Résultats.....	68
III.6.2. Discussion.....	71
III. 7. TOXICITÉ <i>IN VIVO</i> DES EXTRAITS AQUEUX TOTAUX D'ANISOPAPPUS CHINENSIS ET DE PHYSALIS ANGULATA.....	71
III.7.1. Résultats.....	71
III.7.2. Résultats de la dose létale 50 (DL ₅₀).....	73
III.8. DOSAGE DE PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES ET HÉMATOLOGIQUES.....	79
III.8.1. Résultats du dosage des paramètres biochimiques et hématologiques pour <i>A.chinensis</i>	79
III.8.2. Résultats du dosage des paramètres biochimiques et hématologiques pour <i>P.angulata</i>	80
III.8.3. Discussion.....	80
CHAPITRE IV: ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES PLANTES SELECTIONNEES.....	81
IV.1. INTRODUCTION – SCREENING PHYTOCHIMIQUE.....	81
IV.2. FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'ANISOPAPPUS CHINENSIS (PLANTE ENTIÈRE) ET PHYSALIS ANGULATA (FEUILLES).....	82
IV.2.1. Etude phytochimique d' <i>Anisopappus chinensis</i>	82
IV.2.2. Etude phytochimique de <i>Physalis angulata</i> (feuilles).....	118
CHAPITRE V: MATERIEL ET METHODES.....	127
V.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	127
V.2. SOLVANTS ET RÉACTIFS UTILISÉS:.....	129
V.3. PRÉPARATION DES EXTRAITS.....	130
V.3.1. Macération:.....	131
V.3.2. Décoction (extraits aqueux):.....	131
V.3.3. Percolation (en vue de l'isolement des principes actifs):.....	131
V.4. SCREENING PHYTOCHIMIQUE :.....	131
V.4.1. Test général des alcaloïdes en milieu acide.....	131
V.4.2. Test des alcaloïdes par chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	131
V.4.3. Test des flavonoïdes et acides phénols.....	132
V.4.4. Test des anthraquinones (Réaction de Borntrager).....	132
V.4.5. Test des Terpènes.....	133
V.4.6. Test des coumarines.....	133
V.4.7. Test des saponines (saponosides).....	134
V.4.8. Test des hétérosides cardiotoniques.....	134
V.4.9. Test des tanins galliques et catéchiques.....	135

V.4.10. Test des anthocyanes	135
V.5. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	135
V.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	135
V.5.2. Chromatographie sur couche mince préparative	136
V.5.3. Chromatographie liquide sur colonne ouverte.....	136
V.5.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	136
V.5.5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	137
V.6. TECHNIQUES DE DÉTERMINATION DE STRUCTURES DE COMPOSÉS ISOLÉS	138
V.6.1. Techniques spectroscopiques	138
V.7. TESTS PHARMACOLOGIQUES	139
V.7.1. Tests antiplasmodiaux in vitro	139
V.7.2. Test antiplasmodial ex-vivo (in vitro)	144
V.7.3. Test de cytotoxicité in vitro	146
V.7.4. Test d'hémolyse in vitro.....	147
V.7.5. Tests in vivo	148
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.1: TIMBRE FRANÇAIS CÉLÉBRANT "LE MONDE UNI CONTRE LE PALUDISME".....	6
FIGURE I.2: MALARIA, PAYS À RISQUE DE TRANSMISSION	8
FIGURE I.3: ANOPHÈLES GAMBIAE LORS DE SON REPAS SANGUIN	9
FIGURE I.4: DISTRIBUTION MONDIALE DES ANOPHÈLES VECTEURS DE LA MALARIA.	10
FIGURE I.5: DISTRIBUTION MONDIALE DE L'ESPÈCE PLASMODIUM FALCIPARUM.	11
FIGURE I.6: CYCLE ÉVOLUTIF DU PLASMODIUM	13
FIGURE I.7: SITES D'ACTION INTRA-CELLULAIRES DES PRINCIPAUX MÉDICAMENTS ANTIPALUDIQUES.	25
FIGURE I.8: DISTRIBUTION MONDIALE DE LA RÉSISTANCE DU <i>P. FALCIPARUM</i> AUX ANTIPALUDIQUES	28
FIGURE II.1 : CARTE DE LA R.D.CONGO : LES DIFFÉRENTES PROVINCES ENQUÊTÉES.....	33
FIGURE III.1: ANISOPAPUS CHINENSIS	48
FIGURE III.2: <i>ENTANDROPHRAGMA PALUSTRE</i>	51
FIGURE III.3: <i>MELIA AZEDARACH</i>	53
FIGURE III.4: <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	54
FIGURE III.5: <i>STRYCHNOS ICAJA</i>	57
FIGURE III. 6: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PARASITÉMIE DES DIFFÉRENTS EXTRAITS AUX JOURS 8 ET 9 (TEST SELON TONA ET AL.	63
FIGURE III.7: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PARASITÉMIE DES DIFFÉRENTS EXTRAITS AUX JOURS 4 ET 7 À LA DOSE DE 400MG/KG (TEST DE PETERS).....	64
FIGURE III.8: VARIATION DU POIDS (G) DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS MeOH D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400MG/KG (TEST DE PETERS).....	65
FIGURE III.9: VARIATION DU POIDS DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS CH ₂ CL ₂ D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE 400MG/KG (TEST DE PETERS)	65
FIGURE III.10: VARIATION DU POIDS DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS AQUEUX D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400 MG/KG (TEST DE PETERS).	66
FIGURE III.11: VIABILITÉ (%) DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS CH ₂ CL ₂ D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400MG/KG (TEST DE PETERS).	67
FIGURE III.12: VIABILITÉ (%) DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS AQUEUX D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400MG/KG (TEST DE PETERS).....	67
FIGURE III.13: VIABILITÉ (%) DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS MeOH D' <i>A. CHINENSIS</i> ET DE <i>P. ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400MG/KG (TEST DE PETERS).....	68
FIGURE III. 14: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA MATURATION DES TROPHOZOÏTES EN SCHIZONTES PAR DIFFÉRENTS EXTRAITS D' <i>A. CHINENSIS</i>	69
FIGURE III. 15: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA MATURATION DES TROPHOZOÏTES EN SCHIZONTES PAR DIFFÉRENTS EXTRAITS DE <i>P. ANGULATA</i>	70
FIGURE III.16: RELATION DOSE-EFFET CHEZ LES RATS MÂLES ET DISTRIBUTION DES POINTS EXPÉRIMENTAUX POUR <i>A. CHINENSIS</i>	75
FIGURE III.17: GRAPHIQUE DES RÉSIDUS DES RATS MÂLES POUR <i>A. CHINENSIS</i>	75
FIGURE III.18 : RELATION DOSE-EFFET ET DISTRIBUTION DES POINTS EXPÉRIMENTAUX DES RATS FEMELLES POUR <i>A. CHINENSIS</i>	76
FIGURE III.19: GRAPHIQUE DE RÉSIDUS DES RATS FEMELLES POUR <i>A. CHINENSIS</i>	76
FIGURE III.20: RELATION DOSE-EFFET ET DISTRIBUTION DE POINTS EXPÉRIMENTAUX POUR LES RATS MÂLES ET FEMELLES TRAITÉS PAR <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	78
FIGURE III.21: GRAPHIQUE DE RÉSIDUS POUR LES RATS MÂLES ET FEMELLES TRAITÉS PAR <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	78
FIGURE IV.1: SCHEMA D'EXTRACTION D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> PAR CH ₂ CL ₂ ET CCM DES FRACTIONS OBTENUES.	83
FIGURE IV.2: CCM DES FRACTIONS DE LA CLHP-PRÉPARATIVE DE M3.....	84
FIGURE IV.3: SPECTRE RMN- ¹ H DU COMPOSÉ M35 DANS LE CDCL ₃	85
FIGURE IV.4: SPECTRE RMN- ¹³ C DU COMPOSÉ M35 DANS LE CDCL ₃	85
FIGURE IV.5: SPECTRE DE MASSE (ESI, MODE NÉGATIF) DU COMPOSÉ M35.....	86

FIGURE IV.6: STRUCTURE DE L'ACIDE LINOLÉIQUE.....	86
FIGURE IV.7: SCHÉMA D'EXTRACTION DES ACIDES GRAS DANS L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ D'ANISOPAPPUS CHINENSIS.	87
FIGURE IV.8: CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES GRAS APRÈS MÉTHYLATION DE L'HUILE DE COLZA (RÉFÉRENCE) ..	88
FIGURE IV.9: CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE, APRÈS MÉTHYLATION, DE L'HUILE DE COLZA ET DE L'ACIDE γ- LINOLÉNIQUE (RÉFÉRENCE) COMPARÉS À L'EXTRAIT D'ACIDES GRAS D'ANISOPAPPUS CHINENSIS.	88
FIGURE IV.10: CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE, APRÈS MÉTHYLATION, DE L'HUILE DE PALME COMPARÉE À L'EXTRAIT D'ACIDES GRAS D'ANISOPAPPUS CHINENSIS (IDENTIFICATION DE L'ACIDE PALMITIQUE).	89
FIGURE IV.11: SCHÉMA D'EXTRACTION SÉQUENTIELLE D'ANISOPAPPUS CHINENSIS PAR LE CH ₂ CL ₂ SUIVI PAR UNE EXTRACTION AU MeOH.....	90
FIGURE IV.12: FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ D'ANISOPAPPUS CHINENSIS PROVENANT DE LA DEUXIÈME EXTRACTION. ...	90
FIGURE IV.13: CCM DU DEUXIÈME FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ D'ANISOPAPPUS CHINENSIS.	91
FIGURE IV.14 : SCHÉMA DE PURIFICATION PAR CLHP DE LA FRACTION A5/A6 ET CCM DE 9 FRACTIONS OBTENUES.	92
FIGURE IV.15: CHROMATOGRAMME LC-MS DES DEUX COMPOSÉS (PRÉCIPITÉ) DE LA FRACTION A5/A6	93
FIGURE IV.16: SPECTRE DE MASSE DU COMPOSÉ ML-A.	93
FIGURE IV.17: STRUCTURE DU COMPOSÉ ML-A	95
FIGURE IV.18: SPECTRE DE MASSE DU COMPOSÉ ML-B.....	95
FIGURE IV.19: CHROMATOGRAMMES COMPARÉS DES TROIS EXTRAITS D'ANISOPAPPUS CHINENSIS PAR CLHP- ANALYTIQUE.	97
FIGURE IV.20: CHROMATOGRAMME DE CLHP-PRÉPARATIVE DE L'EXTRAIT AU CH ₂ CL ₂ D'ANISOPAPPUS CHINENSIS	100
FIGURE IV.21: CCM DES FRACTIONS MAJORITAIRES (F61, F64).....	101
FIGURE IV.22: CHROMATOGRAMME (CLHP-ANALYTIQUE) DE LA FRACTION F61 DANS LE MeOH.....	102
FIGURE IV.23: SPECTRE UV DU PIC PRINCIPAL DE LA FRACTION F61).	102
FIGURE IV.24: SPECTRE DE MASSE (ES-) ET IONS FILLES DE F61 (CHRYSOSPLÉNOL B) (APRÈS TRAPPING)	104
FIGURE IV.25: SPECTRE RMN- ¹ H DU CHRYSOSPLÉNOL B DANS LE CD ₃ CN.....	105
FIGURE IV.26: SPECTRE HSQC DU CHRYSOSPLÉNOL B DANS LE CD ₃ CN.....	105
FIGURE IV.27: STRUCTURE DE LA FRACTION F61 (CHRYSOSPLÉNOL D) ET CORRÉLATIONS HMBC CLÉS.	106
FIGURE IV.28: CHROMATOGRAMME DE CLHP-ANALYTIQUE DE F64 (DANS LE MeOH)	107
FIGURE IV.29: SPECTRE UV À 350 NM DU PIC PRINCIPAL DE LA F64.	107
FIGURE IV.30: SPECTRE DE MASSE (ES-) ET IONS FILLES DU COMPOSÉ F64 (APRÈS TRAPPING).	108
FIGURE IV.31: SPECTRE DE MASSE (ES-) ET IONS FILLES DE L'ION MAJORITAIRE (APRÈS TRAPPING).....	109
FIGURE IV.32: SPECTRE RMN- ¹ H DE F64 DANS LE CD ₃ CN	110
FIGURE IV.33: SPECTRE HMBC DE F64 DANS LE CD ₃ CN.	110
FIGURE IV.34: STRUCTURE POSSIBLE DU COMPOSÉ F64.	111
FIGURE IV.35: CHROMATOGRAMMES DE DEUX EXTRAITS MÉTHANOLIQUES: ROUGE: PERCOLATION SÉQUENTIELLE; BLEU: PERCOLATION DIRECTE.	112
FIGURE IV. 36: CHROMATOGRAMME RÉPRÉSENTANT LES DIFFÉRENTS ACIDES PHÉNOLS AYANT UN SPECTRE UV SIMULAIRE À L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE (EXTRAIT MeOH D'ANISOPAPPUS CHINENSIS À 330 NM).....	113
FIGURE IV.37: SPECTRE UV DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE À 330 NM.	114
FIGURE IV.38: CHROMATOGRAMMES DES SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE ET LEUR T _R (ACIDES PHÉNOLS ET FLAVONOÏDES SOUS FORME HÉTÉROSIDIQUE) À 330 NM.....	114
FIGURE IV.39: CHROMATOGRAMME DES DIFFÉRENTS ACIDES PHÉNOLS (À 330 NM) IDENTIFIÉS DANS L'EXTRAIT MeOH.	115
FIGURE IV.40: DROITE DE CALIBRATION DU DOSAGE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE	115
FIGURE IV.41: STRUCTURES DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET DES ACIDES ISOCHLOROGÉNIQUES.....	116
FIGURE IV.42: SCHÉMA D'EXTRACTION DE L'EXTRAIT DICHLOROMÉTHANE DE PHYSALIS ANGULATA	118
FIGURE IV.43: SCHÉMA DE FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ DE PHYSALIS ANGULATA.....	119
FIGURE IV. 44 : SCHÉMA DE PURIFICATION ET D'ISOLEMENT DE LA FRACTION P6	120
FIGURE IV.45: SCHÉMA DE FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ DE PHYSALIS ANGULATA (2 ^e ESSAI).....	121
FIGURE IV.46: SCHÉMA DE PURIFICATION DE LA FRACTION P15.	121
FIGURE IV.47 : STRUCTURE DE LA PHYSALINE B.	122
FIGURE IV.48 : STRUCTURE DE LA PHYSALINE F.....	122
FIGURE IV.49: CHROMATOGRAMME DE LA PHYSALINE B ISOLÉE DE PHYSALIS ANGULATA.	124

FIGURE IV.50 : CHROMATOGRAMME DE L'EXTRAIT CH ₂ CL ₂ DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	125
FIGURE IV.51: DROITE DE CALIBRATION DE LA PHYSALINE B ISOLÉE DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	125
FIGURE V.1: RÉACTION DE LA TRANSFORMATION DE PYRUVATE ET FORMATION DE BLEU DE FORMAZAN	144
FIGURE V.2: RÉACTION DE FORMATION DU FORMAZAN	147

LISTE DES TABLEAUX

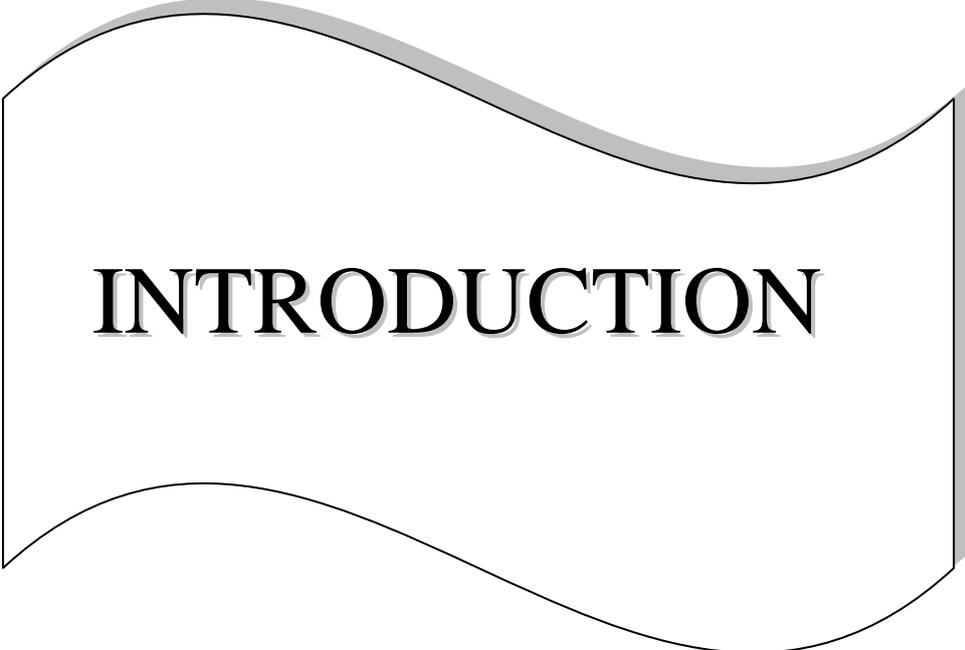
TABLEAU I.1: ECHECS THÉRAPEUTIQUES AVEC LA CHLOROQUINE ET LA SULFADOXINE –PYRIMETHAMINE CHEZ LES ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS DANS SEPT SITES SENTINELLES.	15
TABLEAU II.1: FAMILLES LES PLUS COURAMMENT RENCONTRÉES AU COURS DE NOTRE ENQUÊTE.	35
TABLEAU II. 2: ESPÈCES COURAMMENT UTILISÉES CONTRE LA FIÈVRE, LA MALARIA, L'INFLAMMATION, LES CÉPHALÉES, DANS LES DIFFÉRENTS SITES DE L'ENQUÊTE ETHNOBOTANIQUE ET POURCENTAGE DE CITATION SUR L'ENSEMBLE DU PAYS.	36
TABLEAU II.3: LISTE DES ESPÈCES RÉPERTORIÉES POUR LEUR UTILISATION CONTRE LA FIÈVRE, L'INFLAMMATION, LES CÉPHALÉES, LA MALARIA, ET DESCRIPTION DE L'ENSEMBLE DE LEURS UTILISATIONS TRADITIONNELLES.	38
TABLEAU II. 4: RELEVÉ BIBLIOGRAPHIQUE DES TRAVAUX RÉALISÉS SUR LES ESPÈCES RÉPERTORIÉES PENDANT L'ENQUÊTE ETHNOBOTANIQUE.	43
TABLEAU III.1: DONNÉES PHYTOCHIMIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DE <i>P.ANGULATA</i>	55
TABLEAU III.2: RENDEMENT EN POURCENTAGE (%) DES DIFFÉRENTS EXTRAITS TOTAUX PRÉPARÉS (EXTRACTION NON SÉQUENTIELLE).	58
TABLEAU III.3: RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DE DIFFÉRENTS EXTRAITS OBTENUS PAR EXTRACTION NON SÉQUENTIELLE (CI_{50}); DE LA CYTOTOXICITÉ ET DÉTERMINATION DE L'INDEX DE SÉLECTIVITÉ (IS).....	59
TABLEAU III.4: COMPARAISON DES RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE <i>IN VITRO</i> SUR LA SOUCHE 3D7 DES EXTRAITS TOTAUX OBTENUS PAR EXTRACTION SÉQUENTIELLE ET NON SÉQUENTIELLE D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> . LES NUMÉROS CORRESPONDENT À L'ORDRE D'EXTRACTION.	60
TABLEAU III.5: RÉSULTATS DE TEST D'HÉMOLYSE DES EXTRAITS D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> ET DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i> EXPRIMÉS EN POURCENTAGE.	60
TABLEAU III.6: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PARASITÉMIE AUX JOURS 8 ET 9 À LA DOSE DE 300 MG/KG. P VALUE CALCULÉE SELON LE TEST DE T-STUDENT PAR RAPPORT AU TEST SELON TONA ET AL.	62
TABLEAU III.7: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PARASITÉMIE DE DIFFÉRENTS EXTRAITS À LA DOSE DE 400 MG/KG AUX JOURS 4 ET 7. P VALUE CALCULÉE SELON LE TEST DE T-STUDENT PAR RAPPORT AU TEST DE PETERS).....	63
TABLEAU III.8 : VARIATION DU POIDS MOYEN (G) DES SOURIS TRAITÉES À LA DOSE DE 400 MG/KG (TEST DE PETERS).	64
TABLEAU III.9: VIABILITÉ (%) DES SOURIS TRAITÉES AUX EXTRAITS DE <i>A.CHINENSIS</i> ET <i>P.ANGULATA</i> À LA DOSE DE 400 MG/KG, DU JOUR 4 AU JOUR 28 (TEST DE PETERS).	66
TABLEAU III.10: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA MATURATION DES TROPHOZOÏTES EN SCHIZONTES PAR DIFFÉRENTS EXTRAITS D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i>	69
TABLEAU III.11: POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA MATURATION DES TROPHOZOÏTES EN SCHIZONTES PAR DIFFÉRENTS EXTRAITS DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	70
TABLEAU III.12: CONCENTRATIONS INHIBITRICES 50 (CI_{50}) DES EXTRAITS D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> ET DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	71
TABLEAU III.13: ADMINISTRATION UNIQUE DE DOSES VARIABLES DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> CHEZ LES RATS WISTAR MÂLES ET FEMELLES (TOXICITÉ AIGUE).	72
TABLEAU III.14: ADMINISTRATION UNIQUE DE DOSES VARIABLES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i> CHEZ DES RATS WISTAR MÂLES ET FEMELLES (TOXICITÉ AIGÛE).	73
TABLEAU III.15: DÉTERMINATION DE LA DOSE LÉTALE 50 DE L'EXTRAIT AQUEUX D' <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> . (DONNÉES EXPÉRIMENTALES).....	74
TABLEAU III.16: DIFFÉRENTS MODÈLES DE RÉGRESSION ET LEURS PARAMÈTRES CHEZ LES RATS MÂLES POUR <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i>	74
TABLEAU III.17: DIFFÉRENTS MODÈLES DE RÉGRESSION ET LEURS PARAMÈTRES CHEZ LES RATS FEMELLES POUR <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i>	76
TABLEAU III.18: DÉTERMINATION DE LA DOSE LÉTALE 50 DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i> . (DONNÉES EXPÉRIMENTALES).....	77
TABLEAU III.19: DIFFÉRENTS MODÈLES DE RÉGRESSION ET LEURS PARAMÈTRES EXPÉRIMENTAUX POUR LES RATS MÂLES ET FEMELLES TRAITÉS PAR <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	77
TABLEAU III.20: VALEUR DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES ET HÉMATOLOGIQUES DES RATS MÂLES ET FEMELLES TRAITÉS PAR <i>A.CHINENSIS</i>	79

TABLEAU III.21: VALEURS DES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES ET HÉMATOLOGIQUES DES RATS MÂLES ET FEMELLES TRAITÉS PAR <i>P. ANGULATA</i> .	80
TABLEAU IV.1: SCREENING PHYTOCHIMIQUE PRÉLIMINAIRE DES PLANTES SÉLECTIONNÉES.	81
TABLEAU IV.2: DÉPLACEMENTS CHIMIQUES (PPM) RMN- ¹ H, ¹³ C ET CORRÉLATIONS HBMC, COSY (DANS CD ₃ CN) DU COMPOSÉ ML-A.	94
TABLEAU IV.3 : CONDITIONS CLHP UTILISÉES POUR LA SÉPARATION DES FLAVONOÏDES.	97
TABLEAU IV.4: GRADIENT UTILISÉ	98
TABLEAU IV.5: GRADIENT UTILISÉ	98
TABLEAU IV.6: GRADIENT UTILISÉ	99
TABLEAU IV.7: GRADIENT UTILISÉ	99
TABLEAU IV.8: GRADIENT UTILISÉ	99
TABLEAU IV.9: CONDITIONS DE LA CLHP-PRÉPARATIVE	100
TABLEAU IV.10: CONDITIONS CLHP POUR L'ANALYSE DES FRACTIONS F61 ET F64.	101
TABLEAU IV.11: CONDITIONS CLHP POUR L'ANALYSE LC-SPE-NMR-MS DE LA FRACTION F61.	103
TABLEAU IV.12: DÉPLACEMENTS CHIMIQUES RMN ¹ H ET ¹³ C DU CHRYSOSPLÉNOL B (ND = NON DÉTERMINÉ) DANS LE CD ₃ CN.	106
TABLEAU IV.13: CONDITIONS CLHP UTILISÉES.	111
TABLEAU IV.14: CONDITIONS CLHP UTILISÉES	113
TABLEAU IV.15. QUANTITÉ (%) D'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET DÉRIVÉS PRÉSENTS DANS <i>ANISOPAPPUS CHINENSIS</i> .	116
TABLEAU IV.16: VALEURS (PPM) RMN- ¹ H, ¹³ C ET HMBC DE LA PHYSALINE B PROVENANT DE LA SOUS-FRACTION PE. (DANS CDCl ₃).	123
TABLEAU IV.17: CONDITIONS CLHP UTILISÉES.	124
TABLEAU V.1 : PLANTES SÉLECTIONNÉES, FAMILLES, NOMS VERNACULAIRES, PARTIE UTILISÉE, LIEU DE RÉCOLTE, PÉRIODE DE RÉCOLTE, NUMÉRO D'HERBIER ET TYPE DE PLANTE.	128
TABLEAU V.2: SOLVANTS ET RÉACTIFS UTILISÉS LORS DU SCREENING PHYTOCHIMIQUE PRÉLIMINAIRE ET DE L'EXTRACTION.	129
TABLEAU V.3: CLASSIFICATION DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE DES EXTRAITS DE PLANTES ET DES COMPOSÉS PURS ISOLÉS.	140

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^{13}C	Carbone 13
^1H	Proton
Ac	Acide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine- aminotransférase
ASAT	Aspartate amino-transaminase
CD_3Cl_3	Chloroforme deutéré
CD_3CN	Acétonitrile deteuré
CD_3COCD_3	Acétone déteuré
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
CH_3COCH_3	Acétone
CH_3COOH	Acide acétique
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
COSY	Correlation spectroscopy
DDT	Dichlorodiphenyl trichloroéthane
DMSO-d6	Dimethylsulfoxyde deuteré
ES-	Electrospray négatif
ES+	Electrospray positif
ETOA _{Ac}	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
GOT	Glutamate- oxaloacetate- transaminase
GPT	Glutamte- puryvate- transaminase
H_2O	Eau
Hb	Hémoglobine
HCOOH	Acide formique
HCT	Hématocrite
HgCl_2	Chlorure de Mercure
HIV	Human immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear multiple bound correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectroscopy
LC-SPE-NMR-MS	Liquid Chromatography Solid Phase Extraction Nuclear Magnetic Resonance Mass Spectroscopy
MEOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MS	Mass spectroscopy
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ODS	Octadécyl silane
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Phospahte buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
RBM	Roll Back Malaria
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SIDA	Syndrom d'immunodéficience acquise
TFA	Trifluoro acetic acid
T _G	Temps gradient
TNF	Tumor Necrosis Factor
T _R	Temps de rétention
UI/l	Unité international/litre
UV/Vis	Ultraviolet/visible
WHO	World health organization



INTRODUCTION

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL

La majorité des plantes dénombrées dans la banque de données NAPRALERT se retrouve dans les régions tropicales et subtropicales du globe et 58% de ces espèces n'ont pas encore fait l'objet d'études biologiques et chimiques approfondies (Cordel et Quinn-Beattie, 2005). Les investigations sur les espèces végétales peuvent être menées suivant différentes approches: chimiotaxonomique, ethnopharmacologique et pharmacologique. Une observation particulière et un choix judicieux des plantes permettent souvent d'aboutir à de nouvelles substances bioactives intéressantes, source de nombreux médicaments traitant diverses maladies.

La République Démocratique du Congo possède une grande richesse en biodiversité végétale et l'expérience a montré que cette richesse associée aux connaissances thérapeutiques traditionnelles pourrait, comme ce fut le cas pour la quinine et l'artémisinine ouvrir la porte à de nouvelles thérapeutiques antipaludiques. Il faut savoir que le paludisme est un fléau qui touche particulièrement les pays du sud (Afrique tropicale et subtropicale ainsi que l'Asie) dans lesquels les populations éprouvent de grandes difficultés d'accès aux soins de santé.

Nous avons donc décidé de rechercher au sein de la biodiversité végétale congolaise, de nouvelles molécules à potentialité antipaludique en nous servant de l'approche ethnopharmacologique. Celle-ci consiste à étudier l'activité d'une plante ou d'un extrait de plantes en fonction de son usage médico-traditionnel ou de sa toxicité afin de sélectionner la ou les espèces les plus intéressantes.

Ainsi l'ethnopharmacologie se définit comme étant: « l'étude scientifique, interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier l'état des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques ». L'ethnopharmacologie est située à l'interface des sciences humaines et des sciences de la vie, respectant la tradition mais résolument ouverte vers l'innovation. Elle aborde l'étude des médecines traditionnelles et de leurs pharmacopées sous un éclairage nouveau (Dos santos et Fleurentin, 1991).

Les termes ethnopharmacologie et ethnobotanique sont souvent confondus, alors que ce dernier serait défini comme étant « l'étude de l'usage que les populations indigènes font des plantes » que celles-ci soient alimentaires, toxiques, curatives, décoratives ou autres

(Sévenet, 1994).

Une étude effectuée aux USA à l'Université de l'Illinois (Chicago) en 2001 a montré que parmi les substances médicamenteuses trouvées sur le marché, 122 proviendraient de plantes (de 94 espèces différentes). Parmi ces molécules d'origine naturelle, 80% ont été utilisées aux mêmes fins ou à des fins similaires à celles pour lesquelles les plantes d'origine étaient utilisées en médecine traditionnelle (Fabricant et Farnsworth, 2001). Cela montre bien que l'utilisation des plantes fait partie intégrante des traditions de toutes les cultures et que la valorisation médicinale de ces pratiques est donc très intéressante. L'étude des remèdes traditionnels antipaludiques utilisés par ces populations est donc prioritaire et pourrait aboutir à une valorisation des usages traditionnels et/ou à une découverte de nouvelles molécules puissantes à potentiel antipaludique.

C'est dans cette optique que se situe notre travail de thèse qui s'attèle à l'étude de deux espèces très utilisées en médecine traditionnelle congolaise dans le traitement de la fièvre, des céphalées, de l'inflammation et de la malaria. Il s'agit d'*Anisopappus chinensis* (Asteraceae) et de *Physalis angulata* (Solanaceae).

Notre travail vise donc à :

- Prouver et confirmer l'utilisation de ces plantes comme antipaludiques par la population congolaise,
- Mettre en évidence l'activité antiplasmodiale des différents extraits,
- Identifier et isoler le ou les composés responsables de l'activité antiplasmodiale,
- Déterminer la ou les structures de ces composés,
- Evaluer la toxicité *in vivo* et la cytotoxicité *in vitro* des extraits et des composés isolés.

Nous avons organisé nos travaux en cinq chapitres et chaque chapitre est clôturé par une discussion.

- Le chapitre I est consacré à une introduction sur la malaria,
- Le chapitre II traite de l'étude ethnobotanique,
- Le chapitre III traite de la pharmacologie des plantes sélectionnées lors de l'étude ethnobotanique (résultats des essais pharmacologiques),
- Le chapitre IV traite de l'étude phytochimique approfondie d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata*,

INTRODUCTION

- Le chapitre V décrit le matériel utilisé et les différentes techniques (matériel et méthodes),

-

A la fin de ce travail, nous présentons les conclusions et perspectives issues de nos recherches



CHAPITRE I:
MALARIA

CHAPITRE I: MALARIA

I.1. Définition

La malaria est une maladie infectieuse causée par un hémato protozoaire de la famille des *Plasmodiidae*, du genre *Plasmodium*, elle est transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles*. Il peut également y avoir transmission par une aiguille contaminée par du sang infecté ou lors d'une transfusion sanguine.

Malaria ou mal-aria (en Italien : mauvais air) appelé également fièvre des marais ou paludisme (du latin : palus = marais) est le nom donné officiellement à l'infection plasmodiale, qui évoque ainsi une responsabilité des eaux de surfaces. (Wéry, 1995)

Elle est caractérisée par plusieurs symptômes, à savoir: états fébriles cycliques, frissons, nausées, vomissements, sudations, céphalées, diarrhées, courbatures, splénomégalie, anémie, jaunisse etc.

Elle se complique par passage d'un état simple à un état grave, accompagné souvent d'une anémie grave, d'une insuffisance rénale, d'un coma, de fortes fièvres, d'une atteinte du système nerveux central, de problèmes respiratoires entraînant souvent la mort de l'individu. Les personnes les plus touchées sont les enfants de moins 5ans, les adultes non immuns et les femmes enceintes.

I.2. Historique

La malaria est aussi ancienne que l'apparition de l'homme (Carter et al, 2002 ; Su et al, 2003 ; Wéry 1995). Hippocrate en avait fait une description extrêmement précise en parlant de fièvres atrabilaires (bile noire). Ces fièvres périodiques étaient déjà décrites en Egypte ancienne (Bruce-Chwatt, 1986), en Grèce antique ainsi qu'en Chine ancienne où une description particulièrement imagée en avait déjà été faite.

En 1717, Lancisi confirma le rôle des moustiques des marécages dans la transmission de la maladie tout en imputant celle-ci à un poison qui serait contenu dans leurs pièces buccales.

La même année, Morton et Giovanni Lancisi rédigèrent un mémoire dans lequel ils décrivaient la présence d'un "pigment malarique" dans la rate et dans le cerveau, dont plusieurs auteurs feront d'ailleurs l'observation par la suite.

En 1880, le médecin français Alfonse Laveran, observa pour la première fois dans la préparation du sang d'un malade fiévreux, en plus du pigment malarique connu, des filaments très mobiles s'agitant autour des globules rouges et sortant par exflagellation. La description était rendue décisive par l'utilisation du colorant de Ramanovsky dans lequel le bleu de méthylène d'Ehrlich était remplacé par un colorant polychromatique distinguant la coloration du noyau en rouge et du cytoplasme en bleu.

En 1884, dans son "*Traité des fièvres palustres*" qui constitue la première édition de son "*Traité du paludisme*", paru en 1897, Alfonse Laveran attribua définitivement aux moustiques l'origine de la propagation de la malaria.

C'est en 1897 que le médecin britannique Ronald Ross en apporta la preuve expérimentale en disséquant des moustiques nourris sur un patient dans le sang duquel il avait observé des formes en croissant (gamétocytes de *P. falciparum*). Il constata en effet autour de l'estomac des moustiques l'apparition de cellules pigmentées qui croissaient de jour en jour.

Partant des travaux précédents, en 1898, l'italien Giovanni Battista Grassi décrivit les quatre espèces principales infectant l'homme, et montra comment le parasite infectait l'homme.

En 1948, Henry Edward Shortt et Percy Cyril Claude Garnham découvrirent le stade préliminaire du développement du parasite (*P. cynomolgi*) dans le foie (stade pré-érythrocytaire). Le cycle complet des *Plasmodium* était donc enfin décrit.

L'observation faite par des Jésuites sur les "indiens" d'Amérique du Sud qui consommaient les écorces d'une plante en cas de frissons et fièvre a ouvert la porte à la découverte des propriétés de l'écorce du genre *Cinchona* ou Quinquina (Guerra 1977; Desowitz 1999; Dousset 1985). Il s'agit d'un arbre originaire d'Amérique du sud (cordillères des Andes) aujourd'hui planté dans plusieurs régions du monde dont l'écorce utilisée jadis dans la lutte contre la fièvre, fut introduite en Europe au XVIIe siècle et également y fut utilisée pour guérir la "fièvre". L'isolement de la quinine en 1820 par les pharmaciens Français Pelletier et Caventou à partir de cette drogue a élargi son champ d'utilisation.

En 1865, Charles Ledger, acquit des graines de quinquina au Pérou. Malheureusement, les anglais manifesteront peu d'intérêt pour celles-ci, et ce seront les hollandais qui développeront les plantations des alcaloïdes du quinquina avec un succès croissant jusqu'à la deuxième guerre mondiale.

En 1891, Paul Ehrlich (prix Nobel en 1908) guérit deux patients atteints du paludisme avec le bleu de méthylène. Il s'agissait d'un premier succès d'un produit synthétique pour guérir des humains. A partir de 1920, débuta la recherche de nouveaux médicaments synthétiques, principalement en Allemagne par la firme Bayer. La plasmaquine, la quinacrine, et en 1934, la résochine qui fut ensuite abandonnée car on jugeait son index thérapeutique trop faible furent mises au point. La résochine, néanmoins, suite à la prise des plantations de quinquina de Java, fut réétudiée et soumise à de nouvelles études cliniques, et finalement rebaptisée « chloroquine » et commercialisée avec succès.

Entre 1930-1950, outre la chloroquine, de nombreuses molécules antipaludiques furent synthétisées dont la pyriméthamine et le proguanil, et 30 ans plus tard d'autres dérivés de la quinine furent synthétisés à savoir: la méfloquine, l'halofantrine et la lumefantrine. Parallèlement, entre 1939-1940, eut lieu la découverte des propriétés insecticides du DDT par le chimiste suisse Paul Müller (prix Nobel en 1944).

Aux Etats-Unis et en Europe, la malaria fut éradiquée au cours du XX^e siècle. Vers les années 1950-1970, l'organisation mondiale de la santé (OMS) lança son programme global d'éradication du paludisme: "le monde uni contre le paludisme" (**Figure I.1**).



Figure I.1: Timbre français célébrant "le monde uni contre le paludisme".

Vers les années 1960, le programme rencontra des difficultés liées à la toxicité des insecticides utilisés dans la lutte contre les moustiques et à l'apparition de résistances des parasites à la chloroquine et des moustiques au DDT. Suite à ces difficultés, en 1970, la lutte changea de nom, on ne parla plus que de contrôle du paludisme et non d'éradication (Greenwood et Mutabingwa, 2002).

En 1972, les chimistes chinois isolèrent de l'artémisinine de la plante *Artemisia annua*, une plante utilisée depuis plus de 2000 ans en médecine traditionnelle chinoise pour soigner la malaria. Cette substance présentait néanmoins une biodisponibilité incomplète et celle-ci fut améliorée par des dérivés hémi-synthétiques possédant une meilleure biodisponibilité. Mais leur courte biodisponibilité ainsi que le risque d'apparition de résistance ont conduit l'OMS à recommander la limitation de leur utilisation en monothérapie d'où l'actuelle recommandation de les utiliser en association avec d'autres antipaludiques sous forme de combinaison à base d'artémisinine (ACT: "*artemisinin-based combination treatment*") (Miller, 2011).

I.3. Malaria dans le monde

En 2010, 106 pays étaient répertoriés dans des zones à risques de paludisme et près de la moitié de la population mondiale est exposée à ce fléau, 216 millions de cas étant enregistrés avec 2-3 millions de cas graves et 500 000 à 900 000 morts (WHO, World Malaria Report 2011).

Le paludisme tue donc plus de 500 000 individus dans les zones endémiques chaque année, les enfants de moins de cinq ans étant les plus touchés. L'Afrique tropicale ou subtropicale regroupe plus de 80% des cas et 90% de mortalité (Greenwood et al, 2005, Steketee et al., 1996 ; Fidock et al, 2004).

Par ailleurs, si l'on considère les effets indirects du paludisme et ses manifestations corrélées à d'autres maladies, le nombre de décès serait encore plus important que celui communiqué chaque année (Rogers et al., 2002; Hay et al., 2004; Christopher et al., 2012).

Sur le continent africain, grandement exposé (**Figure I.2**), la malaria constitue la première cause de morbidité et de mortalité, elle contribue grandement au sous développement et à la pauvreté, et instaure de la sorte un grand obstacle au développement socio-économique. Il a ainsi été estimé que la malaria coûte à l'Afrique plus de 12 milliards de dollars américains chaque année (Dorsey et al., 2000; Bloland et al., 2002).

Dès le début des années 1990, grâce à une prise de conscience mondiale dans la prise en charge du paludisme et des autres maladies négligées, et dans le but de faire reculer le paludisme, diminuer sa mortalité et sa morbidité, les organismes fondateurs de *Roll Back Malaria (RBM)* et le plan d'action de la déclaration d'Abuja au Nigéria, ont développé de

nouveaux moyens pour faire reculer la malaria, la tuberculose et le VIH/SIDA, dans le monde (Ridley, 2001; 2002).

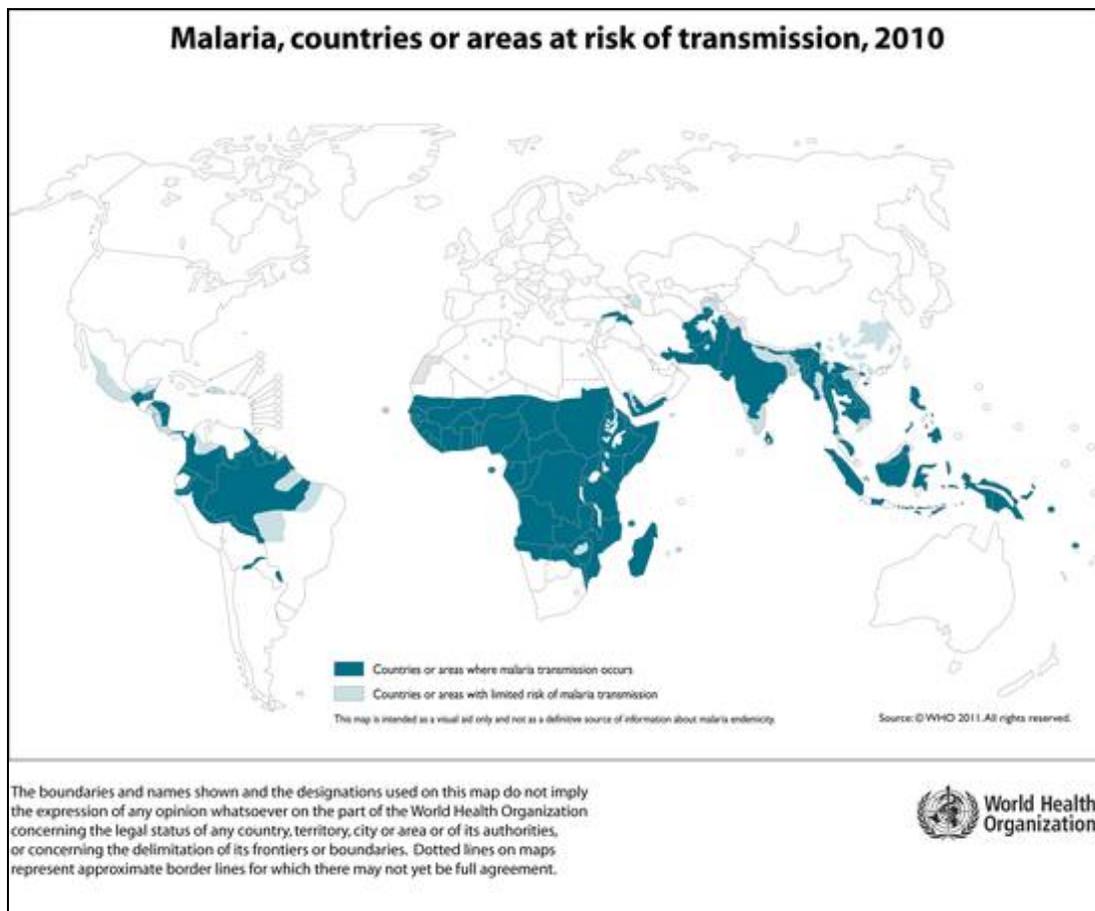


Figure I.2: Malaria, pays à risque de transmission (OMS, 2011)

Depuis ces dix dernières années, l'Afrique est menacée par la dégradation de son système sanitaire, par le manque d'infrastructures, par les changements climatiques, par les guerres et par les manifestations d'autres pathologies graves (VIH/SIDA). Tout cela défavorise donc l'immunité et fait se développer la malaria dans les zones présentant des températures supérieures à 18°C et un haut taux d'humidité (où le *P. falciparum* reste impliqué dans plus 90% de cas) (Greenwood et al., 2005).

I.4. Epidémiologie

La malaria constitue un problème majeur de santé publique dans les pays endémiques, particulièrement les pays de l'Afrique subsaharienne à climat tropical et sub-tropical. 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 (Jonathan, 2006;

Pascual, 2006). La transmission peut se faire aussi en l'absence des moustiques, par exemple dans le cas de la femme enceinte avec la transmission congénitale via le placenta (Menendez, 1994).

I.5. Les vecteurs

Comme signalé dans la définition, le vecteur de la maladie est un insecte femelle de l'ordre des diptères, de la famille de *Culicidae*, de la sous famille des *Anophelinae* et du genre *Anopheles* (**Figure I. 3**). Il existe environ 3500 espèces de moustiques groupés dans 41 genres. Parmi ceux-ci, le genre Anophèle compte au moins 430 espèces, dont 30-40 espèces (**Figure I. 4**) sont capables de transmettre la maladie chez les humains (CDC).

L'espérance de vie d'un anophèle est de 2-3 semaines. Les anophèles qui survivent pendant un temps assez long permettent l'accomplissement du cycle du *Plasmodium* (ex: 10 jours à 25°C pour le *P. falciparum*)



Figure I.3: *Anopheles gambiae* lors de son repas sanguin

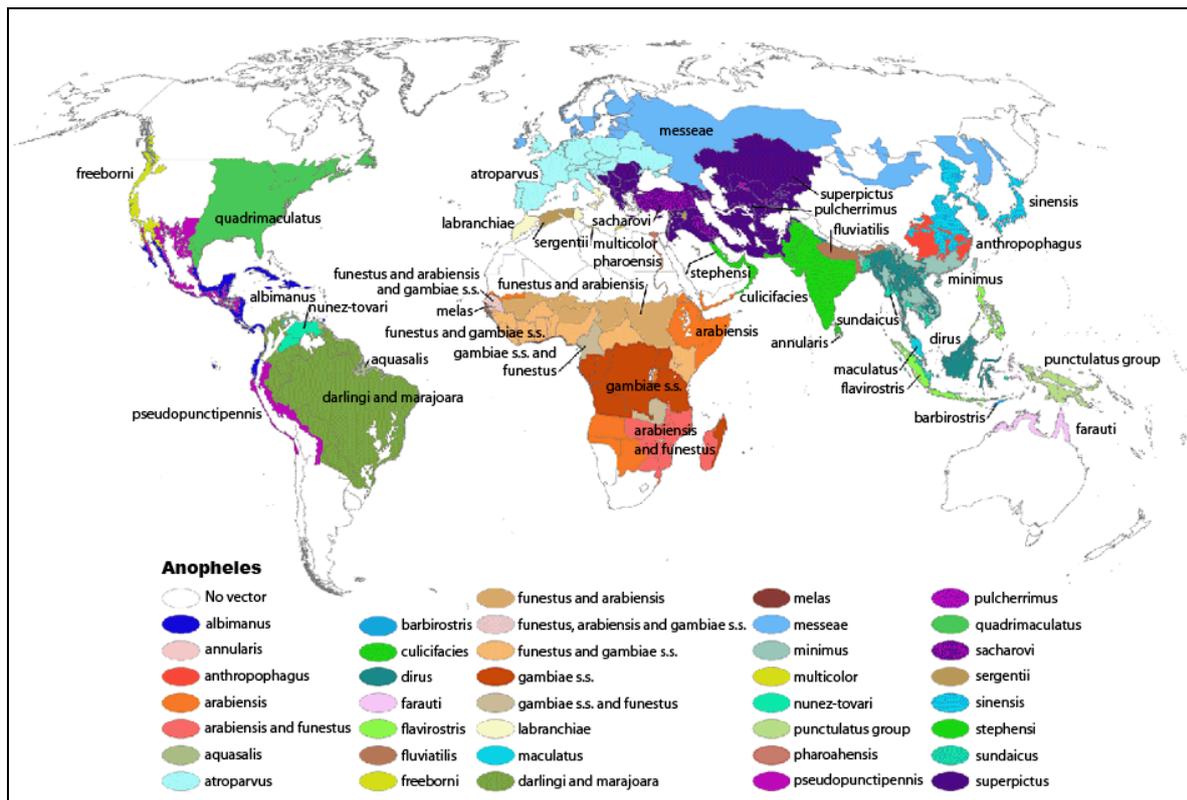


Figure I.4: Distribution mondiale des anophèles vecteurs de la malaria. (Extrait de Kiszewski et al., 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70(5):486-498).

I.6. Le *Plasmodium*

Le *Plasmodium* est un parasite intracellulaire amiboïde, de l'embranchement des Sporozoaires ou *Apicomplexa*. Il est de l'ordre des *Heamosporidea*, ce dernier n'étant composé que d'une seule famille: les *Plasmodiidae*; plusieurs genres sont décrits, le genre *Plasmodium* possédant des caractéristiques particulières à savoir le stade gamécyte mâle et femelle de morphologie différente.

Les espèces du genre *Plasmodium* sont groupées en 9 sous-genres parasitant les vertébrés et dont 3 parasitent les mammifères :

- *Vinckeia*: parasite des antilopes, rongeurs et autres mammifères à l'exception des primates, certaines espèces de ce sous-genre constituent un modèle de laboratoire très utilisé,

- *Plasmodium*: parasites des primates, les espèces infectant l'homme sont *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*,

- *Laverania* : parasites des primates, l'espèce *P. falciparum* infecte l'homme.

Quatre sous-genres parasitent les oiseaux et deux les sauriens. Il existe au total plus de 140 espèces de *Plasmodium* qui se différencient par leur cycle évolutif surtout dans la phase de schizogonie intra érythrocytaire.

Il existe donc quatre espèces pathogènes pour l'homme: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. falciparum* mais il a été confirmé récemment que *P. knowlesi* (parasite des primates en Asie du Sud- Est, du sous-genre *Plasmodium*) est également capable d'infecter l'homme. (Singh et al., 2004; Cox- singh et al., 2008, Chitnis and Miller, 1994).

I.6.1. Les espèces de *Plasmodium* humain

I.6.1.1. *P. falciparum*

Responsable de la "fièvre tierce maligne", présente dans la zone tropicale et subtropicale, elle est la plus dangereuse de toutes les espèces qui infectent l'homme. Elle peut provoquer des complications mortelles, qui surviennent surtout en Afrique. Cette espèce a également développé une résistance aux antipaludiques d'usage courant (**Figure I.5**) (Gardner et al., 2002; Snow et al., 2005)

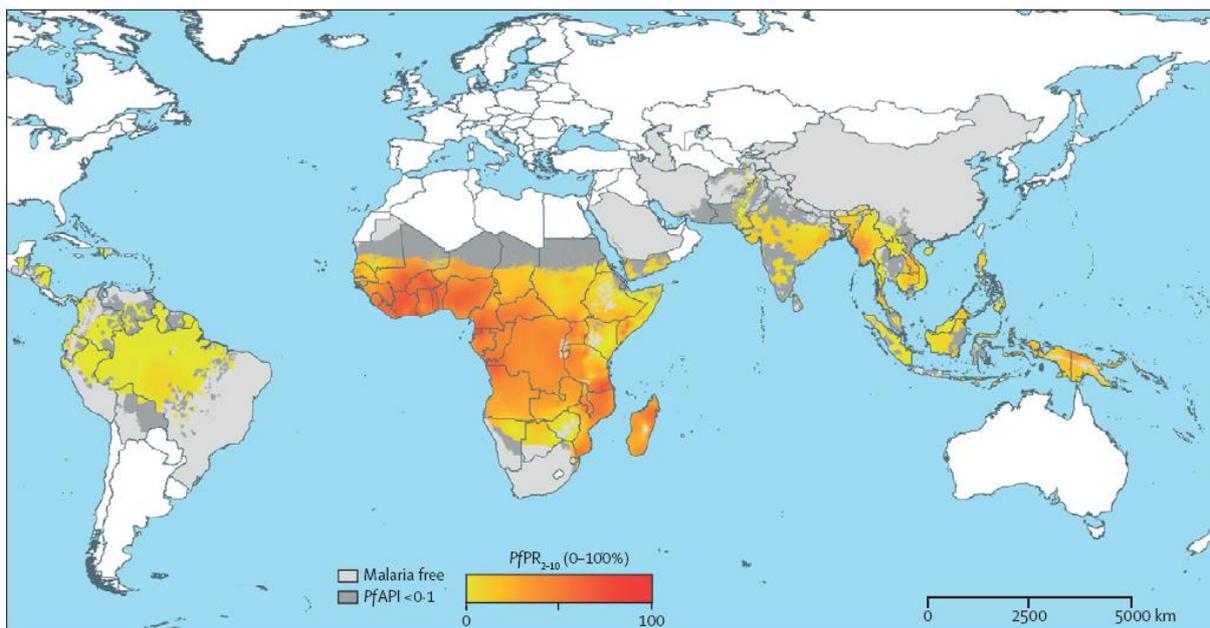


Figure I.5: Distribution mondiale de l'espèce *Plasmodium falciparum*. Source: Infection-related stillbirths. Robert L Goldenberg, Elizabeth M McClure, Sarah Saleem, Uma M Reddy, the lancet 2010, 375: 1482-1490.

I.6.1.2. *P. malariae*

Responsable de la "fièvre quarte bénigne", sa période d'incubation est très longue, elle est mondialement distribuée mais son incidence par rapport au *P. falciparum* est faible. Elle est impliquée dans des infections chroniques qui peuvent provoquer des réactions immunologiques entraînant parfois des complications rénales (Muller et al, 2007).

I.6.1.3. *P. vivax*

Responsable de la "fièvre tierce bénigne", on la retrouve essentiellement en Asie et en Amérique latine ainsi qu'en Afrique du Nord. Elle tolère de plus faibles températures que les autres espèces et s'adapte donc plus facilement aux climats plus tempérés. Elle a par ailleurs la capacité de produire des hypnozoïtes (comme *P. ovale*) dans le foie. Ceux-ci peuvent y subsister pendant plusieurs années (forme de dormance) (Krotoski et al., 1982).

I.6.1.4. *P. ovale*

C'est l'espèce la plus rare et la plus sensible à l'immunité humaine, son cycle est très semblable à celui de *P. falciparum* et *P. malariae* mais elle est moins dangereuse que *P. falciparum* et elle produit des hypnozoïtes comme *P. vivax* (Chin et al 1971). Elle est retrouvée en Afrique subsaharienne.

I.6.1.5. *P. knowlesi*

Son cycle ne dure que 24 heures, il est présent en Asie du Sud-Est où les macaques (*Macaca nemestrina* et *Macaca fuscicularis*) sont les hôtes habituels de cette espèce.

I.7. Cycle évolutif du *Plasmodium*

Il présente deux phases: une phase asexuée qui se passe chez l'hôte vertébré et est subdivisée en deux sous phases (phase exo-érythrocytaire et phase intra-érythrocytaire) et une phase sporogonique se déroulant chez l'hôte invertébré (moustique anophèle) (**Figure I.6**)

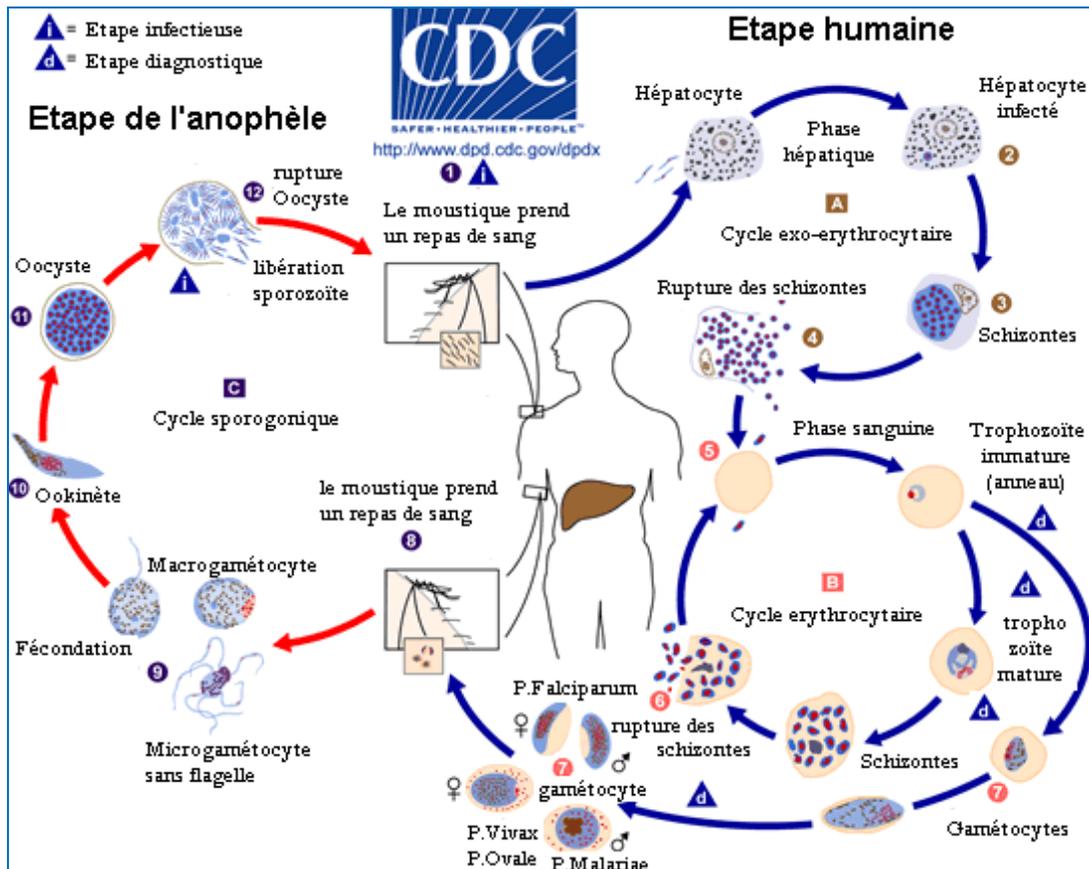


Figure I.6: Cycle évolutif du *Plasmodium* (Source: CDC, www.cdc.gov)

I.7.1. Cycle asexué (Hôte vertébré)

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle inocule chez l'homme des sporozoïtes présents dans ses glandes salivaires, ces derniers envahissent le sang et rejoignent rapidement le foie par invagination et y commencent la phase exo-érythrocytaire en formant des schizontes hépatiques. Ceux-ci s'y multiplient par schizogonie. Cette phase passe inaperçue et est asymptomatique. À l'issue de celle-ci, des milliers de mérozoïtes sont générés par éclatement des schizontes hépatiques. Cette phase peut durer une à deux semaines selon l'espèce. Chez le *P. vivax* et le *P. ovale*, il existe une schizogonie retardée (hypnozoïtes) et la libération de mérozoïtes dans le sang peut avoir lieu jusque 18 mois plus tard.

La phase érythrocytaire commence par l'envahissement des globules rouges par les mérozoïtes via un mécanisme ligand – récepteur impliquant des protéines du parasite et les récepteurs du globule rouge (Gaur et al., 2004), on note ainsi une différence de préférence en ce qui concerne le choix de la cellule hôte par le parasite (réticulocytes, globules rouges âgés). La maturation en schizontes (2- 3 jours selon l'espèce), via les formes jeunes trophozoïtes

(anneau) et trophozoïtes, conduit à la destruction des globules rouges et à la libération de nouveaux mérozoïtes qui infectent de nouveau les globules rouges. L'éclatement des globules rouges entraîne des poussées de fièvres et une augmentation de la parasitémie caractéristique de l'accès palustre.

Pour sa croissance, le parasite importe les nutriments soit du cytoplasme globulaire (hémoglobine, acides aminés, acides gras, acide p-aminobenzoïque, glucose), soit de la surface membranaire globulaire. Il y exporte également des protéines; certaines protéines particulières localisées au niveau de la membrane des globules rouges favorisent l'adhésion des globules rouges parasités et non parasités afin d'échapper à l'action nettoiyante de la rate.

Lors de l'éclatement des globules rouges, il y a libération de substances pyrogènes ainsi que de cytokines TNF ayant une action nécrosante sur les vaisseaux et aggravant davantage la maladie (Grau et al, 1989).

L'érythrocyte infecté, subit des modifications de structure et de taille, il passe d'une forme biconcave à une forme globuleuse de sphère crénelée et sa déformabilité est diminuée.

Certains mérozoïtes, au bout d'un certain nombre de cycles, subissent une différenciation menant à la formation de gamétocytes mâles et femelles qui diffèrent par la taille du noyau et du cytoplasme et assurent le cycle sexué chez l'hôte invertébré. La maturation des gamétocytes a lieu chez l'homme et la fécondation dans l'estomac du moustique femelle.

I.7.2. Cycle sexué

L'anophèle lors de son repas sanguin inocule les sporozoïtes tout en récupérant chez l'hôte vertébré infecté les gamétocytes. Après 10 minutes, dans son estomac, les gamétocytes mâles se transforment par exflagellation et fécondent les gamétocytes femelles afin de former un zygote (ookinète). Les ookinètes adhèrent après 24 heures à la paroi stomacale et la traversent en devenant des oocystes. La croissance de ces derniers prend 4 à 21 jours, la durée du processus dépendant de la température ambiante. A partir d'un oocyste initial plusieurs centaines de sporozoïtes sont formés, migrent vers les glandes salivaires et sont prêts à être injectés lors d'une nouvelle piqûre.

I.8. Malaria en République Démocratique du Congo (R.D.C)

En R.D.Congo, pays localisé au centre de l’Afrique et au climat tropical, la malaria est hautement endémique et la grande majorité de la population est exposée (**Figure I.5**). La malaria y constitue un grand problème de santé publique et de développement. En 2001, 59% de la population étaient exposées au paludisme, responsable de 48% des hospitalisations et de 37% de décès chez les enfants de moins de 5 ans, ainsi que de 5% de cas de l’ensemble de transfusion sanguine, (PNLP, 2001). En 2007, 68% des consultations externes enregistrées et 30% des hospitalisations étaient dues au paludisme, tout en ajoutant que 20 % seulement de la population fréquente les centres médicaux (PNLP, 2007). La RDC se classe après le Nigéria parmi les pays les plus touchés de l’Afrique subsaharienne (WHO, 2010). Signalons qu’un enfant congolais fait en moyenne 7-10 épisodes de paludisme par an. Plus de 27.000.000 de cas de paludisme sont enregistrés chaque année avec au moins 180.000 décès, les plus concernés étant les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (WHO, 2011).

Dans ce grand pays, trois espèces de *Plasmodium* sont couramment rencontrées dans les manifestations palustres: *P. vivax*, *P. malariae* et *P. falciparum*. Des trois, l’espèce *P. falciparum* est la plus fréquente, elle représente à elle seule 95% des cas, et elle est responsable de la majorité des cas de morbidité et de mortalité. Elle présente de plus très souvent une résistance aux antipaludiques les plus couramment utilisés et présents sur le marché (Mesia, 2009 ; Wilson., 1989; Delacollette et al., 1983). Une étude effectuée en 2000 sur des sites sentinelles a ainsi montré une diminution de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine (**Tableau I 1**)

Tableau I.1: Echecs thérapeutiques avec la chloroquine et la sulfadoxine – pyriméthamine chez les enfants de moins de cinq ans dans sept sites sentinelles.

Sites sentinelles	Chloroquine (CQ) en % d'échec	Sulfadoxine-pyriméthamine (SP) en % d'échec	% d'échecs enregistrés pour les deux produits
Bukavu	80	9	CQ (29-80%)
Kimpese	50	10	
Kinshasa	35	6	
Kisangani	49	18	
Kapolowe	34	4	SP (6-18%)
Mikalayi	29	0	
Vanga	49	5	

Avant l'apparition de la résistance aux antipaludiques, la chloroquine était utilisée comme médicament de première intention. L'apparition de la résistance a eu pour conséquence qu'elle a cédé sa place à l'association sulfadoxine –pyriméthamine. Quelques années plus tard, cette association a rencontré le même problème de résistance entraînant un changement de politique de prise en charge palustre (Kazadi, 2003). Aujourd'hui dans toutes les zones endémiques, les ACT sont prescrits en première intention dans le paludisme simple. La quinine utilisée depuis des années, continue à faire preuve de son efficacité et est utilisée en monothérapie dans le traitement du paludisme simple ou compliqué chez les enfants tout comme chez les femmes enceintes, à la fois en RD Congo et dans d'autres pays endémiques (Achan et al., 2011).

Sur le marché congolais des médicaments, plusieurs ACT sont disponibles: association d'un dérivé de l'artémisinine à l'amodiaquine, à la sulfadoxine/pyriméthamine, à la luméfantrine, à la méfloquine ou à la pipéraquline. Tous ces produits circulent sous forme de génériques avec plus de 60 noms différents. Le coût lié au traitement, ne permet pas l'accès de tous au traitement malgré les différentes stratégies mises en place par le PNLP (Programme National de Lutte contre le Paludisme) d'où l'usage de moyens du bord ou le retour aux plantes sous forme de produits bruts ou de produits améliorés (MTA, Médicaments Traditionnels Améliorés).

I.9. Manifestations cliniques

La sévérité de la maladie dépend de l'espèce et du cycle évolutif qui est différent selon les espèces. Il est important d'arriver à distinguer le paludisme simple du grave tout en sachant qu'un paludisme simple non pris en charge ou mal pris en charge peut virer vers un paludisme grave. L'accès initial commence par des frissons brutaux dans le cas de *P. vivax*, *P. falciparum* et *P. ovale* avec des fièvres irrégulières qui sont toujours précédées de moment de frissons.

Dans le cas du paludisme simple, les symptômes sont souvent: frissons, tremblements, fièvre, maux de tête, courbatures, nausées, vomissements anorexie, diarrhée. De tous ces symptômes la fièvre est le plus fréquent. Ces symptômes apparaissent une à deux semaines après la piqûre du moustique femelle en fonction de l'espèce et du degré d'immunité de l'hôte.

Dans les cas grave (toujours liés à *P. falciparum*), les symptômes rencontrés sont les suivants: confusion mentale, coma, hypoglycémie, troubles respiratoires, hémorragies, troubles rénaux,

oligurie, hémoglobinurie, insuffisance rénale, ictère, faiblesse généralisée, convulsions, acidose, anémie (HCT < 20% ; Hb < 6g/dl), somnolence, jaunisse, collapsus circulatoire.

I.10. Diagnostic

Le diagnostic clinique est toujours complété par le diagnostic spécifique qui se base sur les techniques:

- de mise évidence du parasite dans le sang moyennant une goutte épaisse ou un frottis mince fixé au May-Grünwald et coloré au Giemsa puis observé au microscope à l'objectif 100 X sous immersion,
- de titration d'anticorps antiplasmodiaux (sérologie) ou de détection d'antigènes plasmodiaux dans le sérum, ou encore de PCR,
- de coloration à l'aide de fluorochromes se liant à l'ADN: microscopie ou Quantitative Buffy Coat (QBC) mise au point par Becton –Dickinson qui se base sur une centrifugation différentielle en présence d'acridine orange.

I.11. Immunité dans le paludisme

Après plusieurs années d'infections répétées, l'homme peut acquérir une immunité contre le parasite. Celle-ci est appelée prémunition (symptômes atténués d'une maladie qui protège contre une infection ultérieure de type sévère).

I.12. Malaria et VIH

Les personnes atteintes du VIH sont des personnes particulièrement vulnérables au paludisme, la co-infection résultant de l'interaction entre les deux maladies constituant un problème important de santé publique. Une attention particulière doit donc être consacrée au diagnostic des patients présentant un état fébrile dans les lieux où sévissent les deux maladies.

Il est à noter qu'il existe une interaction médicamenteuse entre les antirétroviraux et les antipaludiques, celle-ci est en prendre en compte dans le traitement du paludisme chez les malades atteints de VIH, car on assiste à une diminution de l'effet antipaludique voire à la production dans l'organisme de métabolites toxiques des médicaments anti paludiques (Colebunders et al., 1990 ; Soyinka et al., 2009 ; Greenberg et al., 1991 ; Khoo et al., 2005).

I.13. Malaria et Tuberculose

En Afrique subsaharienne, il y a existence d'une co-infection Malaria-Tuberculose-VIH. Parmi les symptômes de la malaria il y a la fièvre avec des complications respiratoires souvent mortelles, quant à la tuberculose, elle se manifeste par des états fébriles aigus accompagnés de complications respiratoires. Le diagnostic dans les deux cas doit être réalisé avec prudence pour éviter les confusions et installer un traitement correct. Les malades tuberculeux présentent par ailleurs un grand risque de paludisme comparativement aux non tuberculeux. Enfin, certaines études montrent que l'association d'un anti tuberculeux à un antipaludique augmenterait l'activité de ce dernier (Wanwimolruk et al.,1995; Pukrittayakamee et al., 2003).

I.14.Traitement

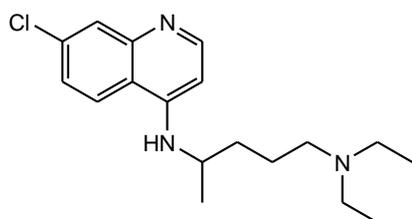
Les médicaments utilisés dans la lutte contre le paludisme sont les suivants:

I.14.1. Quinolines

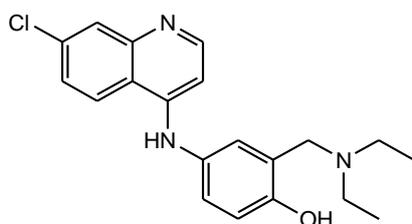
Elles sont subdivisées en trois groupes et on y retrouve la quinine isolée du Quinquina.

I.14.1.1. 4-Amino quinoléines

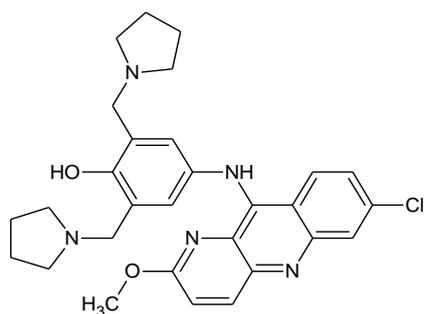
Chloroquine: molécule à propriétés anti-inflammatoire et antipaludique. La résistance du parasite à la chloroquine est maintenant pratiquement ubiquitaire.



Amodiaquine: peu utilisé à cause des effets indésirables hépatiques et sanguins, utilisée aujourd'hui dans des combinaisons à base d'artémisinine ou dérivés (ACT).



Pyronaridine

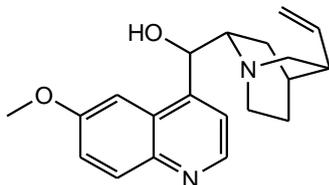


I.14.1.2. Aryl-amino-alcools

Quinine

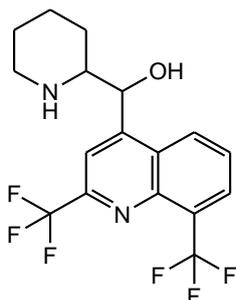
C'est l'antipaludique le plus ancien, isolé de l'écorce de quinquina avec 3 autres alcaloïdes: la quinidine, la cinchonine et la cinchonidine. L'association de ces quatre alcaloïdes est vendue en R.D.C dans une spécialité portant le nom de Quinimax[®].

La quinine, malgré ses effets indésirables est utilisée seule ou en association avec des antibiotiques dans le paludisme simple ou compliqué.

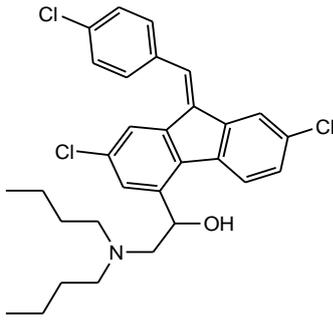


Méfloquine

Produit efficace contre les souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine, il présente beaucoup d'effets secondaires. La méfloquine est néanmoins utilisée aujourd'hui en monothérapie en prévention ou traitement du paludisme simple. Elle est aussi associée à des dérivés de l'artémisinine sous forme d'ACT.



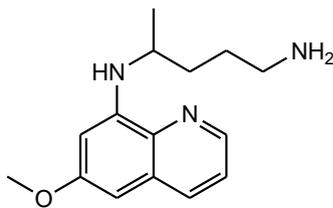
Luméfantrine



Utilisée uniquement en association avec l'artésunate dans le traitement du paludisme simple (ACT).

I.14.2. 8-amino-quinoléines

Primaquine: peu utilisée à cause de ses effets indésirables sanguins surtout chez les personnes déficientes en Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G-6PD). Il s'agit du seul médicament actif contre les hypnozoïtes de *P. vivax*.

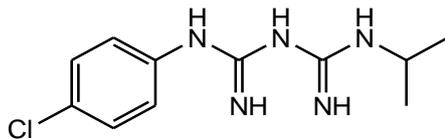
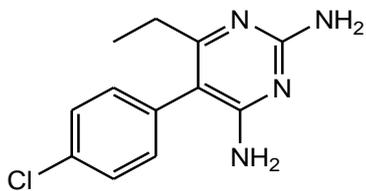


I.14.3. Antimétabolites

Il existe deux types d'antimétabolites: les antifoliniques et les sulfamidés. Excepté le proguanil, ces différents composés ne sont pratiquement plus utilisés, des résistances importantes s'étant développées.

I.14.2.1. Type sulfamidés**Sulfadoxine****Sulfalène****I.14.2.2. Type biguanides-diaminopyrimidines: Antifoliniques****Proguanil**

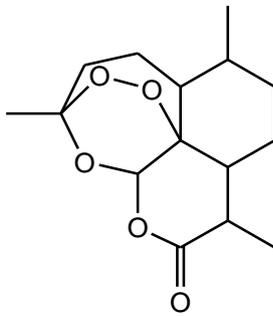
Il est utilisé en association avec l'atovaquone (sous le nom déposé Malarone®), principalement en prévention du paludisme.

**Pyrimethamine**

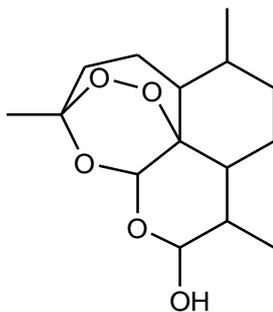
I.14.4. Artémisinine et dérivés

L'artémisinine et ses dérivés constituent la classe la plus utilisée actuellement dans le traitement du paludisme simple et compliqué. Vu sa très courte demi-vie qui favorise des recrudescences du parasite, et pourrait favoriser l'émergence de résistances, l'OMS recommande son utilisation (et celle de ses dérivés) en association à des antipaludiques de plus longue durée d'action. Plus de 60 pays ont adopté à l'heure actuelle les combinaisons à base d'artémisinine (ACT) en première intention dans le traitement du paludisme simple (Eastman, 2009).

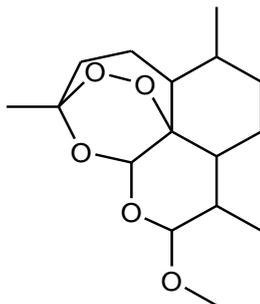
Artémisinine

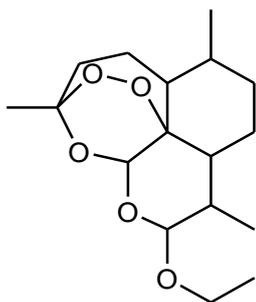
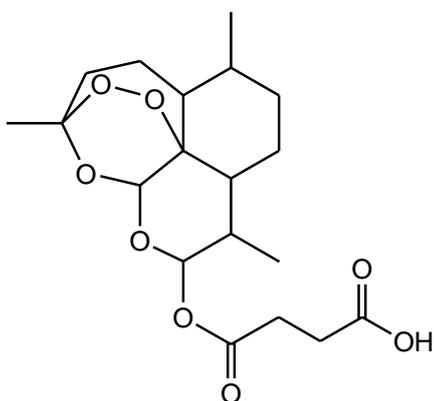


Dihydroartémisinine

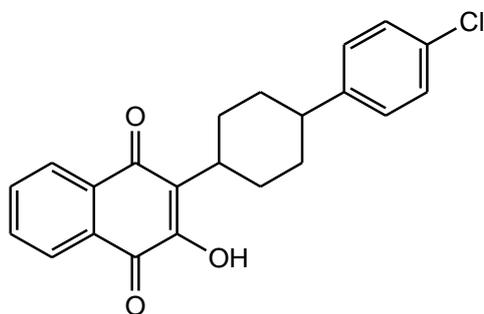


Arthéméter



Artéether**Artésunate****I.14.5. Naphtoquinones****Atovaquone**

Très utilisée en prévention chez les personnes vivant en zones non endémique, elle est associée au proguanil sous le non de Malarone[®].



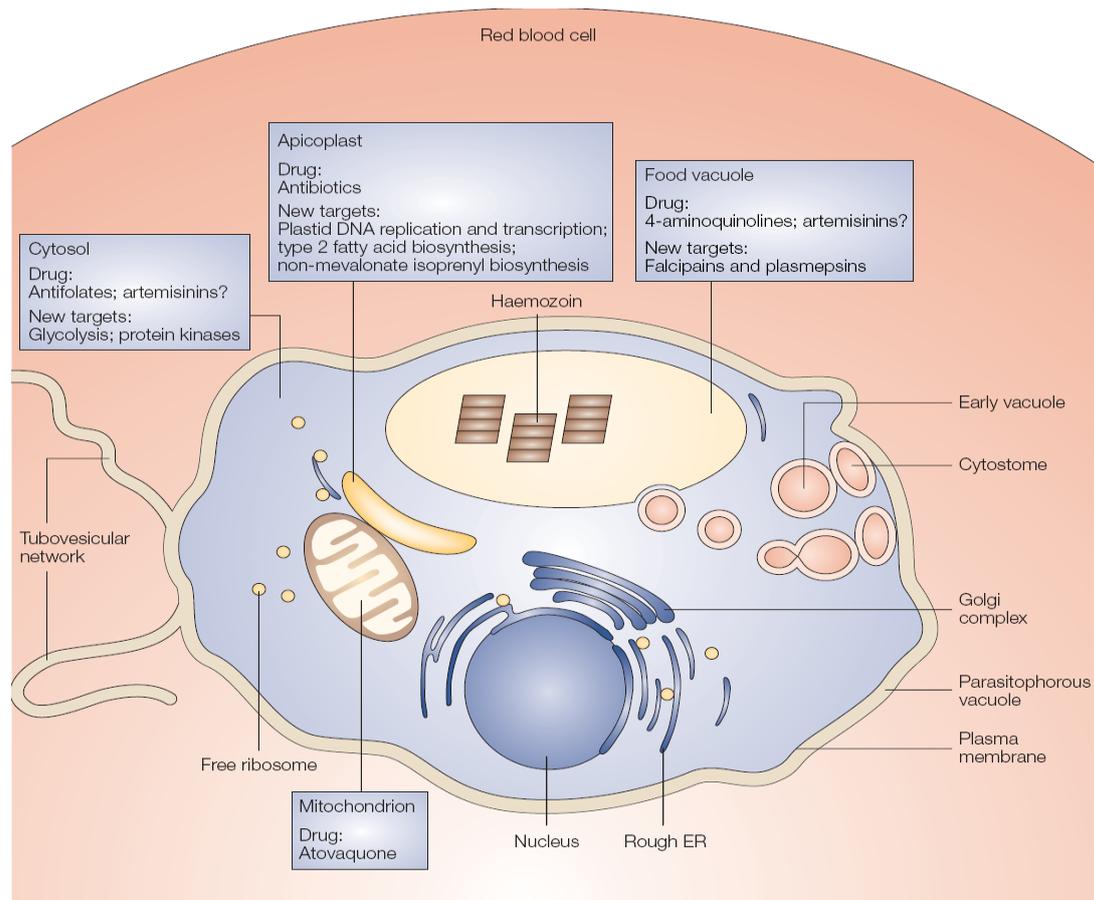


Figure I.7: Sites d'action intra-cellulaires des principaux médicaments antipaludiques.
Source : Fidock et al., 2004).

Les quinolines (la chloroquine, quinine et autres) : bloquent la dégradation enzymatique de l'hémoglobine, la cible pourrait être le blocage de l'hème polymérase. En effet la source principale d'acides aminés pour le parasite intra érythrocytaire est la dégradation enzymatique de l'hémoglobine. Le *Plasmodium* est incapable de dégrader l'hème qui est éliminé par polymérisation par l'hème polymérase sous forme d'un pigment malarique appelé hémozoïne. Celui-ci est insoluble et non toxique, alors que l'hème est toxique pour le parasite (Orjih, 1997;foley et Tilley, 1998).

L'artémisinine et ses dérivés sont des produits possédant un pont peroxyde et ils agiraient par formation de radicaux libres (Yang et al., 1994). On a également cité comme cible potentielle une ATPase Calcium dépendante (pfATPase6 ou pfSerCa) essentielle pour la survie du parasite.

L'atovaquone intervient dans la chaîne respiratoire du parasite en inhibant le transport électronique mitochondrial du parasite.

Les anti-métabolites interviennent dans la chaîne métabolique de synthèse des acides nucléiques et des protéines des parasites comme des faux précurseurs, perturbant la synthèse de ces composés.

Les antibiotiques interviennent dans la synthèse des protéines parasitaires au niveau de l'apicoplaste plasmodial.

I.16. Chimio prophylaxie

En zone endémique, la chimio prophylaxie n'est pas conseillée car cela pourrait favoriser l'émergence de souches résistantes d'une part, et d'autre part, le risque d'effets indésirables serait trop important pour des personnes devant prendre ces médicaments de manière chronique. La chimio prophylaxie s'adresse donc uniquement aux personnes provenant de zones non endémiques en voyage vers des zones endémiques ainsi que dans certains cas aux femmes enceintes (Vallely et al., 2007).

Les mesures préventives exploitées ces derniers temps consistent donc plutôt à se protéger pour éviter les piqûres de moustiques afin de réduire la transmission. Cette protection est réalisée par l'utilisation de sprays ou de pommades contenant des principes répulsifs et de moustiquaires imprégnées d'insecticides (WHO, 2004). A ces actions s'ajoutent des mesures élémentaires et primaires d'hygiène et de salubrité afin d'éliminer les gîtes favorables à la vie de l'anophèle.

I.16.1. Vaccin antipaludique

Aucun vaccin antipaludique n'est actuellement disponible, même si un vaccin appelé Mosquirix® (RTS,S) a démontré en essai clinique de phase II une protection d'environ 50%. Celui-ci est actuellement en essai clinique de phase III (Wilby et al., 2012).

I.17. Mécanisme de résistance de *Plasmodium* aux médicaments antipaludiques

Malgré les efforts développés pour la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques et la mise en place par les systèmes de santé de nouvelles combinaisons thérapeutiques dans le traitement de la malaria, le *Plasmodium* s'adapte en permanence et développe des résistances voire des résistances croisées aux antipaludiques. De premières résistances aux dérivés de l'artémisinine ont même récemment été mises en évidence en Asie du Sud- Est. (Noedl et al.,

2008 ; Arjen et al., 2009, Farooq, 2004).

Le *Plasmodium*, au cours de son évolution, a dû mettre en place différents mécanismes permettant son adaptation à l'organisme hôte. La haute capacité de résistance particulière du *Plasmodium falciparum* s'explique par une très grande diversité génétique due à un taux élevé de mutations dans son génome. (Wéry, 1995)

La résistance à la chloroquine est apparue pour la première fois dans les années 1950 en Asie du Sud-Est et en Amérique latine et s'est répandue dans pratiquement toutes les régions du monde (**Figure I 8**). L'espèce incriminée est principalement le *Plasmodium falciparum*, mais actuellement toutes les espèces expriment une résistance à l'un ou l'autre antipaludique existant sur le marché (Maguire et al., 2002; Lee et al., 2009; Rombo et al 1987).

Chloroquine

La résistance du *P. falciparum* à la chloroquine semble être principalement liée à une mutation du gène *pfert*, gène codant pour une protéine de transport située dans la membrane vacuolaire digestive et qui contribuerait à l'expulsion active de la chloroquine hors de la vacuole digestive (Johnson et al., 2004; Fidock et al., 2000 ; Chen et al., 2003 ; Sanchez et al., 2010).

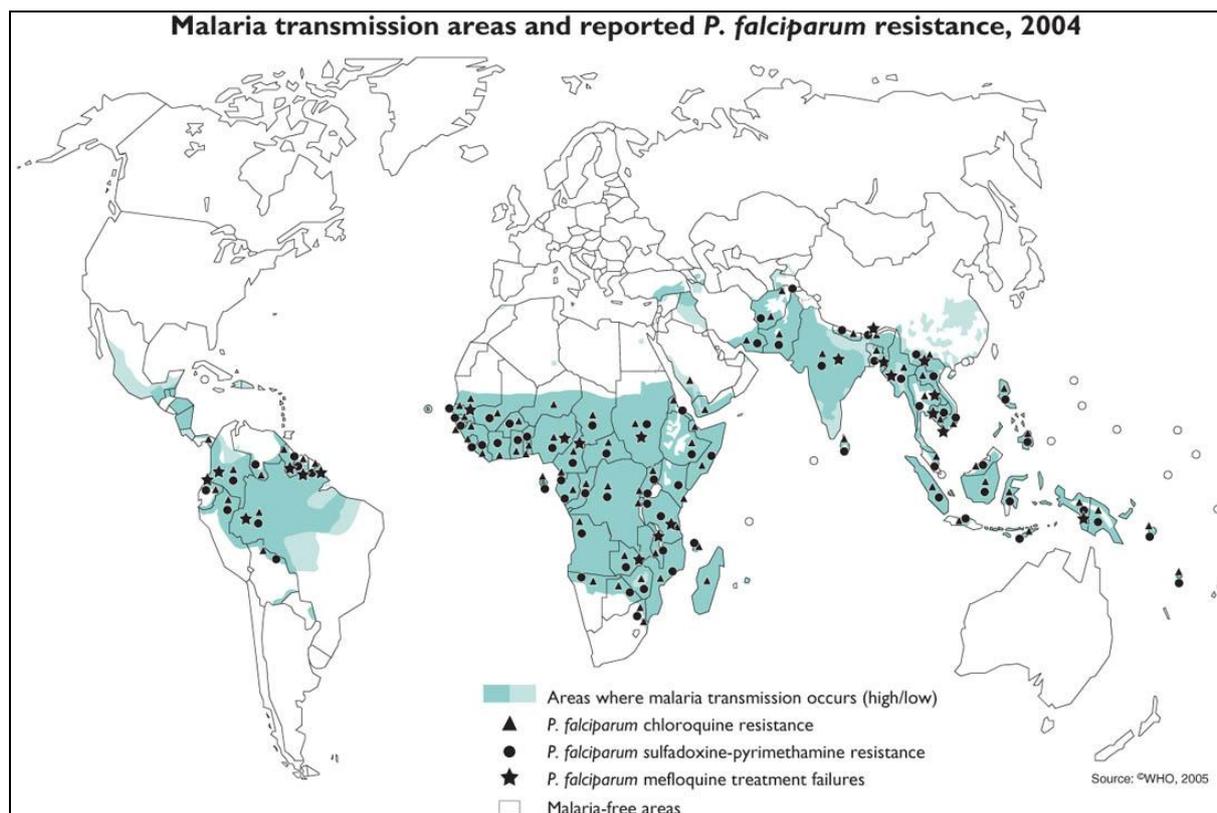


Figure I.8: Distribution mondiale de la résistance du *P. falciparum* aux antipaludiques (chloroquine, sulfadoxine/pyriméthamine). Source: Guidelines for the treatment of malaria WHO, 2006

Quinine

Les premiers cas documentés de résistance clinique à la quinine remontent aux années 1960 à la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge (Bjorkman et al., 1990; Giboda et al., 1988), puis a été décrite sporadiquement dans d'autres régions du monde (Harinasuta et al., 1990; Jelinek et al., 1995).

Le mécanisme de résistance de la quinine semble être lié essentiellement au gène *pfmdr1* (Mu et al., 2003; Peel et al., 1994; Cowman et al., 1994). Cependant, le mécanisme exact de résistance n'est toujours pas clair.

Amodiaquine

Elle semble être plus efficace que la chloroquine dans les zones à haute résistance à la chloroquine, malgré le même mécanisme d'action; les taux d'échecs cliniques à l'amodiaquine sont plus faibles que ceux à la chloroquine (Brasseur et al., 1995; 1999; Olliaro et al., 1996; 2003). Peu d'études ont été réalisées sur la résistance à l'amodiaquine

mais il y a des points communs entre la résistance à la chloroquine et à l'amodiaquine (implication des gènes *pfprt* et *pfmdr1*) (Happi et al., 2009; Humphreys, 2007).

Méfloquine

Molécule de synthèse, elle a fait son apparition vers la fin des années 1970. La résistance est apparue pour la première fois vers 1980, de nouveau dans la région proche de la frontière thaïlondo-cambodgienne (Uhiemann, 2005).

Comme pour la quinine, la résistance serait associée au gène *pfmdr1*, mais d'autres gènes seraient également impliqués (Peel et al., 1994; Duraisignh et al., 2005).

Artémisinine et dérivés

De premiers signes de résistance à l'artémisinine ont été décrits, de nouveau en Asie du Sud-Est, à partir de la fin des années 2000. Le mécanisme lié à cette résistance est actuellement inconnu. (Jambou et al., 2005; 2010; Legrand et al., 2007; O'Brien, 2011).

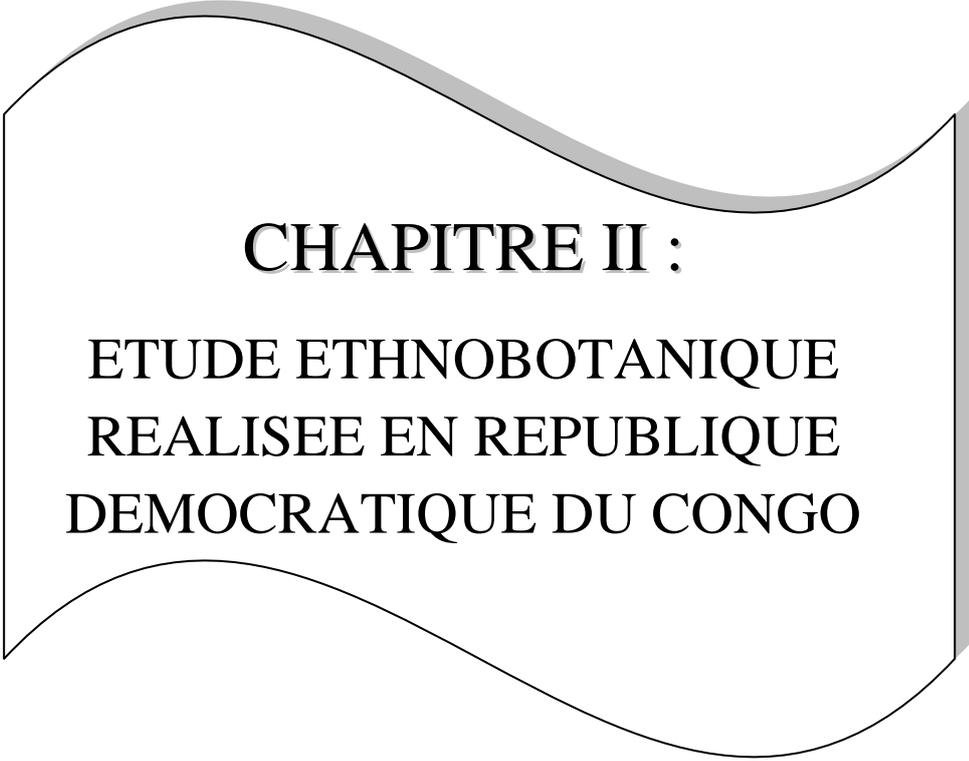
I.18. Malaria et femme enceinte

Depuis l'apparition de la résistance due au *P. falciparum* à la chloroquine, la femme enceinte dans les zones endémiques est devenue une personne à grand risque (que ce soit pour la mère, pour le fœtus et/ou le nouveau-né). Le traitement de son paludisme se fait à l'hôpital avec surveillance de nombreux paramètres. Malgré le manque de données sur le paludisme à *Plasmodium vivax* chez les femmes enceintes, il semble que ce parasite pourrait aussi également être responsable de sérieux problèmes au cours des grossesses (Nosten et al., 1999 ; McDermott et al., 1996; McCormick, 1985).

Dans les zones de faible transmission de *P. falciparum* (où les taux d'immunité acquises sont faibles), les femmes enceintes sont exposées à des accès palustres graves ayant des conséquences néfastes pour la vie du fœtus et/ou du nouveau-né (Luxemburger et al., 1996; 2001).

Dans les zones de forte transmission de *P. falciparum*, où les taux d'immunité acquises sont généralement élevés, les femmes enceintes sont exposées à une infection asymptomatique, qui peut entraîner de graves conséquences pour la mère mais surtout pour l'enfant (Steketee, 1996; 2001).

L'OMS recommande à l'heure actuelle un ensemble de mesures pour lutter contre le paludisme chez la femme enceinte dans les zones de transmission stable de *P. falciparum* (OMS, 2004). Les stratégies reposent sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides, et sur un traitement préventif intermittent (TPI) exploitant la sulfadoxine-pyriméthamine.



CHAPITRE II :
**ETUDE ETHNOBOTANIQUE
REALISEE EN REPUBLIQUE
DEMOCRATIQUE DU CONGO**

CHAPITRE II : ETUDE ETHNOBOTANIQUE REALISEE EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

II.1. Introduction

Depuis la période préhistorique, l'homme recherche dans son environnement de quoi soulager ses maux ou traiter ses maladies. Cette médecine dite traditionnelle est à l'heure actuelle toujours très largement utilisée dans les pays du Sud, où elle génère par ailleurs des revenus non négligeables (Eseinberg et al., 1998; Kitwa et al., 2004).

L'OMS définit la médecine traditionnelle comme « l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales » (OMS 1978).

Dans certains pays d'Asie et d'Afrique, 80% de la population dépend de la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaire. Ainsi, en Afrique, la médecine traditionnelle est dans de nombreuses situations la seule source des soins de santé disponible surtout pour les populations habitant l'arrière pays (Kambu, 1988; Kitwa et al., 2004).

Dans certaines zones endémiques au paludisme, le coût élevé, les effets indésirables liés à certains médicaments modernes mono ou poly composés, ont favorisé le retour à la médecine traditionnelle voire à l'insertion de certaines recettes traditionnelles standardisées dans les pratiques de soins de santé primaire (Akubue 1982; Mahady et al., 2001), tout en s'appuyant sur l'usage rationnel des médicaments et la pharmacovigilance (Eseinberg et al., 1998).

C'est dans le but de répertorier par écrit certaines connaissances ancestrales des plantes médicinales, qui sont transmises par tradition orale de génération en génération que l'équipe de pharmacologie de la faculté des sciences pharmaceutiques de l'Université de Kinshasa, en collaboration avec d'autres Universités du Pays, a organisé une enquête ethnobotanique orientée vers les plantes utilisées dans le traitement de maladies, et plus particulièrement du paludisme.

II.2. Objectifs

- Objectifs de l'enquête:

- Evaluer la connaissance par la population des plantes médicinales ainsi que leur taux d'utilisation,
 - Répertorier les plantes utilisées, et les identifier en réalisant une planche d'herbier,
 - Répertorier les noms vernaculaires,
 - Répertorier les modes de préparation des recettes traditionnelles
- Objectifs ultérieurs:
- Evaluer et confirmer les activités pharmacologiques des plantes sélectionnées,
 - Isoler la ou les substances actives,
 - Déterminer la ou les structures,
 - Évaluer la toxicité *in vivo* et la cytotoxicité *in vitro*,
 - Sélectionner des plantes pour les essais cliniques de phases I et II,
 - Faire des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des principes purs isolés

II.3. Réalisation de l'enquête

II.3.1. Lieu de l'enquête

L'enquête a été réalisée en République Démocratique du Congo (R.D.Congo), pays situé au centre de l'Afrique possédant une superficie de 2.345.000 m² et une population de plus de 65.000.000 d'habitants. Le pays est traversé par l'Equateur au Nord et est marqué par la présence de la grande forêt équatoriale, appelée forêt vierge, et par la flore très riche du grand bassin de la cuvette centrale. Il est entouré par 9 pays (**Figure II.1**: carte de la R.D.Congo)

C'est donc un pays riche en ressources naturelles végétales avec une biodiversité inconcevable. De nos jours, une bonne partie de ces ressources végétales restent encore non investiguées. Des informations sur les plantes médicinales peuvent néanmoins être trouvées dans certains travaux de thèses (Mabika, 1983); de diplôme d'études approfondies, de diplôme d'études spéciales (Tangeny, 1996), dans certains rapports de l'époque coloniale ou post - coloniale (De Wildeman, 1939, Lisowski, 1989, Kambu, 1990) et dans certains travaux réalisés par des équipes isolées (Magilu et al., 1994 ; Cimanga 1997 ; Tona et al., 1998, 1999, 2000).

II.3.2. Organisation de l'enquête

L'enquête s'est déroulée dans 7 provinces du pays durant la période allant de décembre 2000 à décembre 2002 (**Figure II.1**: carte de la R.D.Congo). Les provinces considérées sont: Bandundu, Bas-Congo, Equateur, Kasai-Oriental, Katanga, Kinshasa et Maniema.



Figure II.1 : Carte de la R.D.Congo : les différentes provinces enquêtées

Nous avons réparti ces sept provinces en 4 sites, à savoir:

- Le Centre: Kasai- Oriental
- L'Est: Maniema
- Le Sud: Katanga
- L'Ouest: Bandundu, Bas-Congo, Equateur et Kinshasa

L'équipe (enquêteurs) était constituée d'étudiants en Master I des facultés suivantes:

- Faculté de Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Kinshasa;
- Faculté de Sciences (Biologie) de l'Université de Mbandaka (Equateur) ;
- Faculté de Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Lubumbashi (Katanga);
- Faculté d'Agronomie de l'Université Kongo (Bas-Congo),
- Faculté de Sciences (Biologie) et d'Agronomie de l'Université du Bandundu (Bandundu)

et était complétée par des étudiants en D.E.S en Biologie de l'Université Patrice Emery Lumumba de Sankuru (Kasaï-Oriental). Les enquêteurs étaient originaires des provinces ou des sites dans lesquels ils ont enquêté afin de faciliter le contact avec la population, en tenant compte des traditions et des langues locales.

Les réponses à l'enquête étaient enregistrées afin de favoriser le contact entre les enquêteurs et les personnes interrogées, à savoir des tradipraticiens, des personnes âgées, des parents responsables de familles et des jeunes ayant des informations ou de la pratique sur l'usage des plantes médicinales.

Les questions étaient centrées sur les connaissances des plantes et de leurs usages médico-traditionnels et étaient orientées vers les plantes utilisées pour traiter la fièvre, le paludisme, les céphalées, l'inflammation. En effet, dans le cas du paludisme, les tradipraticiens se basent sur ces différents symptômes.

Une attention particulière a été portée à enregistrer les noms vernaculaires, les parties utilisées, le mode de préparation des recettes et les restrictions en rapport avec l'utilisation de celles-ci. Dans la mesure du possible, un échantillon d'herbier a à chaque fois été réalisé.

Les herbiers provenant de plantes répertoriées ont été déposés à l'Herbarium de l'Institut National des Sciences Agronomiques (INERA) de l'Université de Kinshasa et l'identification a été faite par Mr M. NLANDU.

II.4. Résultats

Plus de 300 herbiers ont été réalisés durant toute la période de l'enquête (12/2000 - 12/2002) et 132 espèces appartenant à 50 familles différentes ont été identifiées à l'INERA. Les résultats de l'enquête sont repris dans les tableaux II.1 à II.4.

Tableau II.1: Familles les plus couramment rencontrées au cours de notre enquête.

Familles	Fréquence de citation (%)
Euphorbiaceae	13,7
Rubiaceae	11,3
Caesalpiniaceae	8,2
Meliaceae	7,4
Apocynaceae	6,3
Mimosaceae	5,3
Asteraceae	4,7
Clusiaceae /Gutifferaceae	4,3
Cucurbitaceae	4,1
Solanaceae	3,9
Poaceae/Verbenaceae	3,5
AUTRES	27 ,3

Tableau II. 2: Espèces couramment utilisées contre la fièvre, la malaria, l'inflammation, les céphalées, dans les différents sites de l'enquête ethnobotanique et pourcentage de citation sur l'ensemble du pays

SITES	Centre Nombre de citations	Est Nombre de citations	Ouest Nombre de citations	Sud Nombre de citations	TOTAL Nombre de citations	Pourcentage de citation parmi l'ensemble des réponses
<i>Nombre de réponses</i>	37	28	87	49	201	100
<i>Albizia adianthifolia</i> (Schumach.) W. Wight	23	4	10	7	44	21,8
<i>Alchornea cordifolia</i> (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg.	15	2	30	4	51	25,3
<i>Alstonia boonei</i> De Wild.	6	3	10	2	21	10,4
<i>Anisopappus chinensis</i> Hook. & Arn.	0	0	3	24	27	13,4
<i>Cassia hirsuta</i> L.	6	7	21	4	38	18,9
<i>Cassia occidentalis</i> L.	12	10	24	4	50	24,8
<i>Cryptolepis</i> <i>sanguinolenta</i> (Lindl.) Schltr.	17	1	7	2	27	13,4
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	4	14	23	9	49	24,3
<i>Entandrophragma</i> <i>palustre</i> Staner	20	0	12	0	32	15,9

<i>Euphorbia hirta</i> L.	15	10	30	12	67	33,3
<i>Garcinia kola</i> Heckel	8	7	17	8	40	19,9
<i>Lantana camara</i> L.	7	10	12	9	38	18,9
<i>Mangifera Indica</i> L.	10	9	8	10	40	19,9
<i>Melia azedarach</i> L.	0	15	14	0	29	14,4
<i>Momordica charantia</i> L.	4	8	5	9	26	12,9
<i>Morinda morindoides</i> (Baker) Milne-Redh.	7	14	37	10	68	33,8
<i>Nauclea latifolia</i> Smith.	7	0	24	7	38	18,9
<i>Nauclea pobeguinii</i> Merr.	2	12	24	0	34	16,9
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	9	15	10	9	42	20,8
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	12	8	23	10	43	21,4
<i>Physalis angulata</i> L.	0	9	25	2	36	17,9

<i>Psidium guajava</i> L.	6	9	11	5	26	12,9
<i>Rauwolfia vomitoria</i> Afzel.		5	16	1	29	14,4
<i>Sida acuta</i> L.	2	8	14	7	31	15,4
<i>Sida rombilifolia</i> L.	5	5	10	7	27	13,4
<i>Triclisia gillettii</i> (De Wild.) Staner	10	7	9	6	32	15,9

Tableau II.3: Liste des espèces répertoriées pour leur utilisation contre la fièvre, l'inflammation, les céphalées, la malaria, et description de l'ensemble de leurs utilisations traditionnelles.

Légende : P.U (partie utilisée), P.E (plante entière), F (feuille), FR (fruit), E.R (écorce des racines), E.T (écorce de tronc), R (racines), G (graine)

Noms scientifiques et familles	Noms vernaculaires	Référence d'herbier (Herbarium de l'INERA)	P.U	Préparation	Usages médico-traditionnels
<i>Albizia adianthifolia</i> (Schumach.) W. Wight (Mimosaceae)	Mululu lulu ; Mulu	Compere 563	F, R	Décoction	États d'agitation, vertiges, diarrhées, fièvre, céphalées, asthme, maux de ventre
<i>Alchornea cordifolia</i> (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae)	Mbuzi-mbuzi	Pawels 4438	F	Décoction	Caries dentaires, amibiases, fièvres, hygiène intime, céphalées, hémorroïdes, maladies vénériennes, inflammation, malaria
<i>Alchornea floribunda</i> Müll. Arg. (Euphorbiaceae)	Ononn	-	E.R	Décoction	Aphrodisiaque, tonique, céphalées, désordres respiratoires et urinaires

<i>Alstonia boonei</i> De Wild. (Apocynaceae)	-	Carlier 275	E.T	Macération Décoction	Fièvres, malaria, asthénie,
<i>Alstonia congensis</i> Engl. (Apocynaceae)	Okulu	-	E.T	Macération	Fièvre, malaria, diarrhées, ulcères gastriques, hernie, vermifuge
<i>Anisopappus chinensis</i> Hook. & Arn. (Asteraceae)	Kasol- sol	Breyne 5717	P.E	Décoction	Fièvre, malaria, inflammation, ulcères gastriques
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth. (Euphorbiaceae)	Mindu	Evrard 6495	E.R, F	Décoction	Diarrhées, carie dentaire, maladies vénériennes, dysenteries, constipation, fièvres et inflammation
<i>Caloncoba welwitshii</i> Gilg. (Flacourtiaceae)	Kembomo	Breyne 216	F	Décoction	Purgatif, blennorragie, inflammation, Céphalées
<i>Canthium oddoni</i> (De Wild.) (Rubiaceae)	Oshuwi	Pauwels 83	E.T	Décoction	Fièvre, inflammation, vers intestinaux
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	Pai pai, dilolo, nlolo		R, F	Décoction	Dysenterie, blennorragie, rhumatisme, malaria, ictère, hernies
<i>Cassia floribunda</i> Cav. (Caesalpiniaceae)	-	-	F, R	décoction	Fièvre, rhumatisme
<i>Cassia occidentalis</i> L. (Caesalpiniaceae)	Ma nsambi usambi, madezo ma sioto	Carlier 360	E.R, F	Décoction	Fièvres, maux de ventre, gastralgies, malaria, blennorragies, purgatif, hémorroïdes, anémies
<i>Cassia hirsuta</i> L. (Caesalpiniaceae)	-	Pauwels 8	E.R	Décoction	Elephantiasis, vers intestinaux, inflammation, fièvre
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L. (Chenopodiaceae)	Mweme misobo	Lejoly 81/217	F	Décoction Macération	Vermifuges, asthme, rougeole, inflammation, céphalées
<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle (Rutaceae)	Longmee	-	F	Décoction	Fièvre, otites, toux, diarrhées, céphalées
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (L) Schl (Periplocaceae)			E.R	Macération infusion	Fièvre, amibiase, malaria, infections de voies respiratoires supérieures et urogénitales, rhumatismes, Troubles gastro-intestinaux,

					antimicrobien, analgésique, inflammation
<i>Crossopterix febrifuga</i> Benth. (Rubiaceae)	Mbinzo, mvala	Breyne 10	F, R	Décoction	Hémorroïdes, blennorragie, céphalées, maux de ventre, dermatoses, inflammation, fièvre,
<i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud) Stapf (Poaceae)	Musangu sangu	Dujardin 88	T.F, F, P.E	Décoction, Macération	Asthme, ulcères gastriques, fièvre
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Poaceae)	Matiti ma mputu, sinda	-	F	Décoction	Fièvre, grippe toux, blennorragie, malaria, stomacique
<i>Dichostemma glaucescens</i> Pierre (Euphorbiaceae)	Ondenge	-	E.T	Décoction	Insecticides, inflammation
<i>Drypetes gossweileri</i> S.Moore (Euphorbiaceae)	Obele	-	E.T	Décoction	Rhumatisme, asthme, vers intestinaux, toux, fièvre, asthénie sexuelle
<i>Entandrophragma palustre</i> Staner (Meliaceae)	Pake	Louis 3376	F, E.T	Décoction	Fièvre, inflammation, malaria
<i>Eramosphata haullevilleana</i> L. (Arecaceae)	Akavu	Pauwels 4543	P.E	Macération	Inflammation, otites, fièvre
<i>Euphorbia hirta</i> L. (Euphorbiaceae)	Dieza di kandi	Carlier 124	P.E	Décoction	Amibiase, asthme, diarrhée, fièvre, inflammation
<i>Garcinia kola</i> Heckel (Clusiaceae)	Ngadiadia, ntende	Dubois .J 199	G, E.T	Macération Décoction	Impuissance sexuelle, diarrhée, malaria, fièvre, hypertension,
<i>Gardenia jovis-tonantis</i> (Welw.) Hiern (Rubiaceae)		Simundele 438	E.T, R, F	Décoction	Purgatif, malaria antivenimeux
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir. (Hypericaceae)	Mutunu, ntunu	Breyne 486	E.T	Décoction	Constipation, inflammation, gastrites, amibiase, antibactériens
<i>Hymenocardia acida</i> Tul (Euphorbiaceae)	Kigeti	Breyne 11	E.T, R	Décoction	Amibiase, candidose, diarrhées, aménorrhées, fièvre
<i>Laggera alata</i> L. (Asteraceae)	Mfumu nseke	Callens 2048	F	Décoction	Fièvre, céphalées
<i>Lantana camara</i> L. (Verbenaceae)	Maka wobo	Pauwels 6265	F	Décoction	Toux, fièvres, malaria, asthme constipation grippe

<i>Luffa cylindrica</i> M.Roem (Cucurbitaceae)	Tseke, nsanu	Devred 739	F	Macération	Plaies, inflammation, parasitoses, fièvre,
<i>Mammea africana</i> Müll .Arg (Clusiaceae/ Guttiferaceae)	Okudi	Dubois 83	E.T	Décoction	Fièvre, toux, anémie, rhumatisme, inflammation, maladies vénériennes
<i>Maprounea africana</i> Müll Arg (Euphorbiaceae)	Mulubu lubu	Robyns 4150	F, R	Décoction	Toux, amibiase, blennorragies, caries, dentaires, céphalées, insecticides
<i>Melia azedarach</i> L. (Meliaceae)	Kamura	Breyne 5722	F	Décoction	Typhoïde, fièvre, malaria
<i>Microdesmis puberula</i> Hook_ex Planch(Pandaceae)	-	Evrard 6379	F	Décoction	Aphrodisiaque, ulcères gastro-intestinaux, troubles ovariens, fièvre, maladies vénériennes, diarrhées
<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	Lumbusu	Devred 527	P.E	Décoction	Malaria, fièvre, anémie, diabète, diarrhées, ulcères gastro-intestinaux, constipation
<i>Morinda citrifolia</i> L. (Rubiaceae)	Nsiki	-	E.T	Décoction	Grippe, fièvre, céphalées, diabète
<i>Morinda morindoides</i> Bak (Rubiaceae)	Kongo bololo	Carlier 76	F	Décoction	Hémorroïdes, malaria, fièvres, inflammation, blennorragie, amibiase,
<i>Nauclea latifolia</i> Smith (Rubiaceae)	Kilolo kwango	Campere 739	Racines	Décoction	Toux, fièvres, maux de ventre hémorroïdes, inflammation
<i>Nauclea pobeguinii</i> Merr. (Rubiaceae)	-	Lukoki 165	E.T	Décoction Macération	Malaria, vers intestinaux, asthénie sexuelle, gonorrhée, inflammation, épilepsie, ocytocique
<i>Ocimum gratissimum</i> L. (Lamiaceae)	Dikondi, mazulu	Carlier 285	F	Décoction Infusion	Céphalées, asthénie, toux, Asthme, inflammation, diabète, fièvre, malaria
<i>Ongokea gore</i> (Hua) Pierre (Olacaceae)	Nsanu, oleko	Breyne 684	E.T	Décoction	Diarrhées, antibactériens, ocytocique, inflammation, fièvre
<i>Paropsia brazzeana</i> Baill. (Flacourtiaceae)		Robyns 4149	E.T	Macération, Décoction	Diarrhées, amibiase, maux de ventre, fièvre, rhumatisme
<i>Pentaclethra macrophylla</i> Benth (Mimosaceae)	Ngansi, muwansi	Evrard 6653	E.T, F	Décoction	Gastrites, céphalées, blennorragies, purgatif, amibiase
<i>Pentaclethra eetveldana</i> De Wild.(Mimosaceae)	Mulu	Evrard 6978	E.R	Décoction	Toux, asthme, tuberculose, fièvre, céphalées, rhumatisme
<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	Musimi	Evrard 6976	R, F	Décoction	Céphalées, inflammation, blennorragies,

Baill. (Pentadiplandraceae)					diarrhées, asthme, carie dentaire,
<i>Phyllanthus niruri</i> L. (Euphorbiaceae)	-	Robyns 4244	F	Décoction	Malaria, fièvre, inflammation
<i>Physalis angulata</i> L. (Solanaceae)	Ndimba, lumbundu	Pauwels 6245	F, FR, P.E	Décoction	Inflammation, malaria, fièvre, hépatite, diabète, maux de ventre,
<i>Phytolaca dodecandra</i> l'Herit (Phytolacaceae)	Kenawiri, nkoy	Breyne 2339	F	Décoction	Epilepsie, fièvre, maux de ventre, inflammation, toux, vers intestinaux, dermatoses antibactériens
<i>Plumbago zeylanica</i> L. (Plumbaginaceae)	-	Pauwels 5866	F	Décoction Infusion	Ulcères gastro-intestinaux, fièvre, purgatif, vers intestinaux,
<i>Polythia swaveolensis</i> Engl. (Annonaceae)	Odjindja	Breyne 825	E.T	Décoction	Fièvre, malaria, dermatoses, maux de ventre
<i>Psorospermum febrifugum</i> Spach (Gutifferaceae)	Nsoko nsoko	Evrard 6379	E.R, F, R	Décoction	Fièvre, asthme, ulcères gastro-intestinaux, amibiase, hémorroïdes, gale
<i>Quassia africana</i> L. (Simaroubaceae)	Mupesi pesi	Carrington 93	E.R, R	Macération	Malaria, gastrite, blennorragie, asthénie sexuelle, céphalées, caries dentaires, angines
<i>Rauwolfia vomitoria</i> Afzel (Apocynaceae)	Zumbu	Breyne 5717	F	Décoction	fièvre, rhumatisme, dermatoses, inflammation,
<i>Trema guineensis</i> (Shumm& Thom.) (Ulmaceae)	Wesena		E.R	Decoction	Fièvre, infections respiratoires, maladies vénériennes, rhumatisme
<i>Strychnos icaja</i> Baill. (Loganiaceae)	Bondo bololo	Pauwels 837	E.R	Macération	Malaria, ordalies
<i>Trichila gilgiana</i> Harms (Meliaceae)	Idjokondjo	-	E.T	Macération	Fièvre, diarrhées, douleurs abdominales
<i>Tridax procumbens</i> L. (Asteraceae)	Ototula	-	F	Décoction	Malaria, fièvre, hypertension, gastrites
<i>Triclisia gillettii</i> De Wild. (Meliaceae)	Kinwani, efili	Pauwels 289	E.R, E.T	Décoction	Malaria, diarrhées, fièvre

Tableau II. 4: Relevé bibliographique des travaux réalisés sur les espèces répertoriées pendant l'enquête ethnobotanique.

Légende: F (Feuilles); E.T (Ecorce de tronc); E.R (Ecorce de racines) ; R(Racines); P.E (Plante entière)

Espèces (Familles)	Partie utilisée	Extrait	Activité in vitro (CI ₅₀ µg/ml)	Activité in vivo (% de suppression de la parasitémie)	Références
<i>Alchornea cordifolia</i> (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae)	F	EtOH	7,1 ± 1,5		Banzouzi et al.,2002
		MeOH/H ₂ O	2,8 ± 0,6		Mesia et al., 2008
<i>Alstonia boonei</i> De Wild. (Apocynaceae)	E.T	MeOH	40,0 ± 4,3		Mesia et al.,2008
		EtOH	>50		Zirihi et al., 2005
		MeOH	>20		Okpekon et al., 2004
<i>Bridelia ferruginea</i> Benth. (Euphorbiaceae)	F, R, E.T	MeOH	>20		Okpekon et al., 2004
		CH ₂ Cl ₂	6.5		
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	F	EtOH/H ₂	10,4 ± 0,2		Leaman et al., 1995
<i>Cassia floribunda</i> Cav. (Caesalpiaceae)	E.R	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Cassia hirsuta</i> L. (Caesalpiaceae)	E.R	MeOH/H ₂ O	32,0 ± 1, 8		Mesia et al., 2008
<i>Cassia occidentalis</i> L. (Caesalpiaceae)	F	EtOH	2,8 ± 0,5 10,0 ± 0,1	79,0 ± 3,2	Tona et al., 1999 ;Tona et al., 2004
		EtOH	36,9 ± 5,6		Zirihi et al.,2005
<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle (Rutaceae)	F	MeOH /H ₂ O	40,0 ± 2,1		Mesia et al., 2008
<i>Crossopterix febrifuga</i>	E.T	MeOH /H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008

Benth. (Rubiaceae)		EtOH/H ₂ O		70,97	Elufioye et al., 2004
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> (Lindl.) Schltr.	E.R	EtOH	15,5 ± 0,3		Tona et al., 1999 ; Cimanga, 1997
		CH ₂ Cl ₂	13,6 ± 0,1		
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Poaceae)	P.E	MeOH/H ₂ O	42,2 ± 2,2		Mesia et al., 2008
		Huiles		86,6	Tchoumboungang et al., 2005
<i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud) Stapf (Poaceae)	F	MeOH/H ₂ O	25,0 ± 2,7		Mesia et al, 2008
<i>Dichostemma glaucescens</i> Pierre (Euphorbiaceae)	E.T	MeOH/H ₂ O	44.0 ± 2.7		Mesia et al., 2008
<i>Drypetes gossweileri</i> S.Moore (Euphorbiaceae)	E.T	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Eramosphata haullevilleana</i> L (Arecaceae)	P.E	MeOH/H ₂ O	42 ,0 ± 3,1		Mesia et al., 2008
<i>Euphorbia hirta</i> L. (Euphorbiaceae)	P E	EtOH	14,8 ± 0,3		Tona et al., 1999 ; 2001 ; 2004.
		CH ₂ Cl ₂	10,8 ± 0,9		
<i>Garcinia kola</i> Heckel (Clusiaceae)	E.R FR	EtOH	14,2 ± 0,6		Tona et al., 1999 ; 2001 ; 2004 ;
			2,9 ± 0,7		
		CH ₂ Cl ₂	13,6 ± 0,4		Mesia et al., 2008
<i>Harungana</i> <i>madagascariensis</i> Lam. ex Poir. (Hypericaceae)	E.T	MeOH	39,07 ± 1,57		Muthaura et al., 2007
		H ₂ O	105,0 ± 0,04		
<i>Hymenocardia acida</i> Tul (Euphorbiaceae)	F	CH ₂ Cl ₂	6.9 ± 1.2		Vonthron-Sénécheau et al., 2003
<i>Laggera alata</i> L. (Asteraceae)	F	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Lantana camara</i> L. (Verbenaceae)	F	MeOH/H ₂ O	12,0 ± 2,2		Mesia et al., 2008
<i>Luffa cylindrica</i> M.Roem (Cucurbitaceae)	F	MeOH/H ₂ O	33,0 ± 1,8		Mesia et al., 2008

<i>Mammea africana</i> Müll .Arg (Clusiaceae/ Guttiferaceae)	E.T	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Maprounea africana</i> Müll Arg (Euphorbiaceae)	F	MeOH/H ₂ O	9,0 ± 1,2		Mesia et al., 2008
<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	E.T	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Morinda morindoides</i> Bak (Rubiaceae)	F	EtOH	3,7 ± 0,9	37,1 ± 5,2	Tona et al., 1999 ; 2001 ; 2004.
		CH ₂ Cl ₂	10,8 ± 2,4		
<i>Nauclea latifolia</i> Smith (Rubiaceae)	E.R		8,9 ± 2,5		Zirihi et al., 2005
<i>Nauclea pobeguinii</i> Merr. (Rubiaceae)	E.T		3,3 ± 1,7		Mesia, 2009
<i>Ocimum gratissimum</i> L. (Lamiaceae)	P.E	MeOH/H ₂ O	6,0 ± 2,5		Mesia et al., 2008
		Huiles		77, 8	Tchoumboungang et al., 2005
<i>Ongokea gore</i> (Hua) Pierre (Olacaceae)	E.T		32,0 ± 4,3		Mesia et al, 2008
<i>Pentaclethra eetveldana</i> De Wild. (Mimosaceae)	E.R		37,0 ± 2,1		Mesia et al, 2008
<i>Phyllanthus niruri</i> L. (Euphorbiaceae)	P.E	EtOH	10,8 ± 2,4	80,0 ± 4,0	Tona et al., 1999 ; 2001 ; 2004
		CH ₂ Cl ₂	1,9 ± 0,4		Cimanga et al., 2004
		EtOH	16,3 ± 2,5		
		CH ₂ Cl ₂	9,2 ± 3,4		
<i>Physalis angulata</i> L. (Solanaceae)	F, P.E	EtOH	7.9 ± 0,70		Zirihi et al., 2005
<i>Phytolaca dodecandra</i> l'Herit (Phytolacaceae)	F	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008

<i>Plumbago zeylanica</i> L. (Plumbaginaceae)	F	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Psorospermum febrifugum</i> Spach (Guttiferaceae)	F	MeOH/H ₂ O	>64		Mesia et al., 2008
<i>Quassia africana</i> L. (Simaroubaceae)	F	H ₂ O	1,8 ± 0,9		Mbatchi et al., 2006
		EtOH	2,2 ± 0,4		
	R	H ₂ O	0,8 ± 0,4		
		EtOH	0,5 ± 0,1		
<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel (Apocynaceae)	F		35,0 ± 2,1		Mesia et al., 2008
			2,5 ± 1,0		Zirihy et al., 2005
<i>Trema guineensis</i> Shumm & Thom (Ulmaceae)	E.R		>64		Mesia et al., 2008
<i>Trichila gilgiana</i> Harms (Meliaceae)	E.T		>64		Mesia et al., 2008
<i>Triclisia gillettii</i> De Wild. (Meliaceae)	E.T		2,0 ± 0,3		Mesia et al., 2008
<i>Tridax procumbens</i> L. (Asteraceae)	F		>64		Mesia et al., 2008

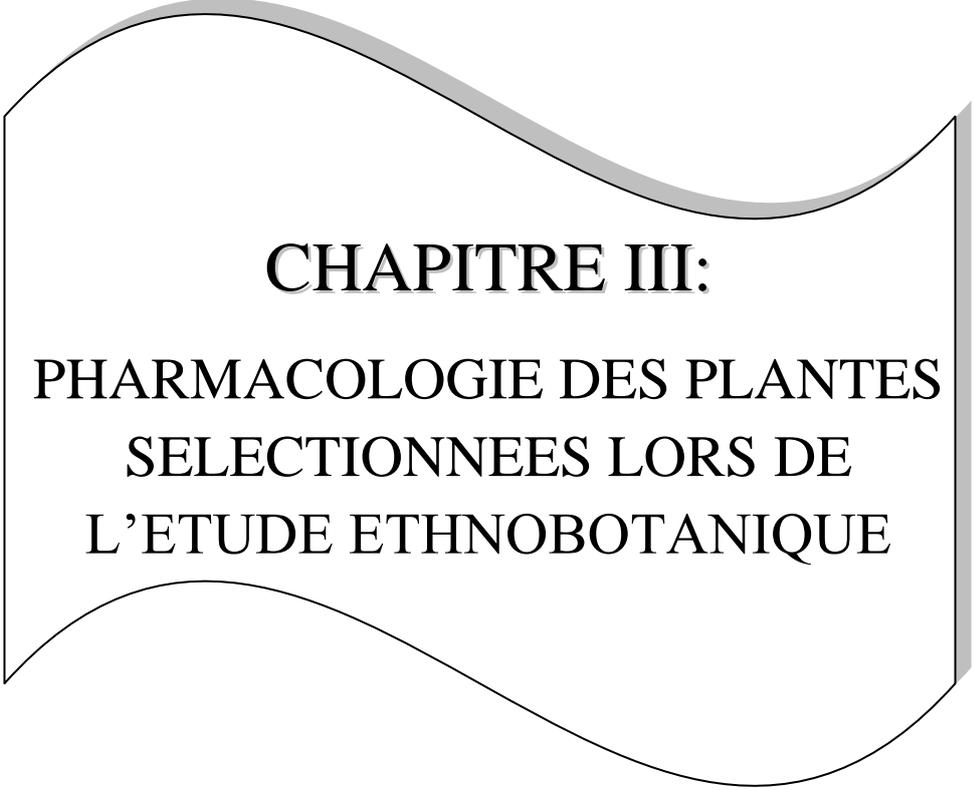
II.5. Discussion

Il ressort de cette enquête que les plantes des familles des Euphorbiaceae (*Euphorbia hirta*, *Phyllanthus niruri*, *Alchornea cordifolia*...), des Rubiaceae (*Morinda morindoides*, *Nauclea latifolia*, *Nauclea pobeguinii*...), des Caesalpiniaceae (*Cassia occidentalis*, *Cassia hirsuta*...), et des Meliaceae (*Entandrophragma palustre*, *Melia azedarach*, *Triclisia gillettii*...) sont particulièrement bien connues par les populations interrogées, sont largement utilisées, et contribuent au traitement de nombreuses maladies, utilisées soit seules, soit en association avec d'autres espèces. La plupart des recettes utilisées sont préparées soit par macération, infusion ou décoction et sont administrées dans la plupart des cas par voie orale.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que:

- la population de l'Est utilise essentiellement des arbres et des herbes (végétation à tendance savane boisée);
- la population du Centre utilise plutôt uniquement des arbres (végétation à prédominance forestière);
- la population de l'Ouest, mélange herbes, arbres et plante entière (végétation: savane et forêt);
- la population du Sud consomme plus les herbes (végétation à tendance savane herbacée).

Certaines espèces énumérées dans le Tableau II.3 ont déjà fait l'objet d'études *in vitro* ou *in vivo* de leurs propriétés antipaludiques (Tableau II.4) et certaines espèces font partie de certains médicaments traditionnels améliorés utilisés en thérapeutiques en R.D.Congo : *Nauclea latifolia* et *Phyllanthus niruri* (MANALARIA), *Garcinia kola* (NSANSIPHO'S), *Hymenocardia acida* (MEYAMICINE). *Nauclea pobeguinii* a fait l'objet d'une étude clinique en R.D.Congo sous forme d'un extrait éthanolique à 80% (Mesia et al., 2011; 2012) et *Physalis angulata* fait partie d'un MTA composé de 4 plantes ayant été étudié lors d'une étude clinique sur la malaria au Ghana (Ankrah, N.A., et al., 2003). L'enquête ethnobotanique ainsi que l'étude bibliographique nous ont ainsi permis de sélectionner les plantes les plus intéressantes en vue de leur exploration en laboratoire.



CHAPITRE III:
PHARMACOLOGIE DES PLANTES
SELECTIONNEES LORS DE
L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE

CHAPITRE III : PHARMACOLOGIE DES PLANTES SELECTIONNEES LORS DE L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE

III.1. Introduction

Suite à l'étude ethnobotanique, cinq plantes utilisées en médecine traditionnelle congolaise dans le traitement de la fièvre, de l'inflammation, des céphalées, de la malaria ont été sélectionnées pour un screening antiplasmodial *in vitro* et *in vivo*. Les essais de cytotoxicité *in vitro* ainsi que la toxicité *in vivo* ont été également réalisés sur certaines de ces plantes. Les cinq plantes sont:

- *Anisopappus chinensis* Hook & Arn.
- *Entandrophragma palustre* Staner
- *Melia azedarach* L.
- *Physalis angulata* L.
- *Strychnos icaja* Baill.

III.2. Description botanique des plantes sélectionnées

La description de plantes sélectionnées a été faite selon la classification APG III 2009 (Angiosperm phylogeny Group)

III.2.1. *Anisopappus chinensis* Hook & Arn (Asteraceae)



Figure III.1: *Anisopappus chinensis*

La famille des *Compositae* ou *Asteraceae* est une famille cosmopolite comprenant plus de 1100 genres et plus de 25000 espèces avec deux sous-familles (*Asteroideae* et *Cichorioideae*), toutes deux présentes dans la flore d'Afrique centrale.

Les *Asteroideae* sont une sous-famille cosmopolite divisée en plus ou moins 25 tribus, comprenant environ 1035 genres et plus ou moins 22000 espèces et pour la flore africaine 12 tribus et environ 99 genres (Panero et Funk 2008).

Les *Inuleae* constituent l'une des tribus de la sous-famille des *Asteroideae*. C'est une tribu cosmopolite comprenant 180 genres et 2100 espèces, et pour la flore d'Afrique centrale, 18 genres (*Blumea*, *Pluchea*, *Denekia*, *Nicolasia*, *Porphyrostemma*, *Neojeffreya*, *Inula*, *Vicoa*, *Mollera*, *Stoebe*, *Gnaphallium*, *Pseudognaphallium*, *Helicrysum*, *Anisopappus*, *Arthroisma*, *Blepharispermum*, *Sphaeranthus*, *Athrixia*) et 125 espèces (Lisowski, 1989).

Le genre *Anisopappus* est paléotropique et comprend environ 36 espèces dont 13 pour la flore africaine (*A. africanus*, *A. marianus*, *A. dentatus*, *A. chinensis*, *A. davyi*, *A. petitianus*, *A. bampsianus*, *A. lejolianus*, *A. umpembensis*, *A. robynsianus*, *A. laastii*, *A. burundiensis*, *A. lawalreanus*).

Anisopappus chinensis fait partie de la classe des *Equisetopsida*, de la sous-classe des *Magnoliidae*, de l'ordre des Astérales, de la famille des *Asteraceae* et du genre *Anisopappus*.

C'est une herbe vivace à racines fibreuses, à tiges dressées, simples ou ramifiées dans la partie supérieure, cylindriques ou légèrement angulaires, atteignant plus de 40 cm de haut et striées d'une pubescence courte et blanchâtre.

Les feuilles possèdent un pétiole atteignant 2,3 cm de long, un limbe oblong-elliptique à oblong-ovale de 2-6,5 cm de long et 1-3 cm de large présentant un indument scabre et blanchâtre sur les deux faces, à base cunéée ou parfois tronquée, à sommet obtus, à bord crénelé-denté.

Les capitules sont hétérogames, subsphériques, légèrement aplatis, d'environ 2 cm de haut et 2,2 cm de large, solitaires au sommet des tiges ou groupés en cymes lâches. Présence d'un involucre à bractées généralement subégales, linéaires-lancéolées, densément velues et glandulaires, de même que des réceptacles à paillettes égalant les fleurs tubuleuses. Les fleurs sont jaunes, les mâles sont légèrement glandulaires et les femelles tubuleuses, brusquement

élargies dans la partie supérieure et terminées par 5 lobes triangulaires et pubescents. Les fruits sont des akènes.

Distribution :

- R.D.Congo: Bas-Congo, Kinshasa, Bandundu, Kasai, Nord-Kivu, Sud - Kivu, Haut -Katanga, Sud- Katanga, Province orientale, Equateur
- Afrique: Burundi, Rwanda, Mali, Guinée, Sierra-Léone, Ghana, Togo, Nigeria, Cameroun, Tchad, République centre-africaine, Uganda, Angola, Zambie, Malawi, Zimbabwe.
- Asie tropicale et Chine

Synonymes: *Verbesina chinensis* L. (Chine), *Sphacophyllum candelabrum* O.HOFFM. (Angola), *A. dalzielii* Hutch (Nigeria), *A. gracilis* O.HOFFM (Angola), *A. aureus* (R.D.Congo), *A. canensis* HUTCH (Zambie).

Habitat: savanes, forêts claires, jachères, bord des sources d'eau et des marais.

Noms vernaculaires: Kasol-sol, Kisankini, Luswenswe, Makambe.

Usages médico-traditionnels:

La plante entière est utilisée en médecine traditionnelle congolaise dans le traitement de la malaria, de l'inflammation, de la fièvre typhoïde et des ulcères gastroduodénaux.

Données phytochimiques et pharmacologiques:

Dans la grande famille des *Asteraceae*, un grand nombre de composés chimiques ont déjà été isolés et ces derniers appartiennent à des groupes phytochimiques très variés: glucides, terpènes, alcaloïdes, flavonoïdes, acides gras, acides phénols et tanins. Certains de ces composés sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés antiseptiques, insecticides, antiinflammatoires, antipaludiques. D'autres se sont révélés cytotoxiques ou toxiques. Certains composés polyphénoliques et terpènes isolés de cette famille présentent un intérêt économique et commercial (Evans, 2002).

Anisopappus chinensis n'a pas fait l'objet d'un grand nombre d'études phytochimique et pharmacologique. Dans le genre *Anisopappus*, *A. pinnatifidus* a été étudiée sur le plan phytochimique. Des sesquiterpènes, des pseudoguaianolides, des diterpènes, ont été mis en évidence (Zdero, 1989).

III.2.2. *Entandrophragma palustre* STANER (Meliaceae)

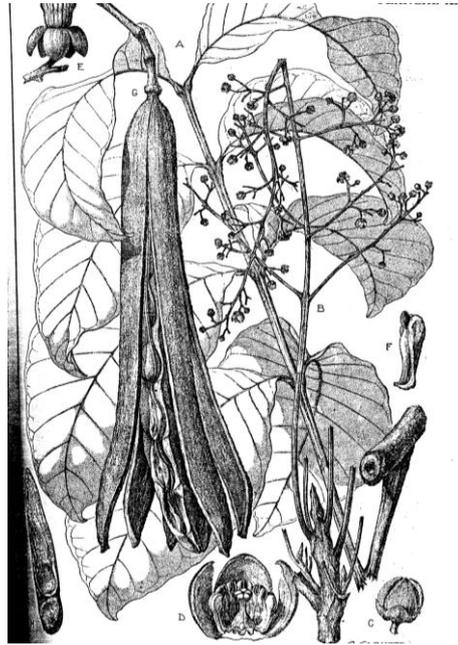


Figure III.2: *Entandrophragma palustre*

Entandrophragma palustre fait partie de la classe des *Equisetopsida*, de la sous classe des *Magnoliidae*, de l'ordre de Sapindales, de la famille des *Meliaceae* et du genre *Entandrophragma*.

Le genre africain compte au moins une dizaine d'espèces dont sept en R.D.Congo, les *Entandrophragma* fournissent par ailleurs un des acajous d'Afrique.

Les différentes espèces du genre sont caractérisées par leurs folioles qui possèdent soit des pétioles grêles de 15-35 mm de long, soit des pétioles robustes ne dépassant pas 10 mm de long et dans ce dernier cas, on distingue deux sous groupes:

1. à domaties absentes:
 - folioles grandes atteignant plus de 20 cm de long et 10 cm de large et nervures secondaires avec moins de 14 paires. On distingue
 - Les folioles subobcunclaires à ovales-oblongues (*E. palustre*),
 - Les folioles elliptiques-oblongues (*E. excelsum*)
 - folioles petites n'atteignant pas 20 cm, on distingue :
 - Nervures secondaires à 15-25 paires (*E. condollei*)

➤ Nervures secondaires à 9-12 paires (*E. angolensis*)

2. à domaties présentes: à l'aisselle de nervures secondaires, folioles n'atteignant généralement pas 20 cm, on distingue:

- des folioles oblongues, oblongues-lancéolées (*E. utile*)
- des folioles elliptiques, elliptiques oblongues, lancéolés, ovales-oblongues (*E. cylindricum*).

L'espèce *E. palustre* est un arbre atteignant 40 m de haut, possédant une cime profonde et peu étendue, un fût atteignant 20 m de haut et 1 m de diamètre, une écorce à rhytidome superficiellement fissuré et à lenticelles verruqueuses gris-brunâtre exsudant un latex poisseux. Les rameaux sont glabres, à bourgeon terminal courtement tomenteux jaune chamois. Les feuilles possèdent des pétioles plan-convexe, à bords tranchants-subailés, Pétiolule robuste, canaliculé, de 7-10 mm de long, glabre et un limbe ovale-oblong, suborbiculaire, elliptique et dissymétrique aigu à la base, présentant des nervures secondaires et des nervilles très marquées sur les deux faces. Les fleurs sont à pédicelles de plus ou moins 5 mm, le calice a une forme de plateau.

Distribution:

Forestier central: Bas- Congo, Bandundu, Kasai, Province orientale. Son habitat est la forêt marécageuse périodiquement inondée

Noms vernaculaires : Bosala, Esaka, Esaka bo liwe, Bofombo, Libuyu, Lifaki na mai, Pake.

Usages médico-traditionnels :

Le décocté obtenu des écorces est utilisé en R.D.Congo dans le traitement de la malaria, de l'inflammation, des rhumatismes, des otites et des ulcères gastro-duodénaux.

Données phytochimiques et pharmacologiques :

Plusieurs limonoïdes ont été isolés dans la famille des *Meliaceae* et dans le genre *Entandrophragma* mais l'espèce *E. palustre* est moins étudiée sur le plan phytochimique et pharmacologique. Les travaux effectués par Tithon et al. en 1934 ont mis en évidence la présence de tanins.

III.2.3. *Melia azedarach* L. (Meliaceae)

Figure III.3: *Melia azedarach*

L'espèce fait partie de la classe des *Equisetopsida*, de la sous classe de *Magnoliidae*, de l'ordre de Sapindales, de la famille des *Meliaceae*, du genre *Melia*.

Le genre *Melia* regroupe au moins 12 espèces, principalement d'Asie et d'Océanie tropicale. En R.D.Congo, deux espèces ont été trouvées dont une introduite, les deux se distinguent par les feuilles qui sont entières ou dentées et par la taille des drupes.

Melia azedarach est un arbre de plus de 15 m de haut à feuilles pennées de 35 cm de long, à limbe ovale à lancéolé, cunéiforme à arrondi et souvent dissymétrique à la base, acuminé au sommet, obtusément denté avec des dents de 3- 8 cm de long, des nervures secondaires peu visibles. Les fleurs sont pédicellées, les drupes sont ellipsoïdes, globuleuses et possèdent des graines noires.

Distribution:

Originnaire d'Inde, répandu dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde et très fréquent en R.D.Congo.

Usages médico-traditionnels:

Le décocté obtenu des feuilles est utilisé dans le traitement de la fièvre typhoïde et de la malaria en R.D.Congo, dans le traitement de la malaria au Kenya (Muregi et al., 2004, Saleem

et al., 2008, Vishnukanta Rana, 2008). En Asie, les extraits des fruits, des feuilles et de l'écorce de tronc sont utilisés dans les infections dermatologiques; ceux des fruits sont utilisés comme insecticide et antimycosique; ceux des feuilles comme antiviral et ceux des fleurs comme antibactérien. La plante est également active contre le vecteur de la malaria (Nathan et al., 2006, Mavundza et al., 2011).

Données phytochimiques et pharmacologiques :

La famille des *Meliaceae* est connue comme possédant un grand nombre de composés à propriétés insecticides (D'Ambrosso et al., 2002; Wandscheer et al, 2004). Les limonoïdes sont les plus étudiés).

III.2.4. *Physalis angulata* L. (Solanaceae)



Figure III.4: *Physalis angulata*.

Physalis angulata fait partie de la classe des *Equisetopsida*, de la sous classe des *Magnoliidae*, de l'ordre des Solanales, de la famille des *Solanaceae* et du genre *Physalis*.

Le genre *Physalis* est typique des régions chaudes et tempérées, principalement d'Amérique du Sud, il regroupe au moins une centaine d'espèces.

Physalis angulata est une herbe annuelle, glabre, rudérale et ségétale, dressée, pouvant atteindre 80-100 cm de haut.

Les feuilles sont alternes, simples, pétiolées; le limbe foliaire ovale atteint 10 cm de long et 4-6 cm de large, est largement cunéé et arrondi à la base, acuminé au sommet, sinueux-denté sur le bord, penninerve. Les fleurs sont solitaires, pentamères, pédicellées, possèdent un calice

campanulé, gamosépale, persistant et accrescent dans le fruit, atteignant 3cm de long; la corolle est de couleur jaune-pâle, gamopétale et atteint 1,5 – 3,5 cm de long. Les fruits sont bacciformes, globuleux.

La plante pousse périodiquement dans les endroits rudéraux, dans les zones marécageuses, à proximité des cultures vivrières.

Usages médico-traditionnels :

Physalis angulata est utilisée comme plante alimentaire en R.D.Congo et le décocté obtenu des feuilles ou de la plante entière est utilisé dans le traitement de la malaria, de l'inflammation et des douleurs abdominales. La plante est utilisée à Taiwan pour soigner le diabète, l'hépatite, l'asthme et la malaria (Hsieh et al., 2006), au Japon comme plante alimentaire qui réduit la tension artérielle et la glycémie (Kokai tokkio, 1986).

Données phytochimiques et pharmacologiques :

L'espèce a été beaucoup étudiée sur le plan phytochimique et pharmacologique, les extraits bruts, les flavonoïdes ainsi que les terpènes (tritépènes) déjà étudiés sont repris dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Données phytochimiques et pharmacologiques de *P.angulata*

Activités pharmacologiques	Types de composés testés	Références bibliographiques
Antiproliférative	Physangulidines A, B, C, E.	Jin, 2012. Organic Letters.
Antileishmaniose	Physalines B, D, F.	Guimaraes et al., 2009. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
	Physalines B, D, F, G	Guimaraes et al., 2010, Brazilian journal of Pharmacognosy
Immunodulation	Physalines H, T	Yu et al., 2010. International Immunopharmacology.
	Physaline B, D, F, G	Castro et al., 2008, 2009 Journal of Insect Physiology.
	Physalines B, F, G	Soares et al., 2006. Journal of Immunopharmacology.

	Withangulatine A	Sun et al., 2011. Process Biochemistry.
Antiinflammatoire	Physaline F	Brustolim et al., 2010 Journal of Natural Products.
	Physalines B, F, G, D	Soares et al., 2003, European Journal of Pharmacology.
	Physaline E	Pinto et al., 2010. Phytomedicine.
	Extrait aqueux	Bastos et al., 2008. Journal of Ethnopharmacology.
Antioxydante	MeOH	Lee et al., 2009. Food and Chemical Toxicology.
Cytotoxique	Flavonoïde hétéroside	Ismail, 2001. Fitoterapia
	Withangulatine I	Lee et al., 2008. Chemical Pharmaceutical Bulletin.
	Withangulatines (B, H) et physalines (B, D, G, F, J, T, V, U), withaphysaline A	Damu, et al., 2007. Journal of Natural Products.
	Withanguline A, physanguline K, J, B, D; withaminimine, pubenesolide	He et al., 2007. Chemistry & Biodiversity.
	Physanolide A,	Kuo et al., 2006. Organic Letters.
Antipaludique	Physalines B, D, F, G	Sa et al., 2011. Journal of Natural Products.
	Extrait aqueux	Ankrah et al., 2003. Phytotherapy Research.
antitrypanosomiase	Physagulines L, M, N, D, flavonol-glycoside	Abe et al., 2006. Chemical Pharmaceutical Bulletin.
	Physaline B	Garcia et al., 2006. Experimental Pharmacology.
	Withanolides	Nagafuji et al., 2004. Biological Pharmaceutical Bulletin.
Antitumorale	Extrait EtOAc	Hseu et al., 2001. Journal of Ethnopharmacology.
	Extrait aqueux et ethanolique	Wu et al., 2004. Life Science.
Antimicrobienne	Physaline B, D, F, G	Silva et al., 2005. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.
	Extrait EtOAc	Shim et al., 2002 Nutraceuticals and Food.
	Physaline B, D,	Januario et al., 2002 Phytotherapy Research.

III.2.5. *Strychnos icaja* Baill (Loganiaceae)



Figure III.5: *Strychnos icaja*

L'espèce fait partie de la classe des *Equisetopsida*, de la sous classe des *Magnoliidae*, de l'ordre des *Gentianales*, de la famille des *Loganiaceae* et du genre *Strychnos*.

Strychnos icaja est une liane de 20 à 100 m de long et grimpant jusqu'à la hauteur de 40 m dans les arbres. Le tronc a un diamètre de plus ou moins 15 cm, les racines possèdent une écorce rouge-orangée caractéristique. Les feuilles sont opposées, elliptiques, glabrescentes et coriaces, vert-foncées sur les deux faces et à nervures curvilignes. La tige est gris-pâle.

Nom vernaculaire : Mbondo bololo (Afrique centrale : R.D.Congo).

Usages médico-traditionnels :

Elle est utilisée comme poison de flèches et d'épreuve (ordalies), seule ou en association avec d'autres plantes par des tribus d'Afrique centrale, utilisée également en médecine traditionnelle sous forme de macéré de racines dans les vins de palme pour soigner les affections gastro-intestinales; les racines ont été utilisées par les pygmées à l'Ouest du Cameroun vers les années 1970 pour soigner le paludisme et en R.D.Congo les racines et les petites branches sont utilisées dans le même but (Newinger, 1996).

Données phytochimiques et pharmacologiques:

Plusieurs types d'alcaloïdes ont été isolés de la plante dont certains ont des propriétés antiplasmodiales (Kambu et al., 1979; Frédérich et al., 1999, 2000, 2001; Philippe et al., 2004, 2007 ; Tchinda et al., 2012).

III.3. Screening antiplasmodial *in vitro*

Les extraits totaux préparés à partir des plantes sélectionnées (Chapitre V) ont été testés tout d'abord sur la souche chloroquino-sensible (3D7) du *Plasmodium falciparum* et ceux montrant une bonne inhibition de croissance du *Plasmodium*, ont été sélectionnés pour être testés sur la souche chloroquino-résistante (W2) du *Plasmodium falciparum*.

III.3.1. Résultats

Les résultats sont repris dans les Tableaux III.2 à III.5.

Tableau III.2: Rendement en pourcentage (%) des différents extraits totaux préparés (extraction non séquentielle).

Plantes	Rendement en %					
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	H ₂ O	EtOH	EtOH/H ₂ O (50 :50)	EtOH/H ₂ O (70 : 30)
<i>A. chinensis</i>	2,3	14,3	12,7	7,5	12,3	9,6
<i>E. palustre</i>	4,4	59,0	37,1	-	-	-
<i>M. azedarach</i>	5,7	14,4	18,7	-	-	-
<i>P. angulata</i>	4,5	22,6	19,3	8,2	10,7	10,3
<i>S. icaja</i>	4,9	16,6	5,4	-	-	-

Tableau III.3: Résultats de l'activité antiplasmodiale de différents extraits obtenus par extraction non séquentielle (CI₅₀); de la cytotoxicité et détermination de l'index de sélectivité (IS)

Espèces	Partie utilisée	Extraits	3D7 CI ₅₀ : µg/ml	W2 CI ₅₀ : µg/ml	WI-38 CI ₅₀ : µg/ml	SI
<i>A. chinensis</i>	Plante entière	MeOH	8,82 ± 2,83	12,24 ± 1,91	126.33±6.50	10,32
		CH ₂ Cl ₂	6.53 ± 1.33	6.37 ± 1.16	98.25±19.32	15.42
		H ₂ O	76.51± 23.65	nd	nd	nd
		EtOH	13,55 ± 2,70	nd	nd	nd
		EtOH / H ₂ O (70/30)	14,59 ± 2.30	nd	nd	nd
		EtOH/ H ₂ O (50/50)	13,42 ± 0,04	nd	nd	nd
<i>E. palustre</i>	Ecorce de tronc	MeOH	15.84±1.19	35.98±4.61	nd	nd
		CH ₂ Cl ₂	17.69±2.16	23.18±8.10	nd	nd
		H ₂ O	>100	nd	nd	nd
<i>M. azedarach</i>	Feuilles	MeOH	55.13±10.67	44.62±3.22	nd	nd
		CH ₂ Cl ₂	19.14±10.15	28.10±1.20	nd	nd
		H ₂ O	>100	nd	nd	nd
<i>P. angulata</i>	Feuilles	MeOH	1,27±0.25	3,02±2.10	15.68±1.11	5
		CH ₂ Cl ₂	1,96 ± 1.21	2,00±0.08	7.84±0.58	4
		H ₂ O	23,10 ± 1.18	nd	nd	nd
		EtOH	2,29 ± 0,25	nd	nd	nd
		EtOH / H ₂ O (70/30)	3,61 ± 0,30	nd	nd	nd
		EtOH/H ₂ O (50/50)	6,19 ± 0,61	nd	nd	nd
<i>S. icaja</i>	Ecorce des Racines	MeOH	0,69±0.25	0,42±0.22	nd	nd
		CH ₂ Cl ₂	0,84±0.05	0,61±0.35	nd	nd
		H ₂ O	nd	nd	nd	
Témoins						
Chloroquine			0,0073±0.0022	0,0036±0.0006	nd	nd
Artemisinine			0,0024±0.00013	0,0017±0.0043	nd	nd
Camptothécine			nd	nd	0,0192±0.020	nd

Légende: nd (non déterminé)

IC₅₀ (CI₅₀): Concentration inhibitrice 50

Tableau III.4: Comparaison des résultats de l'activité antiplasmodiale *in vitro* sur la souche 3D7 des extraits totaux obtenus par extraction séquentielle et non séquentielle d'*Anisopappus chinensis*. Les numéros correspondent à l'ordre d'extraction

Plantes	Extraits	3D7 (IC ₅₀ µg/ml)	Rendement %
<i>A.chinensis</i> (extraction séquentielle)	Hexane (1)	36,76	0,9
	Acétate d'éthyle (2)	7,08	2
	Méthanol (3)	20,53	4,7
<i>A.chinensis</i> (extraction séquentielle)	Dichlorométhane (1)	6,24	3,5
	Méthanol (2)	21,69	14,3
<i>A.chinensis</i> Extraction non séquentielle	Dichlorométhane	6.93	3.3
	Méthanol	8.92	14.1

Tableau III.5: Résultats de test d'hémolyse des extraits d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata* exprimés en pourcentage.

Longueur d'onde (nm)	% d'hémolyse des extraits					
	<i>Anisopappus chinensis</i>			<i>Physalis angulata</i>		
	H ₂ O	CH ₂ Cl ₂	MeOH	H ₂ O	CH ₂ Cl ₂	MeOH
550	0,29	0,7	0,03	0,26	1,4	0,13
570	0,27	0,09	0,24	0,18	0,65	0,15
570	0,03	0,24	0,21	0,15	0,55	0,09

III.3.2. Discussion

Les extraits MeOH et CH₂Cl₂ de *Strychnos icaja* ont montré une activité antiplasmodiale importante sur les deux souches de *Plasmodium falciparum*. Les CI₅₀ confirment bien les valeurs trouvées par Fréderich et al. en 1999, 2000, 2001 et Philippe et al. en 2007 (CI₅₀ ± 1µg/ml).

Les extraits MeOH et CH₂Cl₂ de *Physalis angulata* ont montré une activité très intéressante sur les deux souches (CI₅₀ ≤ 3µg/ml), ces valeurs sont meilleures que celles trouvées par Zirihhi et al. en 2005; Hsieh et al., en 2006; Kvist et al. en 2006. Les extraits éthanoliques et hydroéthanoliques n'ont été testés que sur la souche 3D7 avec une CI₅₀ ≤ 5µg/ml.

Les extraits au MeOH et CH₂Cl₂ d'*Anisopappus chinensis* ont montré une activité intéressante sur la souche 3D7 avec une CI₅₀ autour de 7µg/ml tandis qu'au vu de la souche W2, seul l'extrait au CH₂Cl₂ a montré une activité intéressante (CI₅₀: 6,54 µg/ml) contre 12,24 µg/ml de l'extrait MeOH. Les extraits éthanoliques et hydroéthanoliques ont été moins actifs sur la souche 3D7 (CI₅₀ < 20µg/ml).

Les extraits d'*Entandrophragma palustre* et de *Melia azedarach* se sont montrés les moins actifs sur les deux souches étudiées. Les extraits aqueux de toutes les plantes se sont montrés inactifs sauf pour *Physalis angulata*, (activité modérée).

Les extraits aqueux, dichlorométhane, méthanoliques d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata* ne sont pas hémolytiques *in vitro*, ce qui confirme une activité antiplasmodiale spécifique sur les deux souches de *Plasmodium falciparum*.

Sur base des valeurs de CI₅₀ obtenues, *Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata* ont été sélectionnées pour la poursuite de nos travaux. Quant à *Strychnos icaja*, plusieurs études ont déjà été faites sur l'activité antiplasmodiale et celles-ci ont porté sur les extraits totaux et sur les produits purs isolés (Philippe et al., 2004, 2007 ; Frédérick et al., 1999, 2000, 2001).

III.4. Test de cytotoxicité *in vitro*

Les extraits d'*Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata* ont été testés *in vitro* sur la lignée cellulaire WI-38 selon la méthode décrite au chapitre V. Les résultats sont repris dans le tableau III.2.

III.4.1. Discussion

Les extraits d'*Anisopappus chinensis* se sont révélés non cytotoxiques comparativement à ceux de *Physalis angulata* avec des index de sélectivité respectifs de 10 et 15 (*Anisopappus chinensis*) contre 4 et 5 pour *Physalis angulata*. Cela indique donc une bonne sélectivité d'*Anisopappus chinensis* pour *P. falciparum*. Les valeurs des index de sélectivité de *Physalis angulata* confirment bien les travaux antérieurs effectués par Damu et al. en 2007.

III.5. Screening antiplasmodial *in vivo*

Certains extraits d'*Anisopappus chinensis*, de *Physalis angulata* et d'*Entandrophragma palustre* ont été testés *in vivo* sur des souris NMRI et Swiss infestées par le *Plasmodium berghei berghei* selon la méthode décrite au chapitre V.

Deux essais ont été effectués avec deux doses différentes, la première évaluation a été faite à la dose de 300 mg/kg selon la méthode de Tona et al., 2001 et la seconde à 400 mg/kg selon la méthode classique du test suppressif de Peters et al., 1975. L'évolution du poids corporel des souris ainsi que la viabilité de celles-ci ont été contrôlés durant l'essai.

III.5.1. Résultats

Les résultats obtenus sont repris dans les tableaux III.6 à III.9 et ces derniers sont associés aux figures III.6 à III.13.

Tableau III.6: Pourcentage d'inhibition de la parasitémie aux jours 8 et 9 à la dose de 300 mg/kg. P value calculée selon le test de t-Student par rapport au test selon Tona et al.

Plantes	Témoins	extraits	% d'inhibition J8	Pvalue	% d'inhibition J9	Pvalue
<i>A. chinensis</i>		MeOH	80,5	0,001	63,2	0,007
		EtOH	65,5	0,004	43,9	0,047
		CH ₂ Cl ₂	60,8	0,013	47,7	0,035
		H ₂ O	85,6	0,002	46,6	0,027
<i>P. angulata</i>		H ₂ O	58,7	0,005	61,2	0,006
		EtOH	43,4	0,005	61,6	0,001
<i>E. palustre</i>		H ₂ O	52,2	0,036	73,3	0,034
	Chloroquine		80,0	0,002	100,0	0,035
	Quinine		70,3	0,010	73,3	0,001

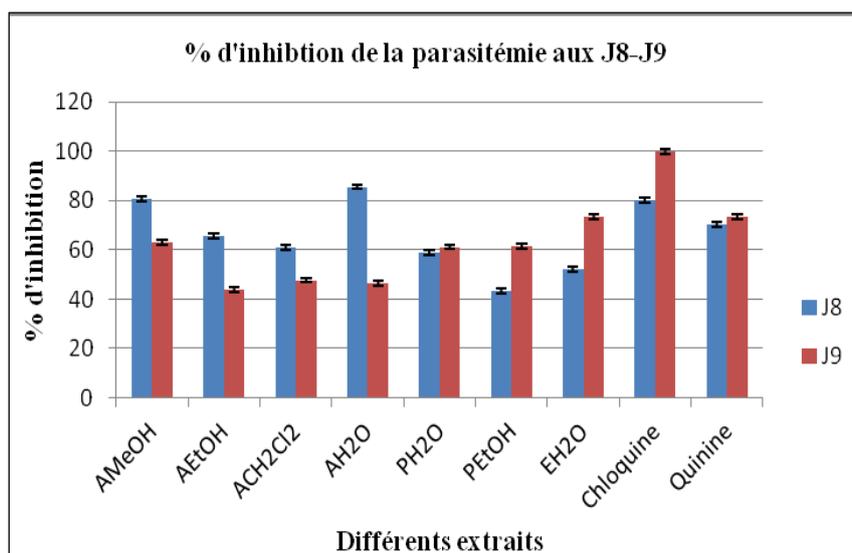


Figure III. 6: Pourcentage d'inhibition de la parasitémie des différents extraits aux jours 8 et 9 (Test selon Tona et al.).

Tableau III.7: Pourcentage d'inhibition de la parasitémie de différents extraits à la dose de 400 mg/kg aux jours 4 et 7. P value calculée selon le test de t-Student par rapport au test de Peters.

Plantes	Témoins	Extraits	% inhibition J4	pvalue	% inhibition J7	P value
<i>A.chinensis</i>		MeOH	51,3	0,017	65,6	0,004
<i>P.angulata</i>		MeOH	42,8	0,038	68,9	0,020
	Chloroquine (10mg/kg)		76,5	0,021	85,3	0,004
<i>A.chinensis</i>		CH ₂ Cl ₂	45,6	0,007	65,6	0,004
<i>P.angulata</i>		CH ₂ Cl ₂	67,6	0,024	74,3	0,021
	Chloroquine (10mg/kg)		76,1	0,008	81,1	0,011
<i>A.chinensis</i>		H ₂ O	81,7	0,012	79,2	0,038
<i>P.angulata</i>		H ₂ O	69,5	0,005	79,9	0,023
	Chloroquine (10mg/kg)		82,6	0,032	88,9	0,002

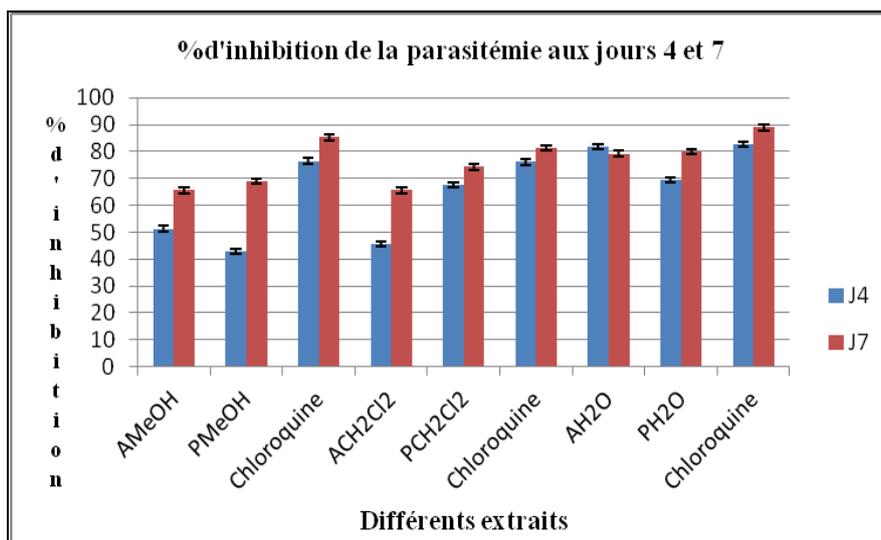


Figure III.7: Pourcentage d’inhibition de la parasitémie des différents extraits aux jours 4 et 7   la dose de 400mg/kg (Test de Peters).

Tableau III.8 : Variation du poids moyen (g) des souris traitées   la dose de 400 mg/kg (test de Peters).

Plantes	Témoins	Extraits	J4	J 7	J14	J21	J28
<i>A.chinensis</i>		MeOH	21,0	18,6	15,6	19,0	20,5
<i>P.angulata</i>		MeOH	21,0	18,6	15,6	17,5	21,5
	Chloroquine		22,4	21,0	20,2	20,6	23,6
	Négatif		21,0	18,6	17,3	16,3	16,0
<i>A.chinensis</i>		CH ₂ Cl ₂	20,2	20,2	18,0	17,4	-
<i>P.angulata</i>		CH ₂ Cl ₂	20,2	20,2	16,9	15,0	16,1
	Chloroquine		24,8	23,4	19,4	21,2	22,6
	Négatif		18,0	15,1	-	-	-
<i>A.chinensis</i>		H ₂ O	27,6	26,2	21,4	24,6	25,8
<i>P.angulata</i>		H ₂ O	25,8	21,2	21,0	23,6	25,0
	Chloroquine		25,8	24,0	23,6	26,6	28,0
	Négatif		25,8	22,0	19,6	18,9	18,0

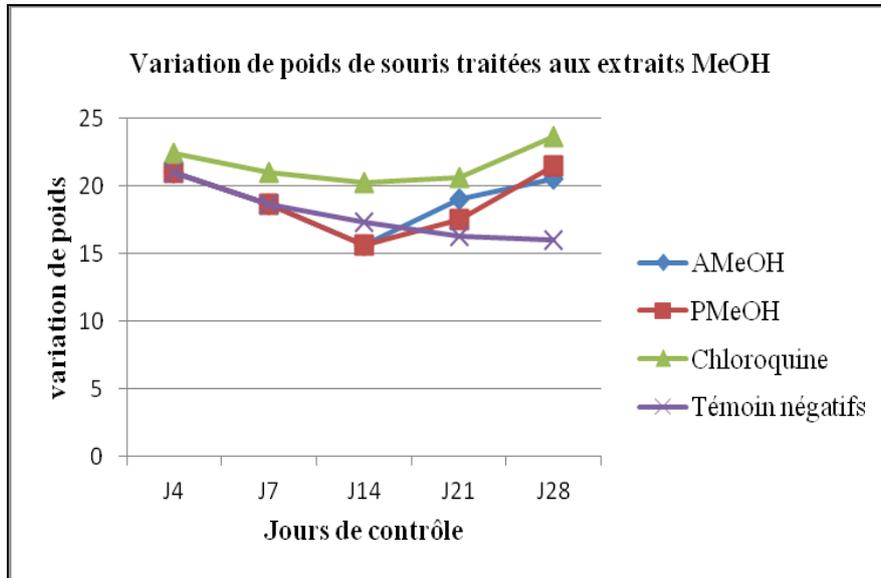


Figure III.8: Variation du poids (g) des souris traitées aux extraits MeOH d' *A.chinensis* et de *P. angulata* à la dose de 400mg/kg (test de Peters).

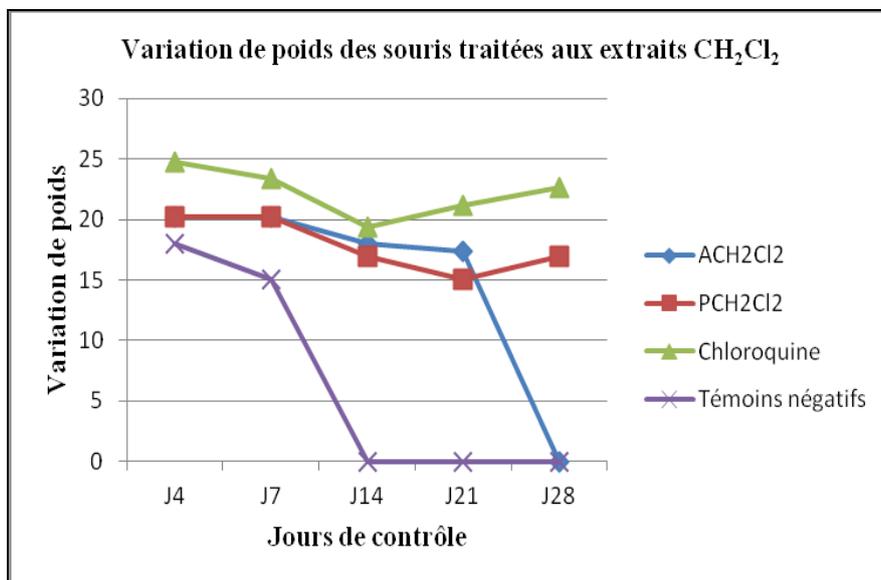


Figure III.9: Variation du poids des souris traitées aux extraits CH₂Cl₂ d' *A.chinensis* et de *P.angulata* à la dose 400mg/kg (Test de Peters)

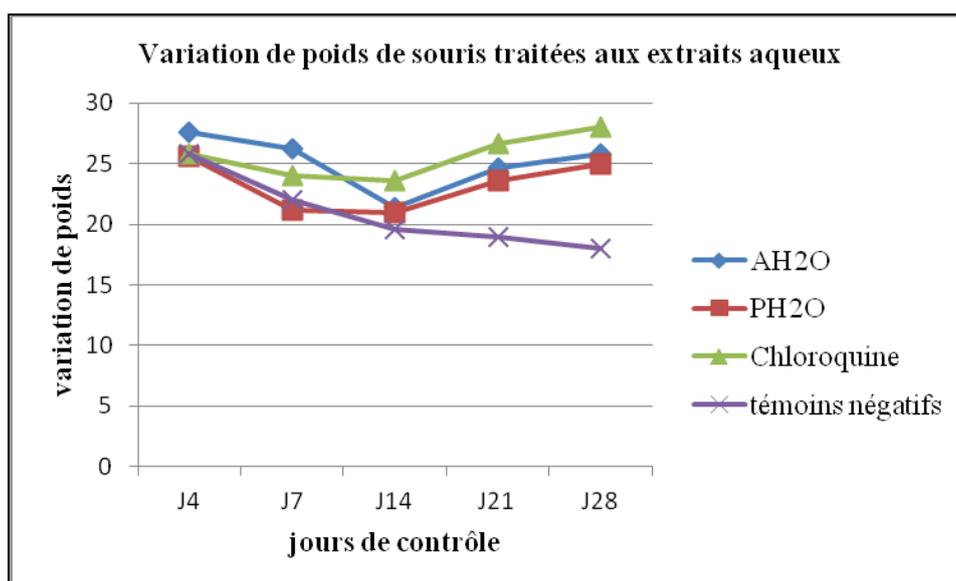


Figure III.10: Variation du poids des souris traitées aux extraits aqueux d'*A. chinensis* et de *P. angulata* à la dose de 400 mg/kg (test de Peters).

Tableau III.9: Viabilité (%) des souris traitées aux extraits de *A. chinensis* et *P. angulata* à la dose de 400 mg/kg, du jour 4 au jour 28 (test de Peters).

Plantes	Témoins	Extraits	J4	J 7	J14	J21	J28
<i>A. chinensis</i>		MeOH	100	80	60	40	40
<i>P. angulata</i>		MeOH	100	100	80	80	80
	Chloroquine		100	100	100	100	100
	Négatifs		100	60	60	40	20
<i>A. chinensis</i>		CH ₂ Cl ₂	100	60	40	20	-
<i>P. angulata</i>		CH ₂ Cl ₂	100	100	60	40	40
	Chloroquine		100	100	100	100	100
	Négatifs		100	40	-	-	-
<i>A. chinensis</i>		H ₂ O	100	100	100	100	100
<i>P. angulata</i>		H ₂ O	100	100	100	80	80
	Chloroquine		100	100	100	100	100
	Négatifs		100	60	60	40	40

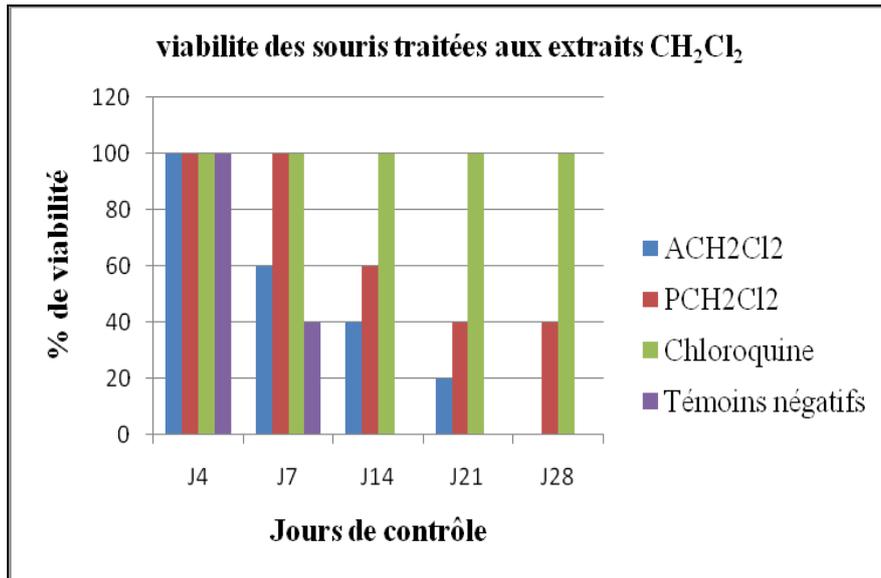


Figure III.11: Viabilité (%) des souris traitées aux extraits CH₂Cl₂ d'*A. chinensis* et de *P. angulata* à la dose de 400mg/kg (Test de Peters).

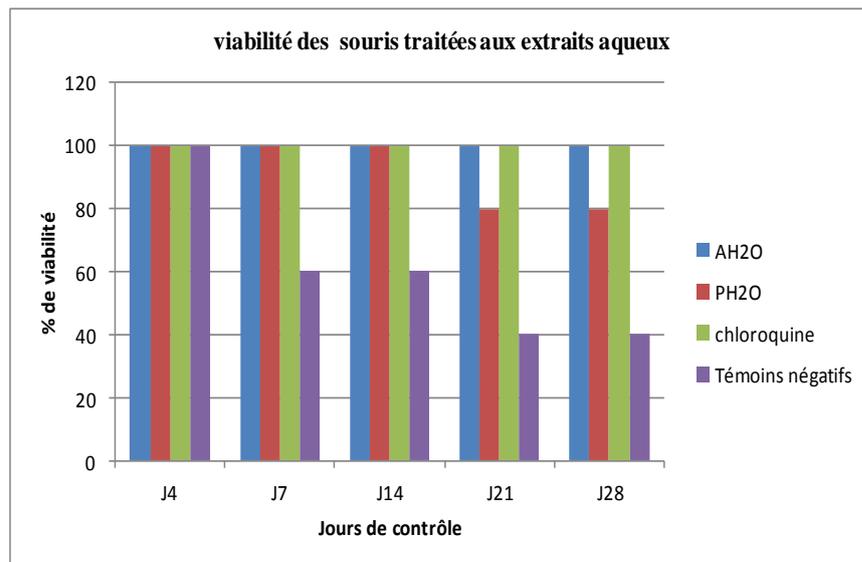


Figure III.12: Viabilité (%) des souris traitées aux extraits aqueux d'*A. chinensis* et de *P. angulata* à la dose de 400mg/kg (test de Peters).

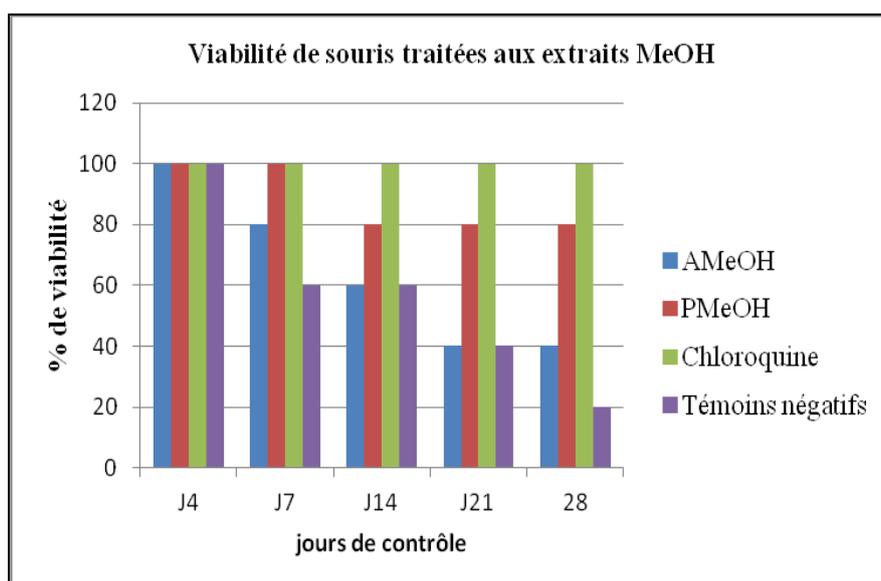


Figure III.13: Viabilité (%) des souris traitées aux extraits MeOH d'*A. chinensis* et de *P. angulata* à la dose de 400mg/kg (test de Peters).

III.5.2. Discussion

À la dose de 300 mg/kg comme à celle de 400 mg/kg, et quel que soit le protocole expérimental utilisé, les différents extraits testés, y compris les extraits aqueux, ont montré une inhibition importante de la parasitémie statistiquement significative. Ceci pourrait expliquer leur utilisation en médecine traditionnelle dans la fièvre et la malaria. On peut également noter une nette reprise de poids des souris traitées aux extraits aqueux et méthanoliques d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata*, alors qu'une certaine toxicité semblerait se manifester en ce qui concerne les extraits au dichlorométhane.

III.6. Screening antiplasmodial *ex-vivo* (*in vitro*)

Les extraits totaux d'*Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata* ont été mis en culture avec du sang impaludé obtenu des patients atteints du paludisme à *Plasmodium falciparum* selon la méthode décrite au chapitre V.

III.6.1. Résultats

Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes et sont repris dans les tableaux III.10 à III.12 et figures III.14 à III.15.

Tableau III.10: Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes par différents extraits d'*Anisopappus chinensis*.

Concentration (µg/ml)	Quinine	Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en fonction des extraits testés					
		CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	MeOH	EtOH/H ₂ O (70:30)	EtOH/H ₂ O (50:50)	EtOH
200	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	100	100	100	100	100
50	99	100	100	100	100	100	100
25	85	87	95	100	100	100	88
12,5	70	79	76	78	99	99	48
6,25	56	77	60	74	74	91	43
3,125	48	49	34	64	64	79	33
1,5625	45	47	28	46	45	35	6

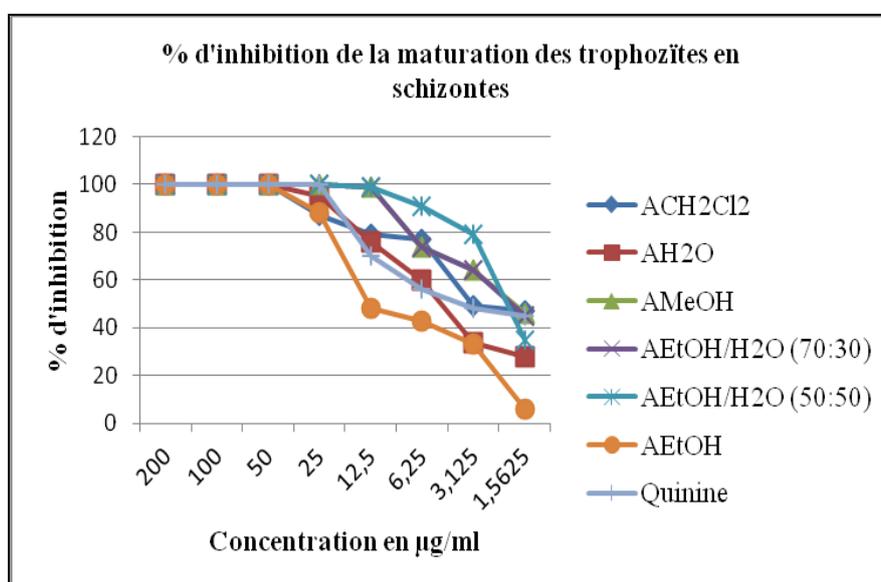
**Figure III. 14: Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes par différents extraits d'*A. chinensis*.**

Tableau III.11: Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes par différents extraits de *Physalis angulata*.

Concentration (µg/ml)	Quinine	Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en fonction des extraits					
		CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	MeOH	EtOH/H ₂ O (70:30)	EtOH/H ₂ O (50:50)	EtOH
200	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	99	100	100	100	100
50	99	100	97	100	100	100	100
25	85	95	97	100	100	98	88
12,5	70	78	95	93	99	95	76
6,25	56	53	82	88	95	95	41
3,125	48	39	72	70	95	85	29
1,5625	45	39	32	43	35	35	29

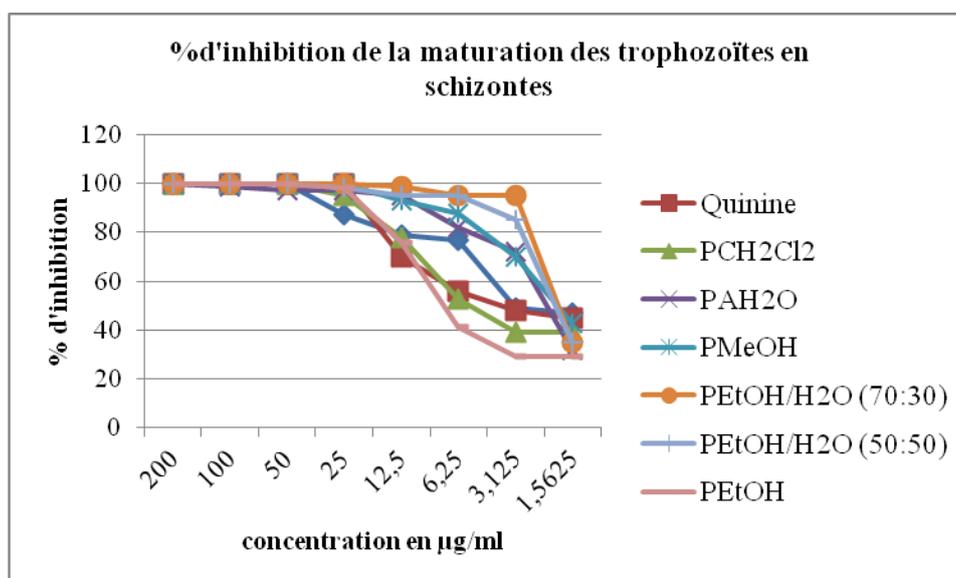


Figure III. 15: Pourcentage d'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes par différents extraits de *P. angulata*

Tableau III.12: Concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) des extraits d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata*

Extraits	CI ₅₀ (µg/ml) <i>P.angulata</i>	CI ₅₀ (µg/ml) <i>A.chinensis</i>
CH ₂ Cl ₂	4,34	5,37
H ₂ O	5,24	2,98
MeOH	2,22	3,08
EtOH/H ₂ O (70 :30)	2,14	3,09
EtOH /H ₂ O (50 :50)	2,58	1,65
EtOH	13,01	7,59
Témoin		
Quinine	3,51µg/ml	

III.6.2. Discussion

Les extraits polaires et apolaires d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata* se sont également révélés actifs *ex- vivo* sur le *Plasmodium falciparum* (CI₅₀ < 15µg/ml), les extraits aqueux et hydroéthanolique (50:50) d'*Anisopappus chinensis* étant les plus actifs (CI₅₀ < 3µg/ml).

III. 7. Toxicité *in vivo* des extraits aqueux totaux d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata*.

Les doses létales 50 et 100 des extraits aqueux d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata* ont été déterminées chez des rats wistar mâles et femelles selon la méthode décrite au chapitre IV, les résultats obtenus sont repris dans les tableaux III.13 à III.19 et aux figures III.16 à III.21.

III.7.1. Résultats

III.7.1.1. Résultats des tests de toxicité aigue des extraits aqueux d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata*.

Tableau III.13: Administration unique de doses variables de l'extrait aqueux d'*Anisopappus chinensis* chez les rats wistar mâles et femelles (toxicité aigue).

Plantes	Doses (g/kg)	Rats	Nombre/cage	décès
<i>A.chinensis</i>	1	♂	5	0
		♀	5	0
	2	♂	5	0
		♀	5	0
	3	♂	5	0
		♀	5	0
	4	♂	5	0
		♀	5	0
	6	♂	5	0
		♀	5	0
	8	♂	5	0
		♀	5	5
	10	♂	5	5
		♀	5	5
	12	♂	5	5
		♀	5	5
	14	♂	5	5
		♀	5	5
	15	♂	5	5
		♀	5	5
Témoins (T)	Eau de robinet	♀	5	0
		♂	5	0

Légende:

♂ : mâles
♀ : femelles

Tableau III.14: Administration unique de doses variables de l'extrait aqueux de *Physalis angulata* chez des rats wistar mâles et femelles (toxicité aigüe).

Plantes	Doses/g/kg	Rats	Nombre/cage	décès
<i>P.angulata</i>	1	♂	5	0
		♀	5	0
	2	♂	5	0
		♀	5	0
	3	♂	5	0
		♀	5	0
	4	♂	5	0
		♀	5	0
	5	♂	5	1
		♀	5	1
	6	♂	5	3
		♀	5	3
	7	♂	5	5
		♀	5	5
9	♂	5	5	
	♀	5	5	
11	♂	5	5	
	♀	5	5	
13	♂	5	5	
	♀	5	5	
Témoins (T)	Eau de robinet	♂	5	0
		♀	5	0

Légende :

♂ : mâles
♀ : femelles

III.7.1.2. Discussion

Les doses létales 100 déterminées (la plus petite dose qui tue tous les animaux) pour nos deux extraits sont respectivement de 10 g/kg (*Anisopappus chinensis*) et de 6,5g/kg (*Physalis angulata*). La plus grande dose qui ne tue pas tous les animaux soumis à l'expérimentation a été également déterminée, elle est respectivement de 8 g/kg (*Anisopappus chinensis*) et 4,5g/kg (*Physalis angulata*).

III.7.2. Résultats de la dose létale 50 (DL₅₀)

Les deux doses déterminées ci-dessus (dose létale 100, la plus petite dose qui tue et la plus grande qui ne tue pas) ont été utilisées dans la détermination de la dose létale 50.

III.7.2.1. Détermination de la dose létale 50 d'*Anisopappus chinensis*Tableau III.15: Détermination de la dose létale 50 de l'extrait aqueux d'*Anisopappus chinensis*. (Données expérimentales).

Doses (g/kg)	Rats	Nombre/cage	Décès
8	♂	10	0
	♀	10	0
8,5	♂	10	2
	♀	10	2
9	♂	10	4
	♀	10	2
9,5	♂	10	6
	♀	10	4
10	♂	10	10
	♀	10	10
Témoins (T)	♂	10	0
	♀	10	0

Différents modèles de régression ont été testés en vue de choisir celui qui présenterait un bon coefficient de corrélation (R^2) avec le meilleur graphique de résidus des différents points expérimentaux.

Tableau III.16: Différents modèles de régression et leurs paramètres chez les rats mâles pour *Anisopappus chinensis*.

Modèle de régression	Equation de la droite	Valeur de R^2	DL ₅₀
Linéaire	$Y = 4,8x - 38,8$	0,97	8,9
Logarithmique	$Y = 42,8 \ln(x) - 89,5$	0,96	9
Polynomiale (2)	$Y = 1,142x^2 - 15,8x + 53,2$	0,99	9,2

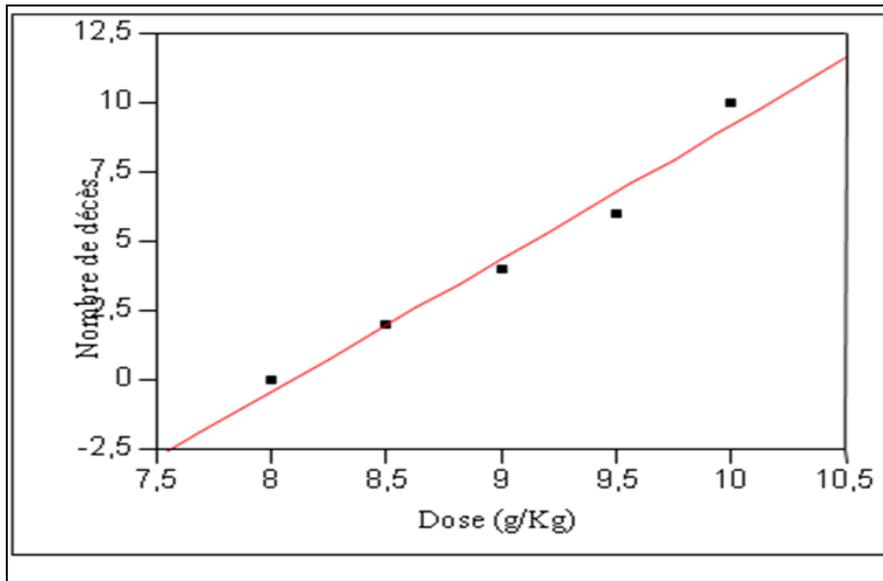


Figure III.16: Relation dose-effet chez les rats mâles et distribution des points expérimentaux pour *A.chinensis*

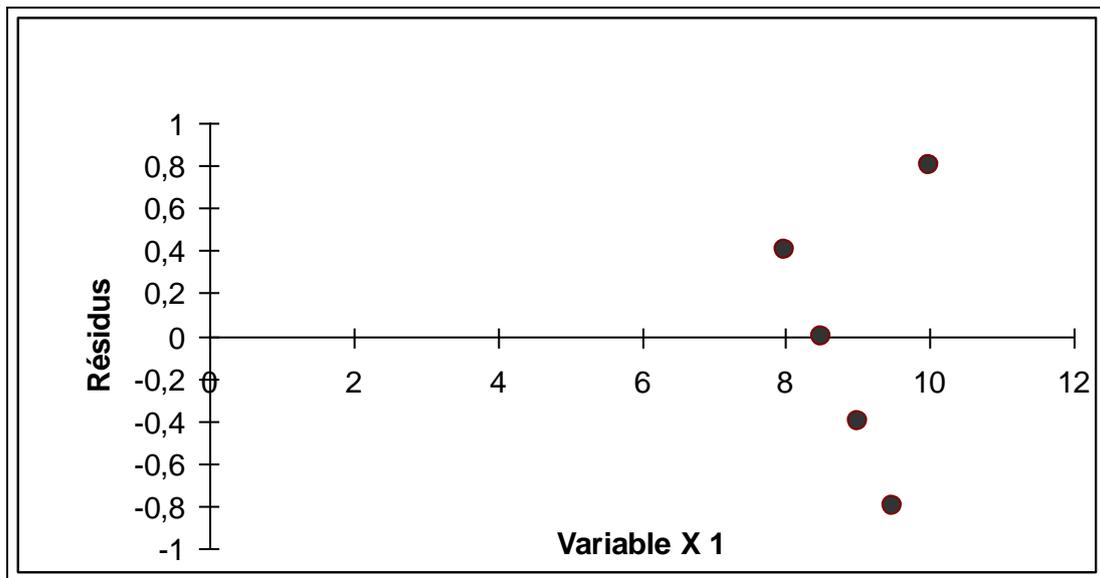


Figure III.17: Graphique des résidus des rats mâles pour *A. chinensis*.

Tableau III.17: Différents modèles de régression et leurs paramètres chez les rats femelles pour *Anisopappus chinensis*.

Modèle de régression	Equation de la droite	Valeur de R ²	DL50
Linéaire	Y= 4,4x- 36	0,81	9,1
Logarithmique	Y=38,9ln(x)- 81,8	0,79	9,1
Polynomiale (2)	Y= 2,857x ² – 47,03x+194	0,93	9,5

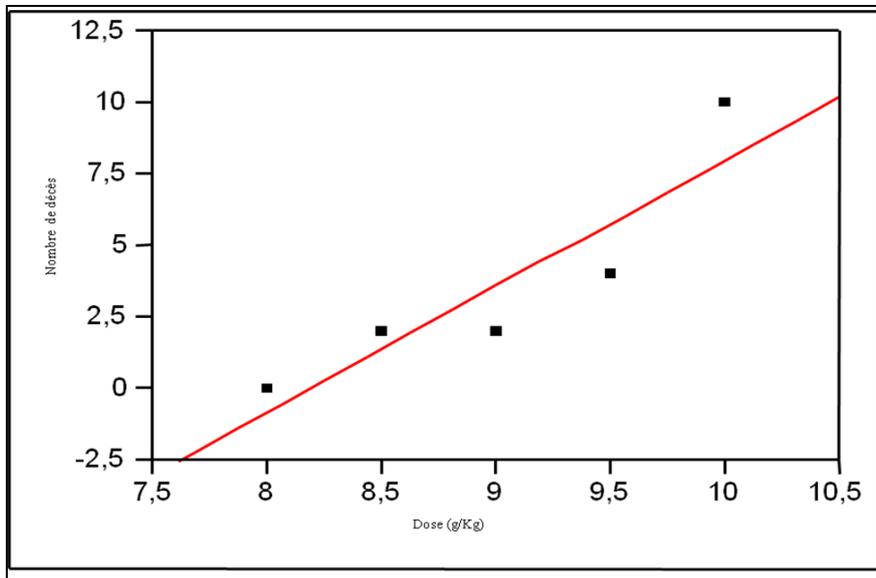


Figure III.18 : Relation dose-effet et distribution des points expérimentaux des rats femelles pour *A.chinensis*.

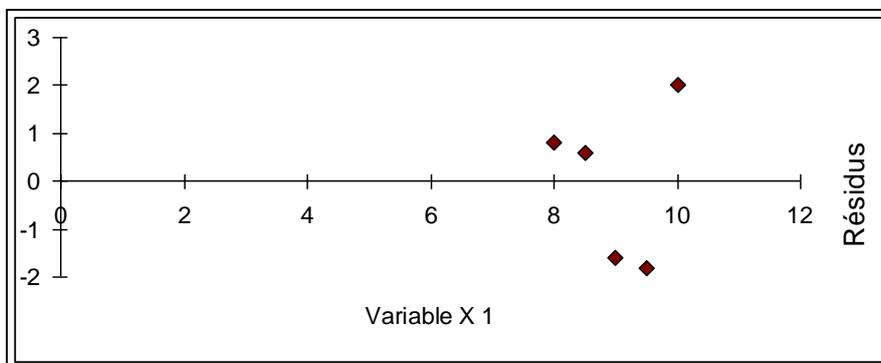


Figure III.19: Graphique de résidus des rats femelles pour *A.chinensis*.

III.7.2.2. Détermination de la dose létale 50 de *Physalis angulata*Tableau III.18: Détermination de la dose létale 50 de l'extrait aqueux de *Physalis angulata*. (Données expérimentales).

Doses (gr/kg)	Rats	Nombre/cage	Décès
4,5	♂	10	0
	♀	10	0
5,0	♂	10	2
	♀	10	2
5,5	♂	10	4
	♀	10	4
6,0	♂	10	6
	♀	10	6
6,5	♂	10	10
	♀	10	10
Témoins (T)	♂	10	0
	♀	10	0

Tableau III.19: Différents modèles de régression et leurs paramètres expérimentaux pour les rats mâles et femelles traités par *Physalis angulata*.

Modèle de régression	Equation de la droite	Valeur de R ²	DL ₅₀ (g /kg)
Linéaire	Y= 5,2x- 24,4	0,97	5,654
Logarithmique	Y= 29,5ln(x) - 45,9	0,95	5,627
Exponentielle	Y= 0,0114 e ^{1,0468} x	0,98	5,812

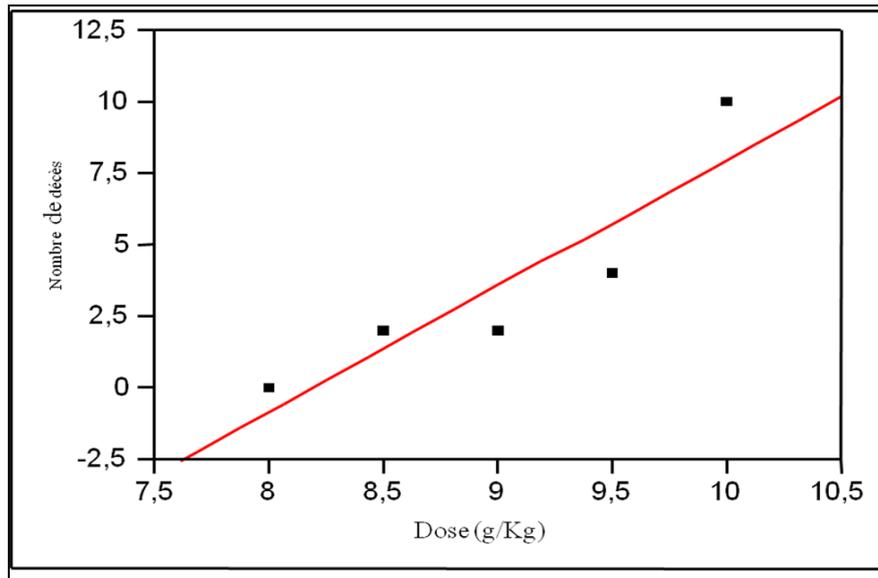


Figure III.20: Relation dose-effet et distribution de points expérimentaux pour les rats mâles et femelles traités par *Physalis angulata*.

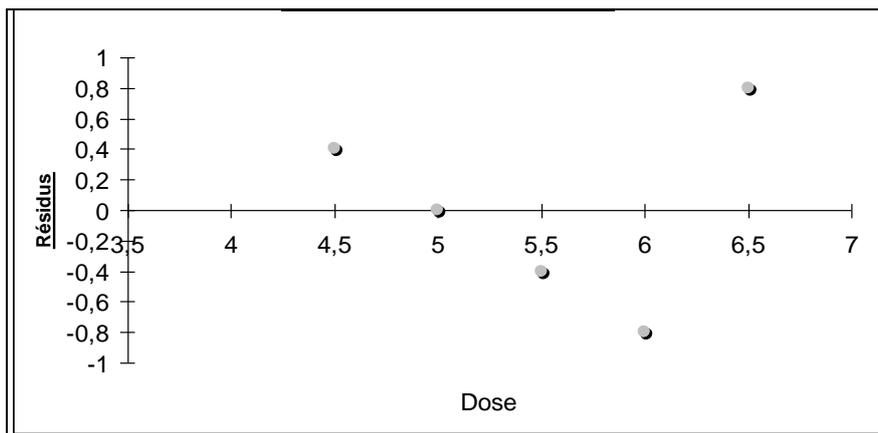


Figure III.21: Graphique de résidus pour les rats mâles et femelles traités par *Physalis angulata*.

III.7.2.3. Discussion

De tous les modèles testés, le modèle de régression linéaire a été choisi sur base de son coefficient de corrélation et de son graphique de résidu. En utilisant ce modèle, les doses létales 50 de deux extraits sont respectivement de 8,9 et 9,1 g/kg (rats mâles et femelles traités par *Anisopappus chinensis*) et 5, 65 (rats mâles et femelles traités par *Physalis angulata*). Nous avons notifié une différence de comportement entre les mâles et les femelles pour *Anisopappus chinensis*. Par contre, dans *Physalis angulata* les deux sexes ont présenté un même comportement avec une même dose létale 50.

Malgré l'index de sélectivité relativement bas (IS: 4-5) de *Physalis angulata* (extrait MeOH), la dose létale 50 de l'extrait aqueux est supérieure à 5 g/kg, Ceci pourrait confirmer la faible toxicité de l'extrait aqueux in vivo.

L'extrait aqueux d'*Anisopappus chinensis* s'est révélé moins toxique par rapport à *Physalis angulata* dose létale > 8g /kg

Un léger changement du rythme respiratoire et de la mobilité a été enregistré 30 minutes à 1 heure après l'administration pour les deux plantes.

III.8. Dosage de paramètres biochimiques et hématologiques

Les enzymes hépatiques (GOT, GPT) et les paramètres hématologiques (glucose, urée, créatinine, hémoglobine) ont été dosés dans le sang prélevé du cœur des rats ayant survécu après 14 jours d'observations selon la méthode décrite au chapitre V. Les résultats sont repris dans les tableaux III.20 et III.21.

III.8.1. Résultats du dosage des paramètres biochimiques et hématologiques pour *A.chinensis*.

Tableau III.20: Valeur des paramètres biochimiques et hématologiques des rats mâles et femelles traités par *A.chinensis*.

Doses (g/kg)	Rats	GOT (U/L)	GPT (U/L)	Créatinine (mg/dl)	Urée (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Hb (g/dl)
	T♂	77,4±1,24	32,1±0,74	0,9±0,08	35,4±0,91	97,1±1,54	12,9±0,42
	T♀	91,9±0,96	26,5±1,05	0,7±0,08	32,0±1,67	80,4±1,86	12,2±0,86
8,0	♂	76,1±1,38	38,9±0,54	0,9±0,10	41,6±1,51	96,7±1,71	12,9±0,92
	♀	80,9±0,71	26,5±1,09	0,8±0,10	32,2±0,83	84,6±1,45	11,9±0,40
8,5	♂	74,8±0,93	40,7±0,76	0,7±0,08	41,7±0,82	101,6±1,84	12,6±1,07
	♀	80,8±1,24	28,8±1,37	0,9±0,07	37,3±1,23	91,2±0,98	11,8±0,43
9,0	♂	74,0±1,39	41,6±0,83	0,7±0,10	43,7±1,03	107,1±2,09	11,9±0,73
	♀	66,1±1,04	29,7±1,24	0,9±0,05	41,9±0,78	99,5±1,37	11,7±0,91
9,5	♂	61,5±0,60	45,5±1,76	0,7±0,07	44,2±0,53	121,5±0,83	11,9±0,20
	♀	61,1±0,19	34,8±0,33	1,0±0,05	43,9±0,86	101,1±0,91	11,6±0,52

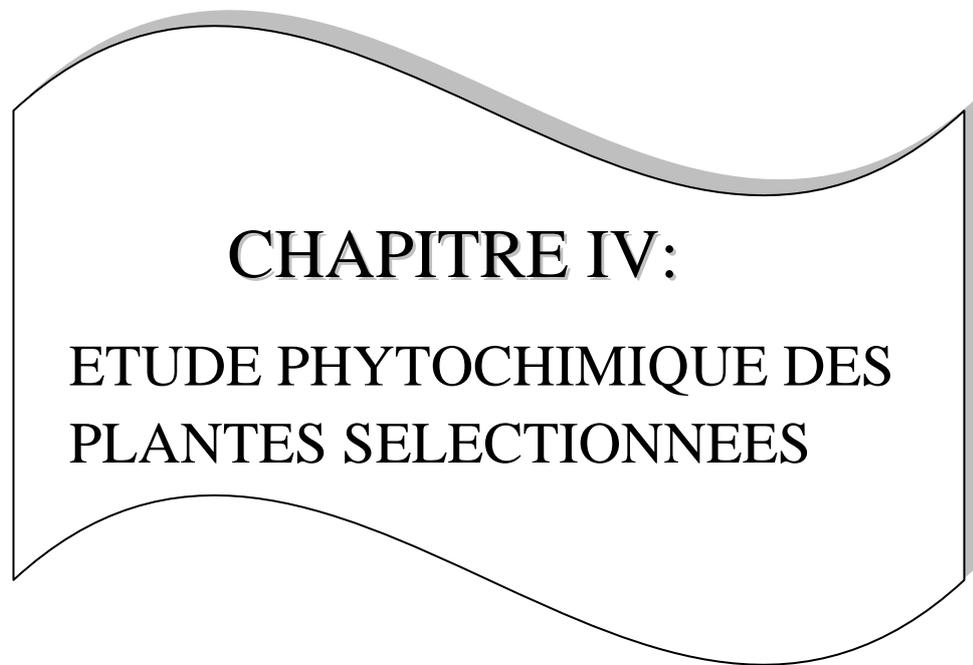
III.8.2. Résultats du dosage des paramètres biochimiques et hématologiques pour *P.angulata*.

Tableau III.21: Valeurs des paramètres biochimiques et hématologiques des rats mâles et femelles traités par *P.angulata*.

Doses (gr/kg)	Rats	GOT (U/L)	GPT (U/L)	Créatinine (mg/dl)	Urée (mg/dl)	Glucose (mg /dl)	Hb (g/dl)
	T♂	76,1± 1,92	32,9±0,69	0,8±0,08	34,1±0,28	80,6±1,97	12,5±0,31
	T♀	90,6±0,76	27,9±0,68	0,7±0,05	32,1±0,68	81,4±1,97	12,5±0,86
4,5	♂	62,1±1,09	33,5±1,55	0,7± 0,08	38,2±0,45	65,5±1,35	12,3±0,69
	♀	86,6±0,79	26,5±0,86	0,7±0,04	39,6±0,77	72,7±1,78	10,9±0,86
5,0	♂	56,3±0,54	34,1±1,09	0,7±0,05	40,5±0,56	60,1±0,14	12,1±0,04
	♀	81,7±0,19	26,8±0,25	0,7±0,05	40,5±0,61	66,7±1,82	10,6±0,41
5,5	♂	53,7±1,84	40,3±0,44	0,6±0,06	54,1±0,20	57,2±0,38	10,5±0,36
	♀	79,6±0,72	29,7±1,06	0,6±0,04	46,1±1,44	60,5±0,39	10,1±0,13
6,0	♂	46,6±0,63	46,5±1,79	0,6±0,05	61,6±1,86	44,7±0,71	8,5±0,10
	♀	75,4±0,30	34,8±1,45	0,6±0,05	57,8±0,98	45,9±0,48	7,7±0,34

III.8.3. Discussion

Une différence a été enregistrée entre les rats mâles et femelles traités par *Anisopappus chinensis* dans le dosage de la créatinine. L'augmentation de la dose d'extrait serait responsable de la diminution de la créatinine chez les mâles contre une augmentation chez les femelles. Les autres valeurs mesurées diminuent ou augmentent pour les deux sexes (Tableau III.21). Les rats mâles et femelles traitées par *Physalis angulata* ont présenté des valeurs mesurées similaires pour les deux sexes, correspondant à une diminution ou à une augmentation (Tableau III.22). La diminution du taux d'hémoglobine et de glucose observée chez les rats ayant reçu l'extrait aqueux de *Physalis angulata*, confirme les travaux effectués par Kokai Tokkyo, 1986.



CHAPITRE IV:
**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES
PLANTES SELECTIONNEES**

CHAPITRE IV: ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES PLANTES SELECTIONNEES

IV.1. Introduction – Screening phytochimique

Un screening phytochimique préliminaire a été réalisé sur les plantes sélectionnées grâce à l'étude ethnobotanique. Le mode opératoire a été décrit au chapitre V. Ce screening a permis d'identifier les groupes phytochimiques majoritaires et ceux-ci sont décrits dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1: Screening phytochimique préliminaire des plantes sélectionnées.

Plantes	Classes phytochimiques					
	Acides phénols	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Terpènes	Saponines
<i>Anisopappus chinensis</i>	++	-	++	+	++	++
<i>Entandrophragma palustre</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Melia azedarach</i>	-	-	+	+	+	±
<i>Physalis angulata</i>	+	-	+	+	++	++
<i>Strychnos icaia</i>	+	++	±	-	±	±

Légende : + : Présence

++ : Présence en quantité importante

- : Absence

± : Présence en traces

Les deux plantes que nous avons choisies de travailler plus particulièrement par la suite, *Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata* (III.3.2) contiennent des flavonoïdes, des acides phénols et des terpènes. Ces composés pourraient jouer un rôle dans l'activité antiplasmodiale. C'est ainsi que notre étude phytochimique approfondie s'est basée sur l'isolement des terpènes et des flavonoïdes dans les plantes sélectionnées.

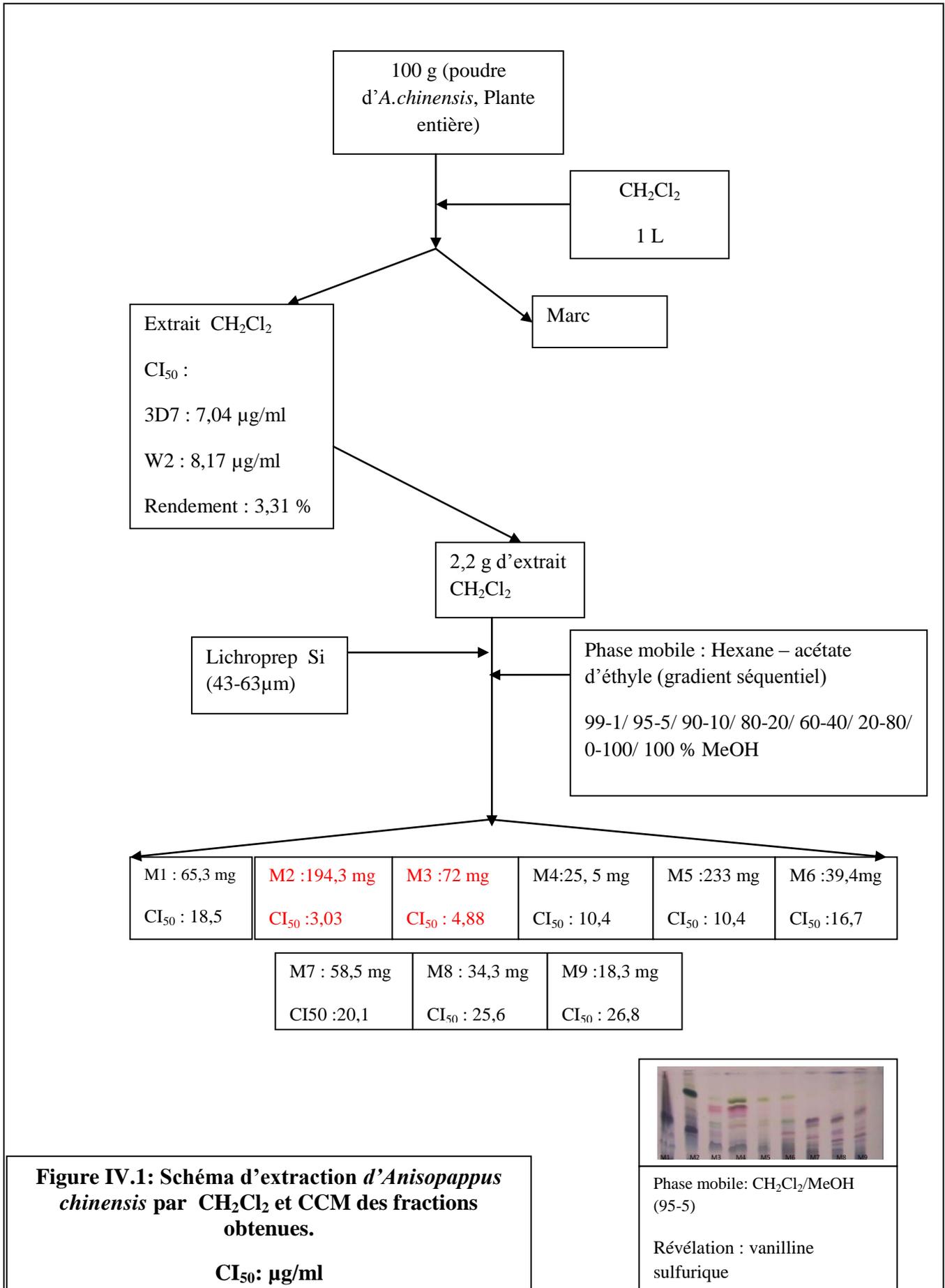
IV.2. Fractionnement bioguidé d'*Anisopappus chinensis* (plante entière) et *Physalis angulata* (feuilles).

Les étapes de purification ont été guidées par les résultats de l'activité antiplasmodiale, chaque fraction obtenue a été évaluée *in vitro* sur la souche chloroquino-sensible (3D7) du *Plasmodium falciparum*. Les extraits (des plantes) utilisés ont été obtenus par percolation selon le mode opératoire décrit dans chapitre V.

IV.2.1. Etude phytochimique d'*Anisopappus chinensis*

IV.2.1.1. Extraction et fractionnement bioguidé

Une première extraction a été réalisée selon le schéma détaillée (figure IV.1) suivi d'un fractionnement bioguidé sur colonne de silice. L'extraction a été réalisée à l'aide de dichlorométhane, car nos travaux préliminaires avaient mis en évidence la meilleure activité pour cet extrait.



Les fractions sont obtenues par regroupement de tubes ayant le même profil chromatographique. L'activité antiplasmodiale étant concentrée dans les fractions M2 et M3, dès lors, elles ont été sélectionnées pour poursuivre la purification bioguidée.

Le chromatogramme des 9 fractions obtenues du fractionnement bioguidé, observé aux U.V à 254 nm avant pulvérisation, n'a pas montré de bandes de fluorescence franche des fractions actives M2 et M3. Après pulvérisation de la vanilline sulfurique une séparation de bandes a été bien observée au visible. C'est ainsi que nous avons décidé de procéder par chromatographie sur couche mince préparative (phase mobile: CH₂Cl₂-MeOH) et CLHP-préparative afin d'isoler les composés majoritaires de ces deux fractions.

Malheureusement, les 2 essais réalisés sur la fraction M2 par chromatographie sur couche mince préparative ne nous ont pas permis d'obtenir une bonne séparation. La fraction M3 par contre a été soumise à une CLHP- préparative (Hostettman, 1997), la CCM de 9 fractions obtenues est présentée à la figure IV.2.

Conditions utilisées.

Colonne: Rp18 Lichrospher 100, 12µm

Phase mobile: MeOH/ H₂O (85-15)

Mode: isocratique, débit: 20 ml/ min

Echantillon: 72 mg

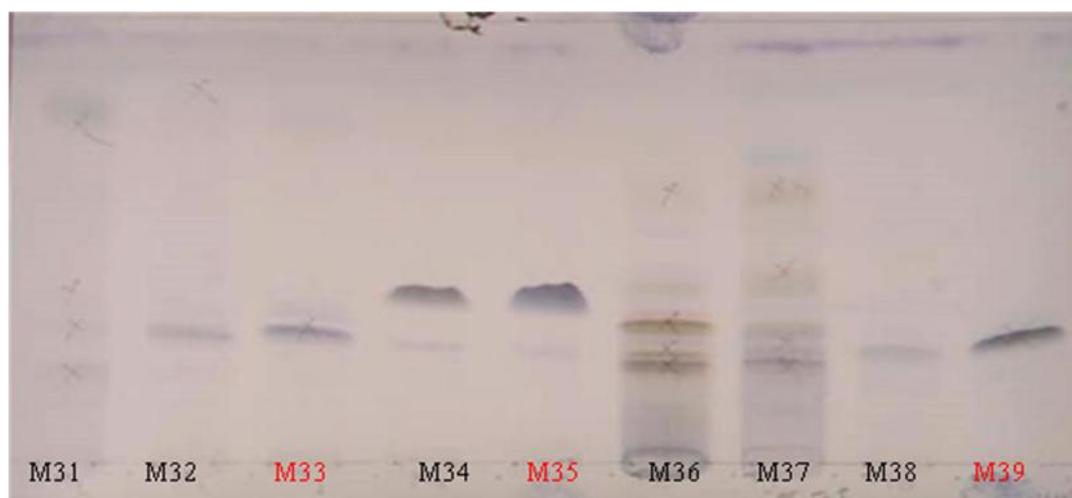


Figure IV.2: CCM des fractions de la CLHP-préparative de M3. Phase mobile: CH₂Cl₂ /MeOH (95-5). Révélation: Vanilline sulfurique.

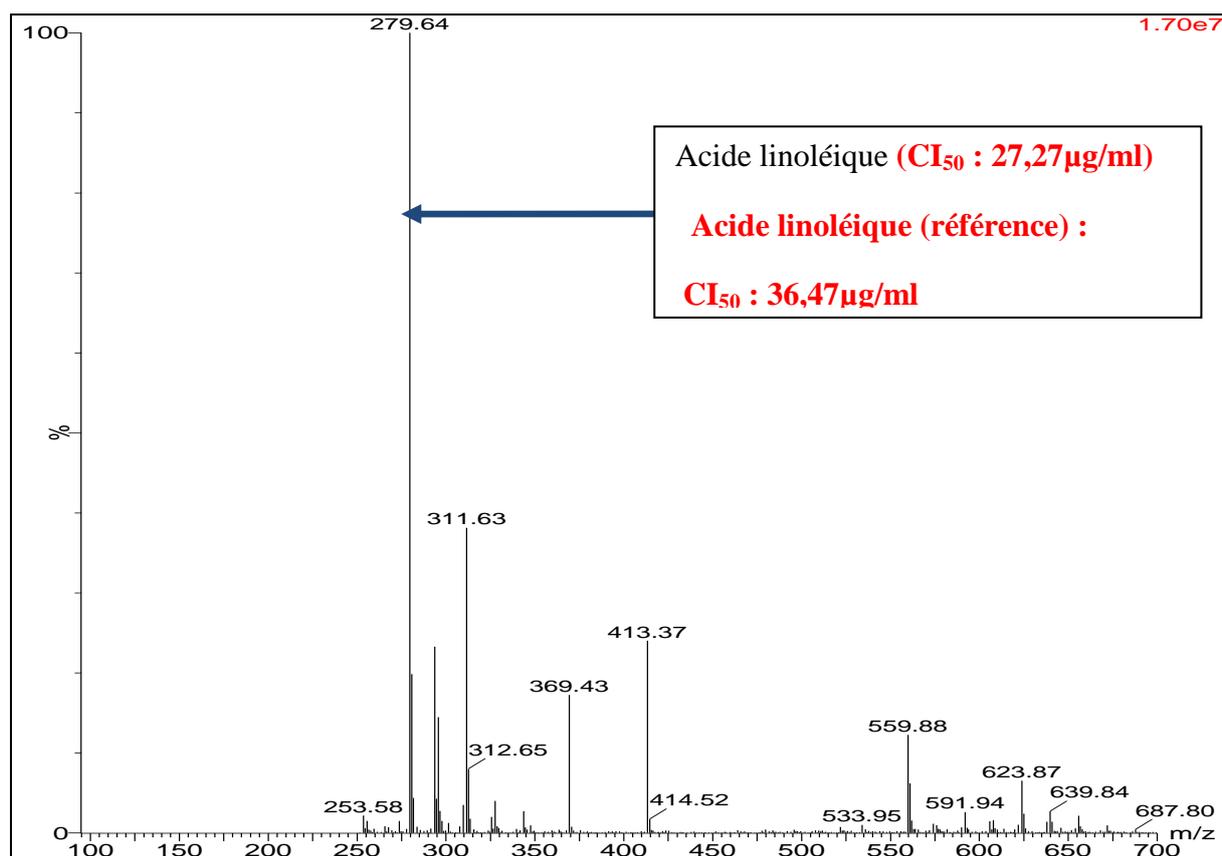


Figure IV.5: Spectre de masse (ESI, mode négatif) du composé M35. Masse unitaire: 280. Formule brute: $C_{18}H_{32}O_2$

Après analyses de toutes les données RMN et Masse, la structure déterminée est présentée par la figure IV.6

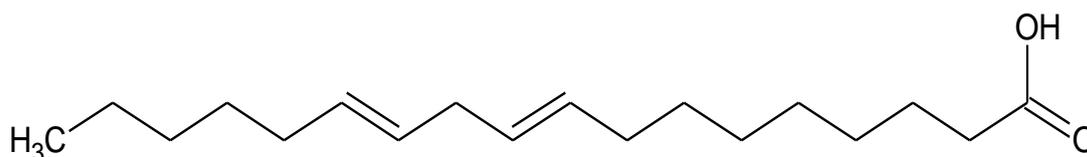


Figure IV.6: Structure de l'acide linoléique

Après avoir mis en évidence la présence de l'acide linoléique dans *Anisopappus chinensis*, nous avons recherché d'autres acides gras en particulier l'acide γ -linoléique dans l'extrait CH_2Cl_2 . Les travaux effectués par Tanaka en 2011 et Leaf, en 2007 ont montré que les acides gras polyinsaturés joueraient un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du cancer. A cette fin nous avons pris comme témoins l'huile de Colza, sachant qu'elle renferme une richesse en acide gras insaturé, l'huile de palme (acide

palmitique); et l'acide γ - linoléique; selon le mode opératoire décrit au chapitre V. Les résultats sont présentés par les figures IV.7 à IV.10.

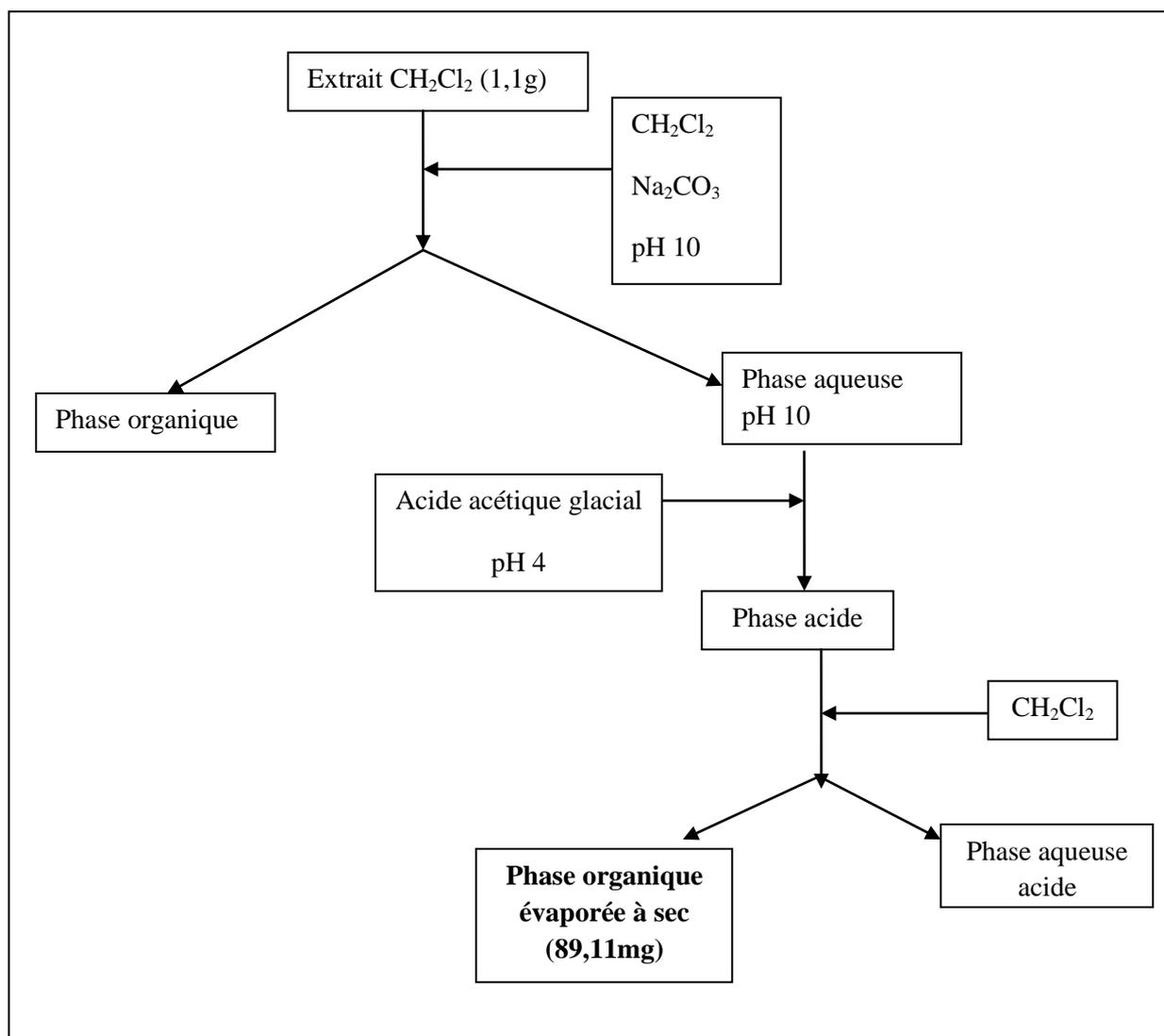


Figure IV.7: Schéma d'extraction des acides gras dans l'extrait CH_2Cl_2 d'*Anisopappus chinensis*.

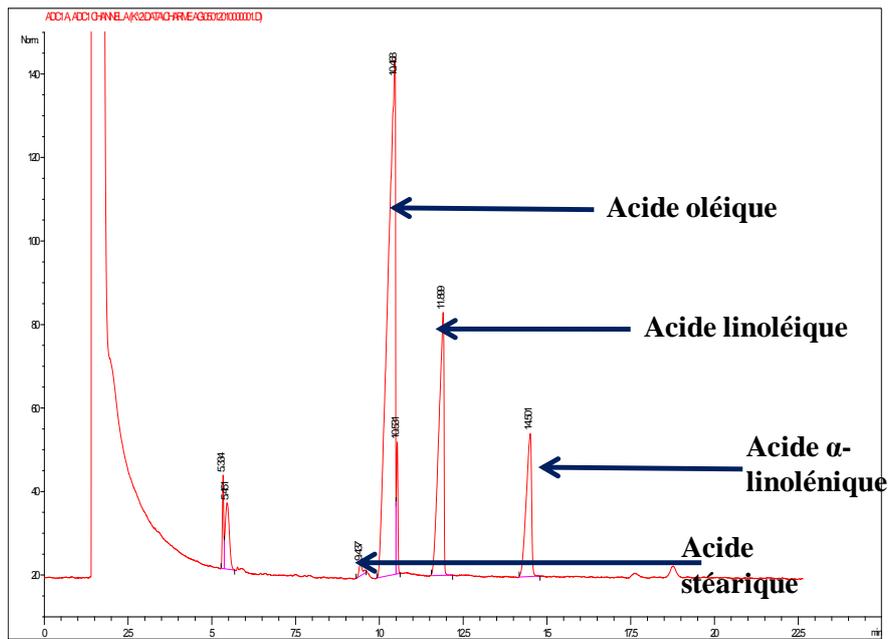


Figure IV.8: Chromatogramme en phase gazeuse des acides gras après méthylation de l'huile de Colza (référence)

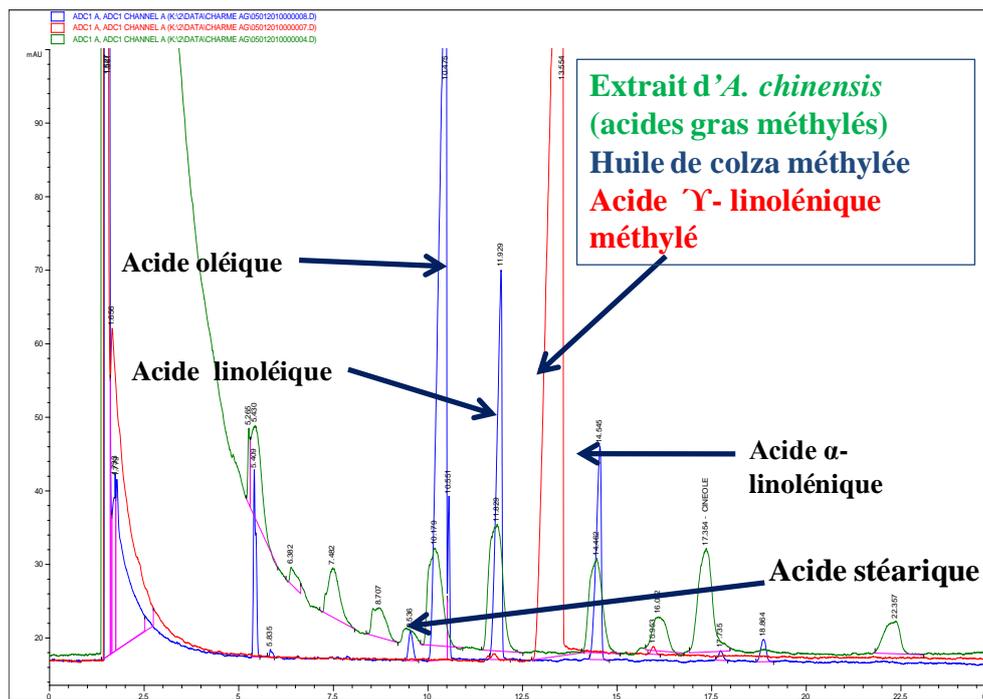


Figure IV.9: Chromatogramme en phase gazeuse, après méthylation, de l'huile de colza et de l'acide γ -linoléique (référence) comparés à l'extrait d'acides gras d'*Anisopappus chinensis*.

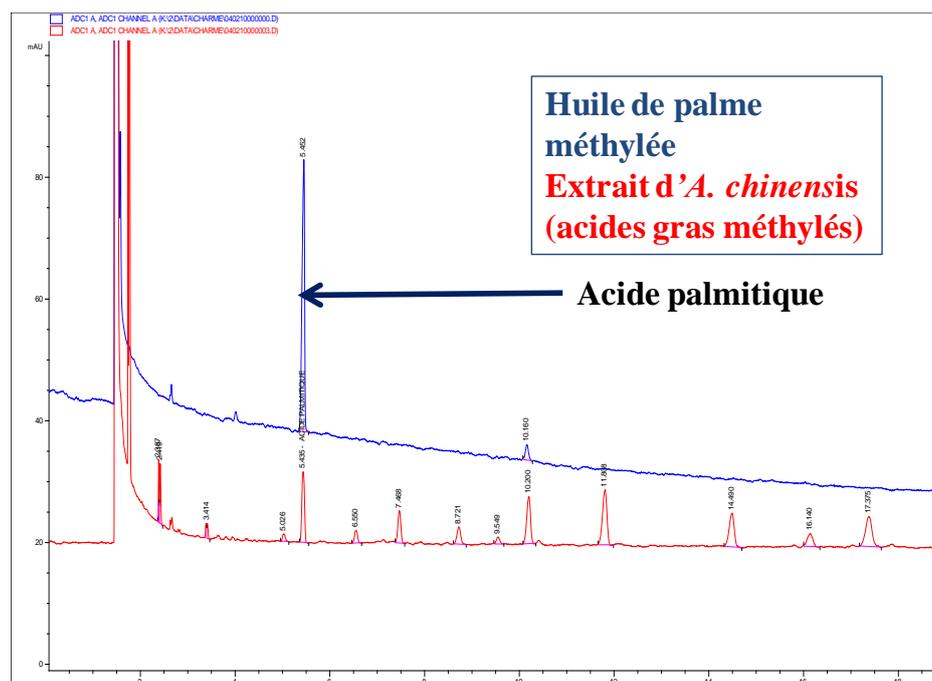


Figure IV.10: Chromatogramme en phase gazeuse, après méthylation, de l'huile de palme comparée à l'extrait d'acides gras d'*Anisopappus chinensis* (identification de l'acide palmitique).

Nous avons pu mettre en évidence la présence dans *Anisopappus chinensis* de plusieurs acides gras, à savoir l'acide palmitique (C16, T_R :5,4 min), l'acide stéarique (C18, T_R : 9,4 min), l'acide oléique (C18:1, ω_9 ; T_R : 10,4 min), l'acide linoléique (composé M35) (C18:2, ω_6 ; T_R :11,9 min) et l'acide α - linoléique (C18:3, ω_3 T_R ; 14,5min).

IV.2.1.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait CH_2Cl_2 d'*Anisopappus chinensis*

Le premier fractionnement bioguidé n'ayant uniquement mené qu'à l'identification de différents acides gras (acide linoléique isolé CI_{50} : 27,27 μ g/ml; référence d'acide linoléique: CI_{50} 36,47 μ g/ml) qui ne permettent pas d'expliquer l'activité *in vitro* de la plante. Vu l'activité intéressante de la fraction M2 sur la souche 3D7 du *Plasmodium falciparum* et vu qu'on n'a pas pu mettre la main sur la substance ou le composé responsable de l'activité antipaludique, nous avons décidé d'effectuer un deuxième fractionnement bioguidé dans les mêmes conditions que le premier, cette fois, en partant d'une quantité importante d'extrait dichlorométhane (tout en espérant retrouver la fraction M2). Ce dernier a été obtenu par une percolation de la poudre avec le dichlorométhane. Les résultats sont présentés aux figures IV.11, IV.12, V13. IV.14.

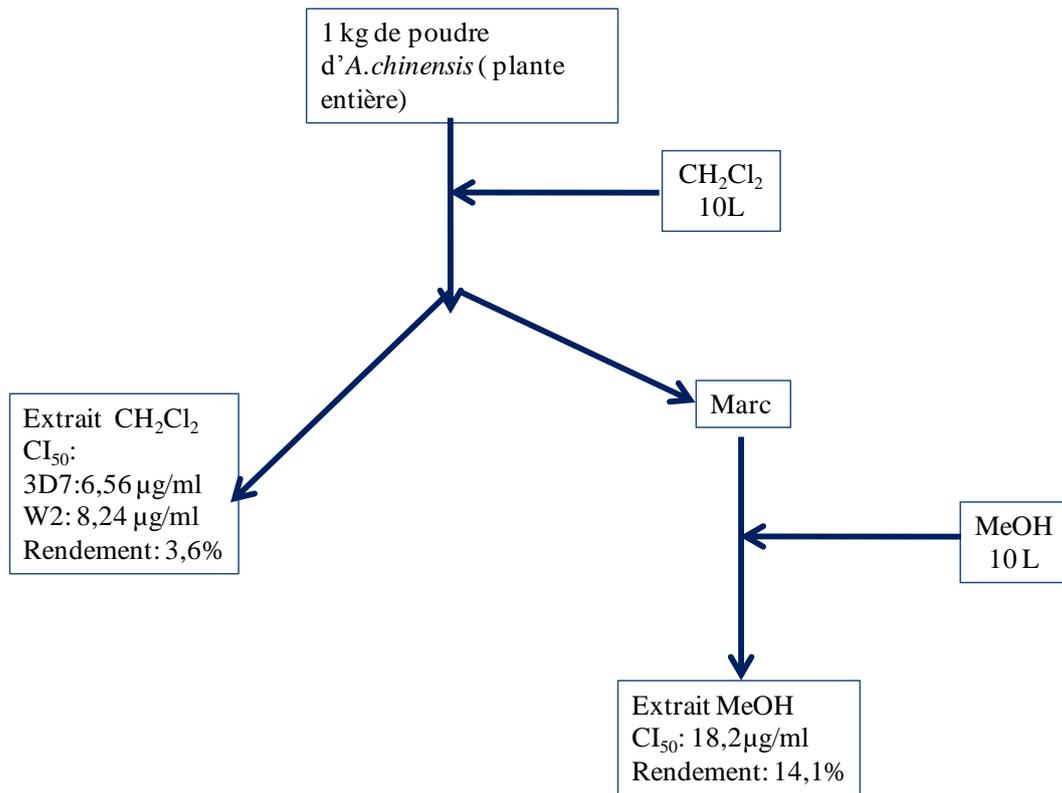


Figure IV.11: Schéma d'extraction séquentielle d'*Anisopappus chinensis* par le CH_2Cl_2 suivi par une extraction au MeOH

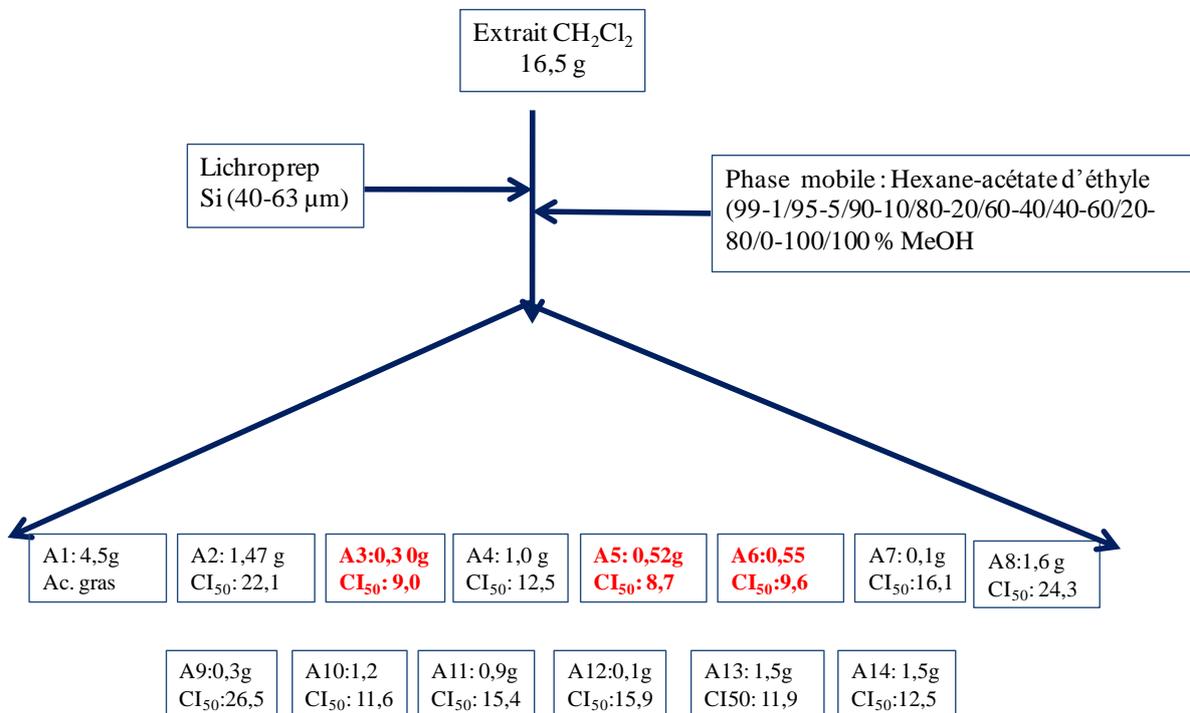


Figure IV.12: Fractionnement de l'extrait CH_2Cl_2 d'*Anisopappus chinensis* provenant de la deuxième extraction. CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$.

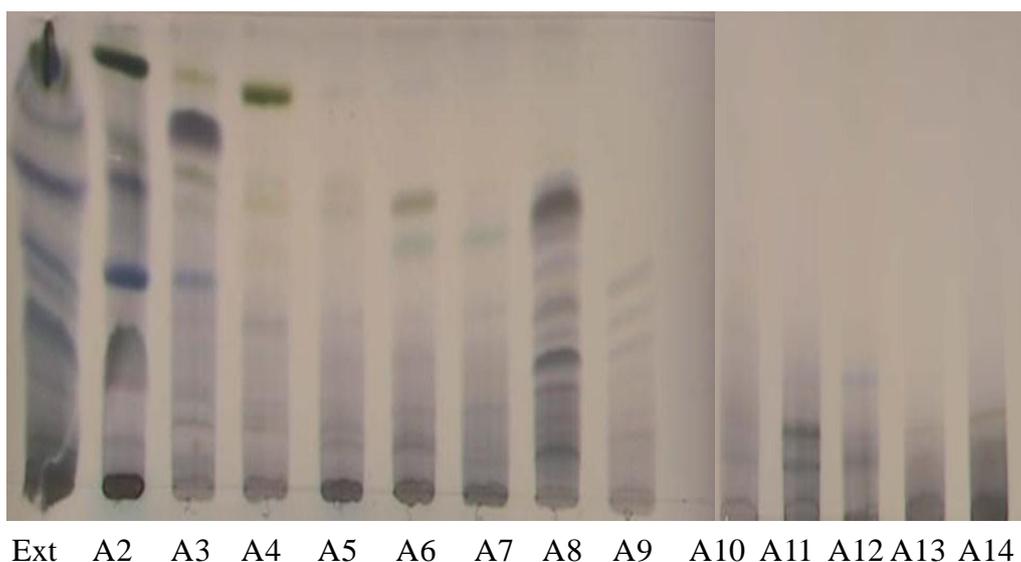


Figure IV.13: CCM du deuxième fractionnement de l'extrait CH_2Cl_2 d'*Anisopappus chinensis*. Phase mobile $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95-5). Révélation: Vanilline sulfurique

L'activité antiplasmodiale s'est concentrée dans les fractions A3, A5 et A6 ($\text{CI}_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) sans toutefois retrouver une activité aussi importante que celle repérée dans M2 lors du 1^{er} fractionnement. Les fractions A5 et A6 ont été mélangées pour poursuivre la purification bioguidée, cette fois par CLHP préparative.

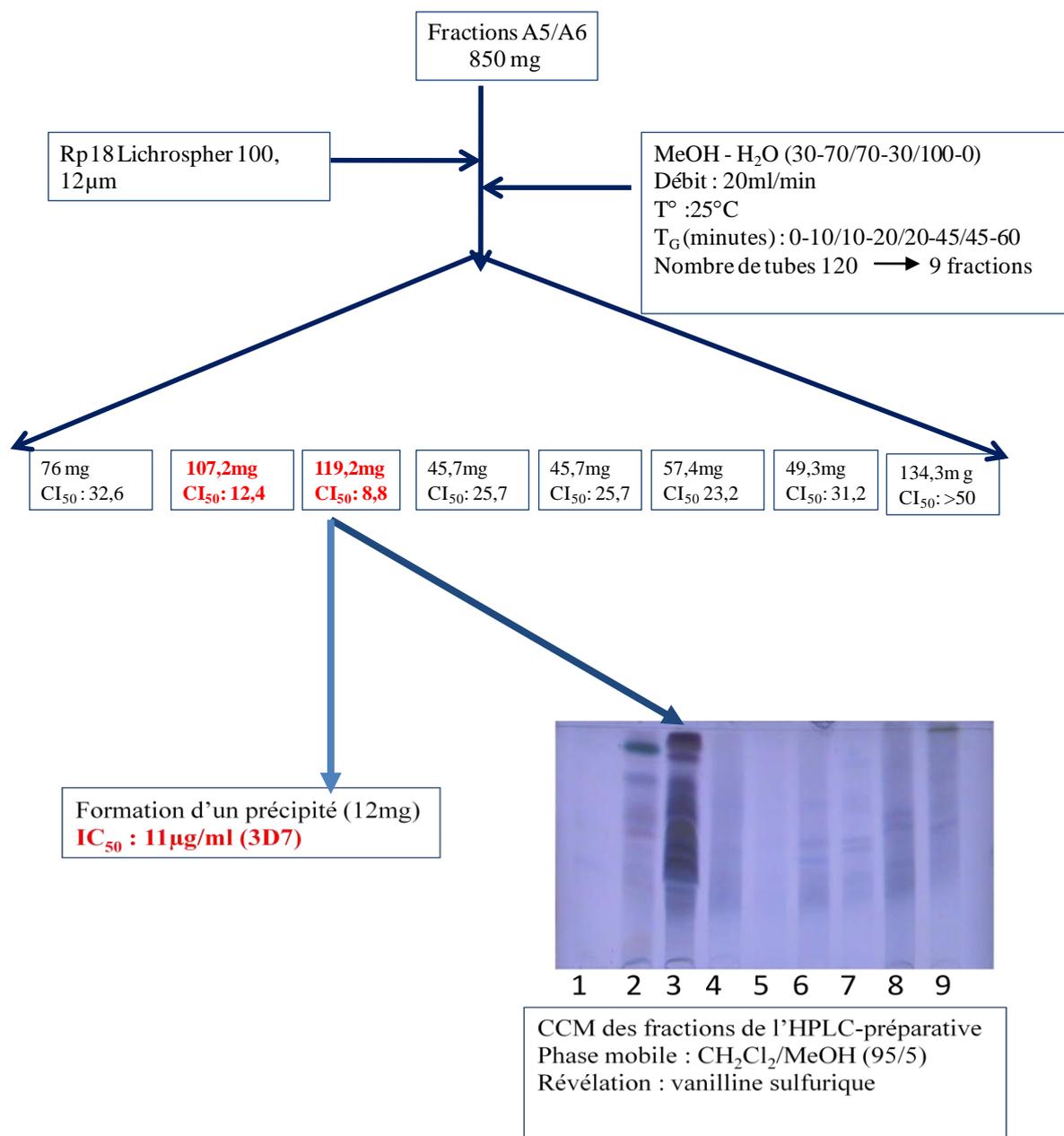


Figure IV.14 : Schéma de purification par CLHP de la fraction A5/A6 et CCM de 9 fractions obtenues.

La 3^e fraction obtenue (119 mg) suite à la CLHP était la plus active mais aussi la plus complexe en composition parmi les différentes fractions obtenues. Cependant, un précipité s'est formé à partir de cette fraction, précipité que nous avons recueilli et qui s'est avéré être beaucoup plus pur. Nous avons alors réalisé une analyse LC-MS, en mode positif (ES⁺), qui a montré la présence de deux substances (ML-A et ML-B) ayant des temps de rétention proche (figure IV.15). Le spectre de masse est présenté à la figure IV.16.

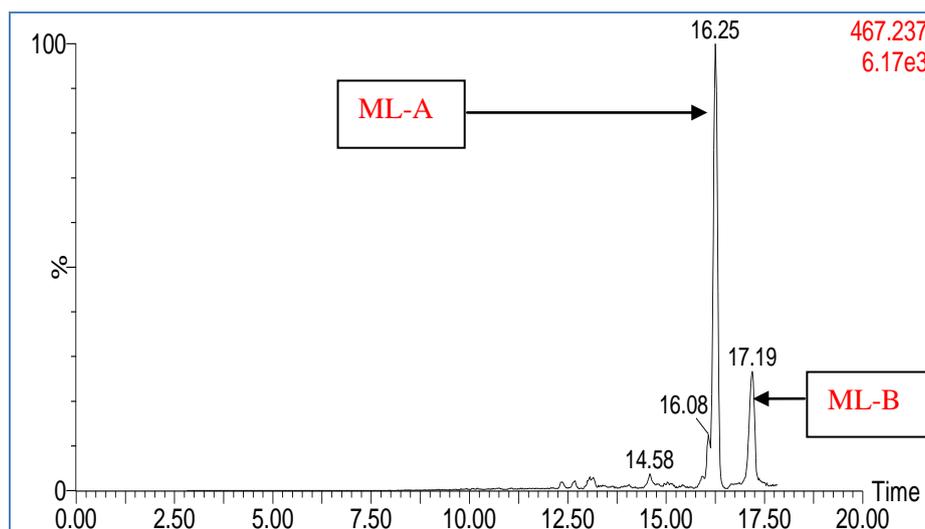


Figure IV.15: Chromatogramme LC-MS des deux composés (précipité) de la fraction A5/A6

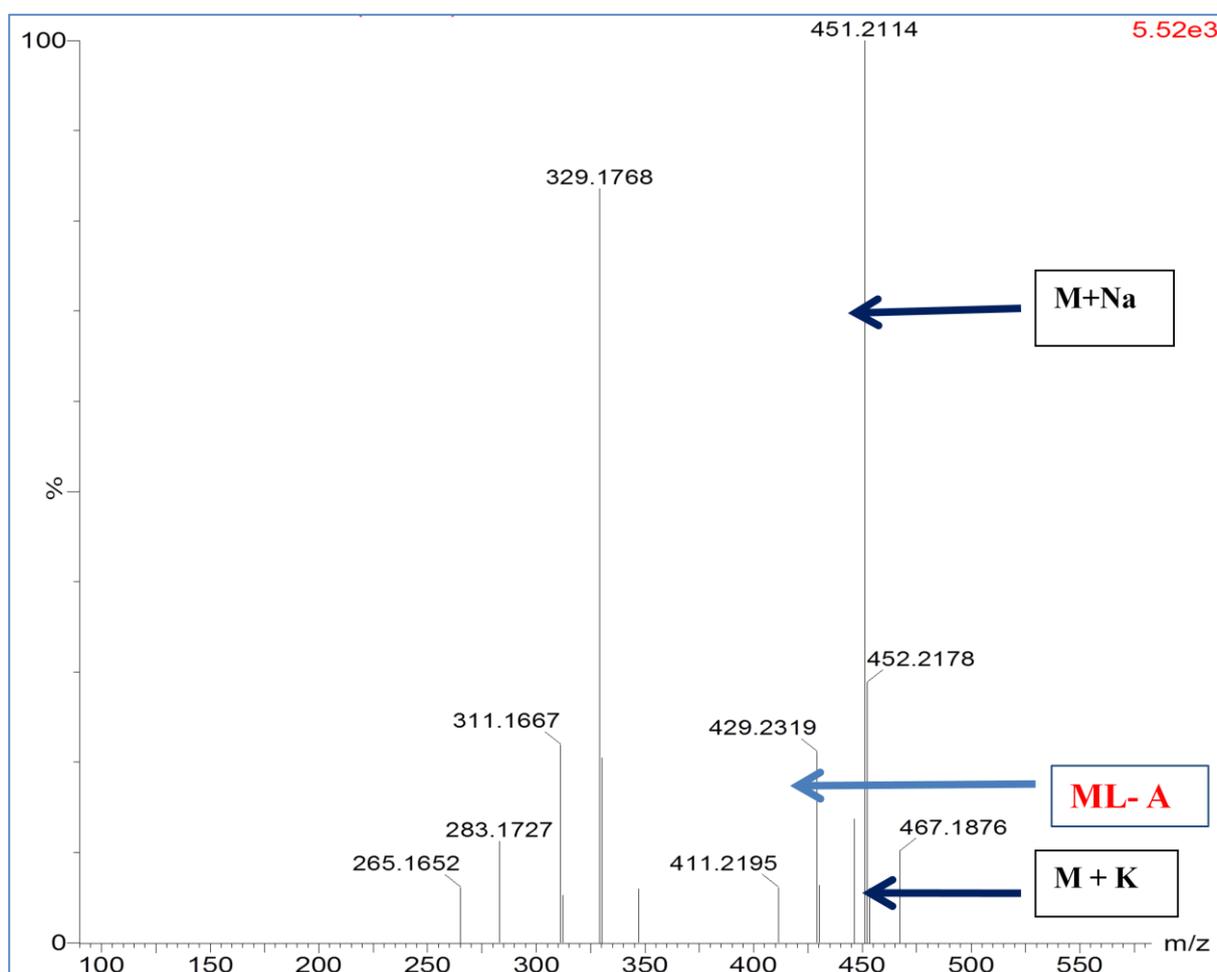


Figure IV.16: Spectre de masse du composé ML-A. Formule brute: $C_{25}H_{32}O_6$. Masse (MH⁺): 428.

Les données RMN Proton et Carbone sont présentées dans le tableau IV.2. Ces différents éléments nous ont permis de conclure à la présence d'un diterpène de type clérodane (6 β -(2-methylbut-2(Z)-enoyl)-3 α ,4 α ,15,16-bis-epoxy-8 β ,10 β H-ent-cleroda-13(16),14-dien-20,12-olide), ayant antérieurement été isolé de *Microglossa angolensis* (Tene et al., 2005; Tamokou et al., 2009). La structure du composé (figure IV.17) a dès lors été confirmée par comparaison aux données spectrales de la littérature.

Tableau IV.2: Déplacements chimiques (ppm) RMN-¹H, ¹³C et corrélations HBMC, COSY (dans CD₃CN) du composé ML-A.

N°	H	C	COSY	HMBC (H→C)
1	1.79	21.71	2a, 10, 1b	2, 3, 5, 10
	1.43		2a, 2b, 10, 1a	2, 5, 10, 18
2	2.15	25.06	1a, ab, 2b	1
	1.82		1a, ab, 2a	1
3	2.97	60.93	2a, 2b	1, 2, 4, 6
4		61.70		
5		40.51		
6	5.77	71.31	7a, 7b	4, 5, 8, 10, 19, 1'
7	2.29	32.95	7b, 6	5, 6, 8, 11, 17, 20
	1.61		7a, 8	5, 6, 8, 9, 17
8	2.16	31.69	7b, 17	6, 9, 11, 17, 20
9		52.01		
10	1.61	50.54	1a	5, 9, 11, 19
11	2.46	46.27	12	5, 8, 10, 12, 13, 20
12	5.37	70.88	11	11, 13, 14, 16
13		124.59		
14	6.39	108.01	15	12, 13, 15, 16
15	7.44	139.62	14	13, 16
16	7.46	144.03		12, 14, 15
17	1.04	17.18	8	7, 9
18	1.32	22.55		4, 5, 19
19	1.39	23.91		4, 5, 6, 10
20		176.57		
1'		167.03		
2'		128.07		
3'	6.06	137.60	4', 5'	1', 4', 5'
4'	2.01	15.53	3'	6, 1', 2', 3'
5'	1.93	20.52	3'	5, 19, 1', 2', 3'

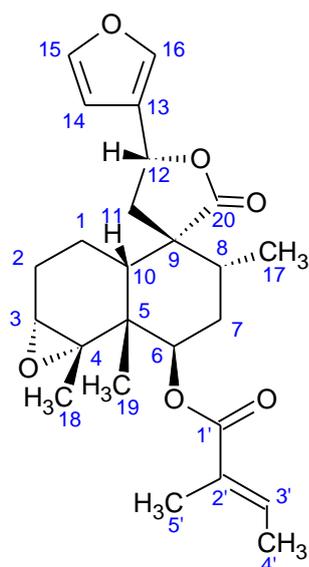
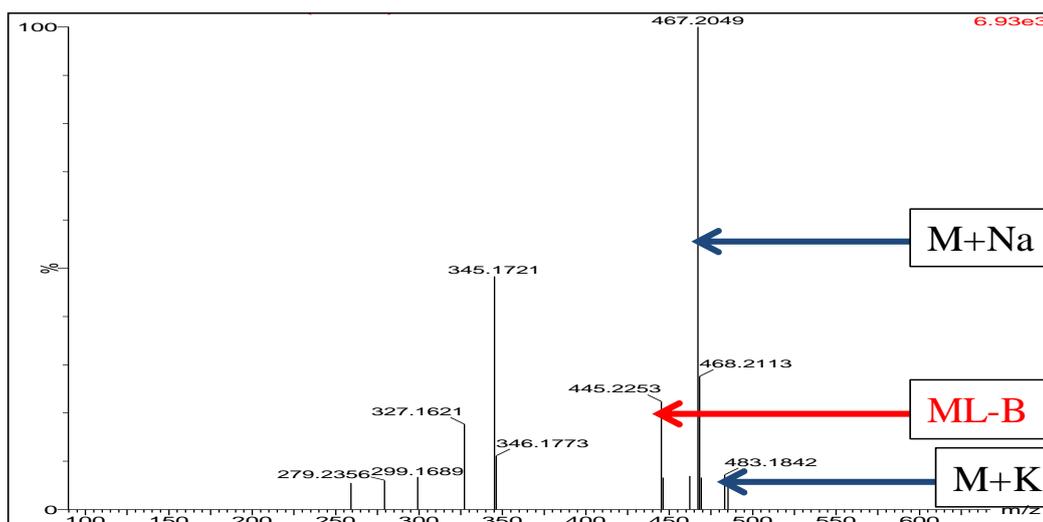


Figure IV.17: Structure du composé ML-A

 $CI_{50}: 18,6 \pm 0,66 \mu M$

Le second composé, ML-B, identifié par LC-MS, possède une masse (MH^+) de 445, ce qui correspond donc à un oxygène supplémentaire (figure IV.18). Il s'agit donc clairement d'un composé de même type que ML-A. Cependant, comme il n'a pas pu être isolé en quantité suffisante à l'état pur, nous n'avons pas pu réaliser de spectres RMN et sa structure n'a pas pu être déterminée.

La détermination de celle-ci nécessitera l'isolement du composé en quantité suffisante. Après une séparation par CCM-préparative, nous avons pu néanmoins réaliser un test d'activité antipaludique sur la souche 3D7, le composé ML-B y a présenté une CI_{50} de 20,2 μM .

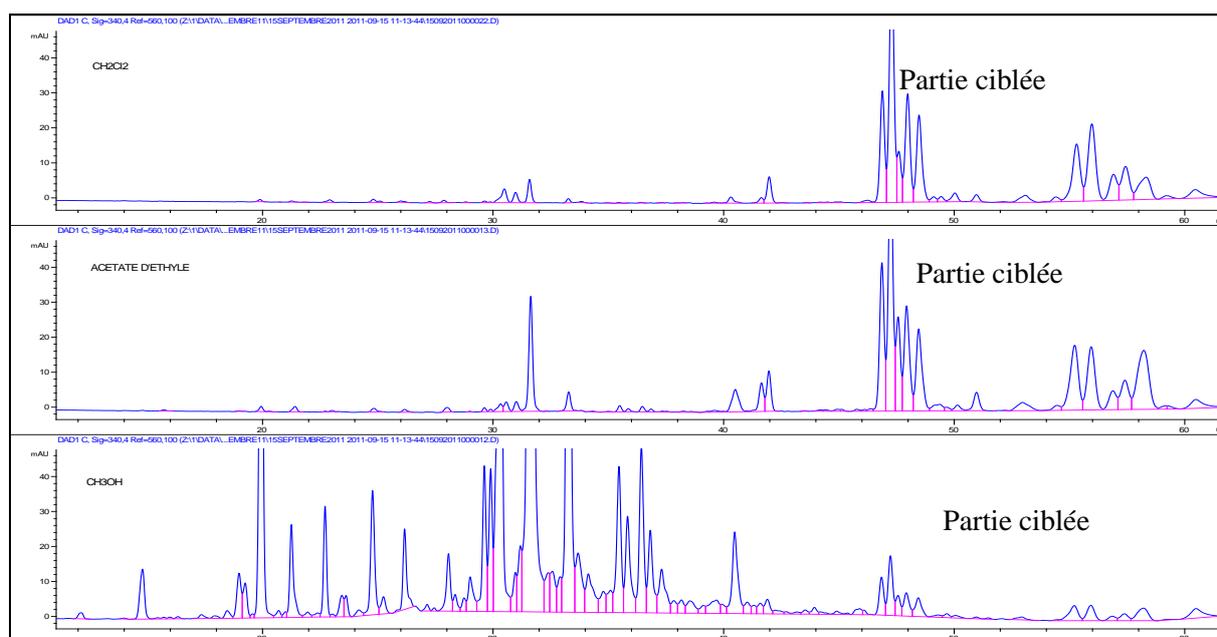
Figure IV.18: Spectre de masse du composé ML-B. Masse (MH^+): 444.Formule: $C_{25}H_{32}O_7$.

IV.2.2.3. Isolement et détermination de structures de flavonoïdes

Le fractionnement bioguidé décrit précédemment a finalement mené à l'identification d'un composé diterpénique d'activité modérée. Cependant, l'examen par CCM des extraits bruts actifs (CH_2Cl_2 , MeOH, EtOAc) indique la présence de plusieurs flavonoïdes. Nous avons donc décidé d'analyser ceux-ci (Tableau IV.3 et figure IV.19). Nous nous sommes focalisés sur les génines, présentes en grandes quantités dans les extraits apolaires, qui sont les plus actifs.

Tableau IV.3 : Conditions CLHP utilisées pour la séparation des flavonoïdes.

Quantité injectée : 10 mg /ml		
Colonne : Hypersyl ODS (250 mm X 4,6 mm)		
Phase mobile : TFA 0,05% /MeOH		
Débit : 1ml/min		
T°: 25°C		
Longueur d'onde : 340 nm		
Gradient:		
T _G (minute)	TFA (%)	MeOH (%)
0	55	45
1	55	45
30	35	65
36	0	100
55	55	45

**Figure IV.19: Chromatogrammes comparés des trois extraits d'*Anisopappus chinensis* par CLHP- analytique.**

L'analyse CLHP montrant une similarité des extraits CH₂Cl₂ et EtOAc, nous avons donc choisi d'entreprendre une identification des flavonoïdes dans l'extrait CH₂Cl₂, qui est celui qui avait été étudié auparavant. Différentes conditions ont été testées.

- 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05% / MeOH: 7/3
- 10mg/ml d'extrait dans du MeOH

- ✓ **Conditions 1:** Phase mobile TFA 0,05 % /MeCN
 Colonne: Pursuit diphényle (250 mm X 4,6mm, 5µm)
 T°: 25°C
 Débit : 1ml/min
 Injection: 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05% /MeCN: 7/3
 Détection: 340 nm

Tableau IV.4: Gradient utilisé

T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeCN
0	100	0
1	97	3
45	60	40
55	60	40
56	100	0

- ✓ **Conditions 2:** Phase mobile TFA 0,05 % /MeOH
 Colonne: Pursuit diphenyl (250 mm X 4,6 mm)
 Débit: 1ml/min
 T°: 25°C
 Injection: 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05 % /MeOH: 7/3
 Détection: 340 nm

Tableau IV.5: Gradient utilisé

T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
1	97	3
45	60	40
55	60	40
56	100	0

- ✓ **Conditions 3:** Phase mobile: TFA 0,05 % /MeCN
 Colonne: Pentafluorophenyl luna 5µ (250 mm X 4,6 mm)
 T°: 25°C
 Débit: 1ml/min
 Injection: 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05% /MeCN: 7/3
 Détection: 340 nm

Tableau IV.6: Gradient utilisé

T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeCN
0	100	0
1	97	3
45	60	40
55	60	40
56	100	0

✓ **Conditions 4:** Phase mobile: TFA 0,05 % / MeOH

Phase stationnaire : Pentafluorophenyl luna 5 μ (250 mm X 4,6 mm)

T°: 25°C

Débit : 1ml/min

Injection: 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05 % / MeOH: 7/3

Détection: 340 nm

Tableau IV.7: Gradient utilisé

T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
1	97	3
45	60	40
55	60	40
56	100	0

✓ **Conditions 5 :** Phase mobile: TFA 0,05 % / MeOH

Phase stationnaire: Pentafluorophényl luna 5 μ (250 mm x 4,6 mm)

Débit: 1ml/min

T°: 25°C

Injection: 10 mg/ml d'extrait dans le mélange TFA 0,05 % / MeOH: 7/3

Détection: 340 nm

Tableau IV.8: Gradient utilisé

T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
1	97	3
45	20	80
80	20	80
81	100	0

De toutes les conditions testées, seule la 5^e a présenté un bon profil chromatographique avec une bonne séparation des flavonoïdes ciblés et a été retenue pour la CLHP- préparative. Celle-ci a donc été réalisée selon les conditions décrites dans le tableau IV.9, les résultats sont présentés aux figures IV.20 et IV.21.

Tableau IV.9: Conditions de la CLHP-préparative

Prise d'essai: 850 mg d'extrait dans TFA/MeOH (7/3)		
Phase mobile: TFA 0,05% / MeOH		
Phase stationnaire: Pentafluorophenyl luna (5 μ , 250 mm x 21,20 mm)		
Débit: 15ml/min		
Détecteur: UV (210-340 nm)		
T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
45	20	80
80	20	80
100	0	100

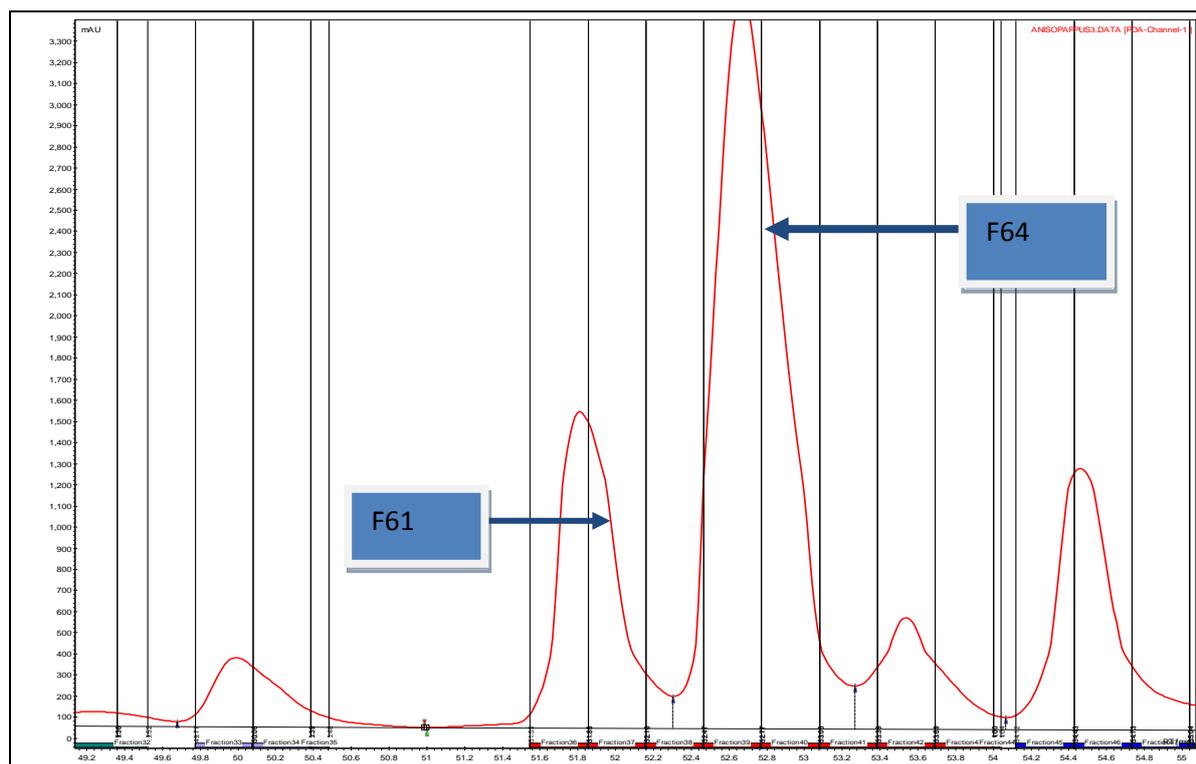


Figure IV.20: Chromatogramme de CLHP-préparative de l'extrait au CH₂Cl₂ d'*Anisopappus chinensis* séparé selon la méthode décrite dans le tableau IV.9.

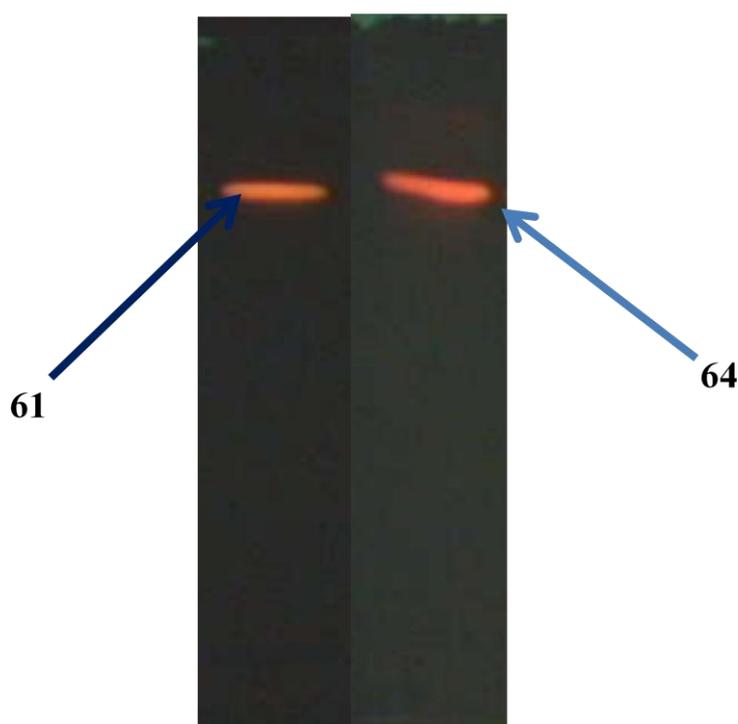


Figure IV.21: CCM des fractions majoritaires (F61, F64). Phase mobile (Dichlorométhane /Acetone/Acide formique (85-25-8,5)). Révélation: DPBAO

Les fractions majoritaires (F61 et F64) ont été récoltées et analysées par CLHP-analytique. (Tableau IV.10, figures IV.22 et IV.23; figures IV.28 et IV.29). Les deux flavonoïdes, F61 et F64, bien qu'apparaissant purs en CLHP à 350 nm (figures V.22 et V.28), étaient en mélange avec d'autres composés n'absorbant pas à 350 nm, plus que probablement des dérivés terpéniques, qui ont été mis en évidence au début de ce travail. Les deux fractions F61 et F64 (obtenues en très faibles quantités) ont donc été soumises à une analyse par LC-SPE/NMR/MS afin de pouvoir déterminer les structures des deux flavonoïdes.

Tableau IV.10: Conditions CLHP pour l'analyse des fractions F61 et F64

Colonne: Pentafluorophenyl luna 5 μ m (250 mm X 4,6 mm)		
Débit: 1ml/min		
T° = 25°C		
Détection: 350 nm		
Gradient:		
T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
45	20	80
80	20	80
100	100	0

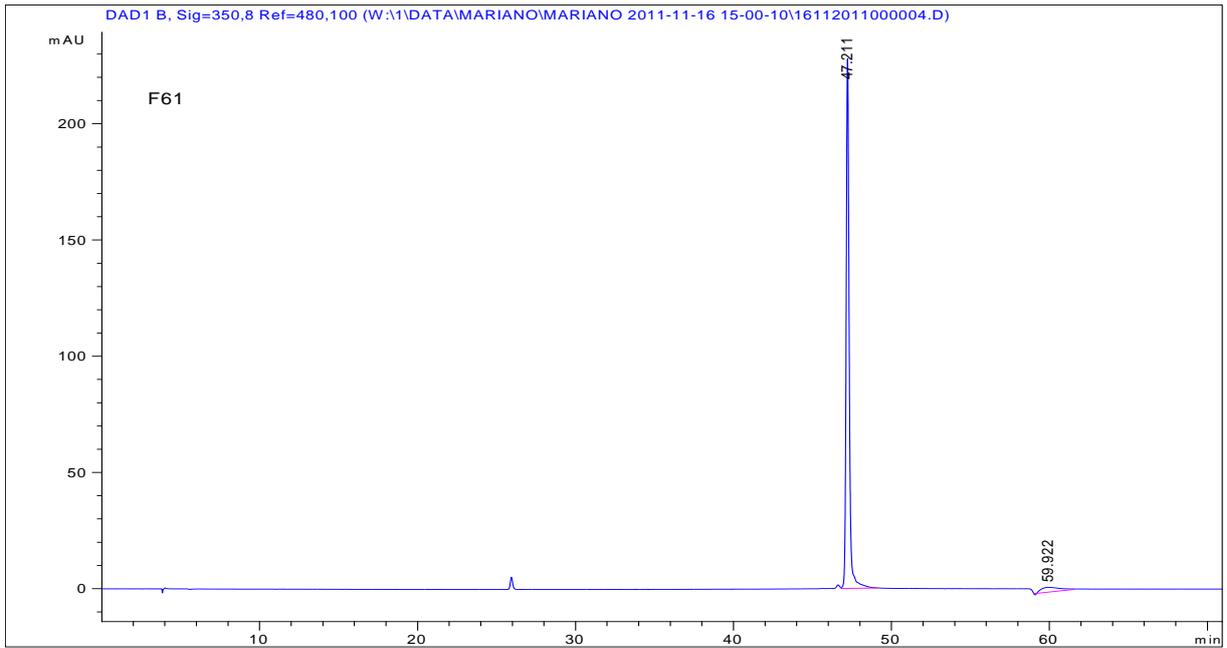


Figure IV.22: Chromatogramme (CLHP-analytique) de la fraction F61 dans le MeOH ($T_R = 47.2$ min).

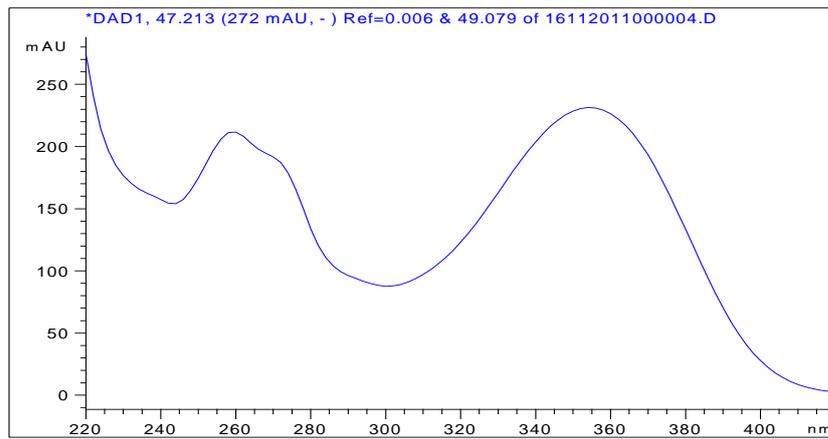


Figure IV.23: Spectre UV du pic principal de la fraction F61 à 350 nm

Purification de F61 par LC-SPE-NMR-MS:

L'analyse LC-SPE-NMR-MS a été réalisée en utilisant les conditions CLHP suivantes:

Tableau IV.11: Conditions CLHP pour l'analyse LC-SPE-NMR-MS de la fraction F61

Colonne: Pentafluorophenyl luna 5µm (250 mm X 4,6 mm)		
Débit: 1ml/min		
T° = 25°C		
Détection: 350 nm		
Gradient:		
T _G (minutes)	TFA (%) 0,05%	MeOH (%)
0	100	0
1	97	3
45	20	80
55	20	80
56	100	0

Le trapping des pics a été réalisé sur des cartouches SPE de type HySphere Resin GP (polydivinyl benzène, 5-15 µM, sphériques), à l'aide d'une unité Bruker/Spark prospekt 2 SPE unit. Trois trappings successifs (sur la même cartouche) ont été réalisés et le composé trappé a été élué dans un tube RMN à l'aide de 100 µl d'acétonitrile deutérié.

Le spectre de masse a été obtenu en mode négatif (ES⁻) et est présenté à la figure IV.24, les spectres RMN-¹H et HSQC sont présentés aux figures IV.25 et IV.26; et au tableau IV.12. L'analyse des différents spectres nous a donc permis d'identifier le composé F61 comme étant une flavone, le **chrysosplénol B** (3',4',5-trihydroxy-3,6,7-triméthoxyflavone), préalablement isolé d'*Artemisia annua*, puis ensuite de différentes autres plantes telles que *Ehretia amoena*, *Vitex trifolia*, *Plectranthus cylindraceus*, *Psiadia trinervia* et également obtenu par synthèse (Kraus and Roy, 2008; Braz, 1971; Stermitz et al., 2002). La structure du composé (figure IV.27) a dès lors été confirmée par comparaison des données spectrales avec la littérature (Kraus and Roy, 2008; Braz, 1971). La CI₅₀ du chrysosplénol B à l'encontre de *P. falciparum* n'est que de 30,5 µM, néanmoins, comme ce composé a été décrit comme capable de potentialiser la norfloxacine à l'encontre de *Staphylococcus aureus*, on pourrait imaginer qu'il joue également un rôle potentialisateur d'autres composés d'*Anisopappus chinensis* à l'encontre de *P. falciparum* (Stermitz et al, 2002).

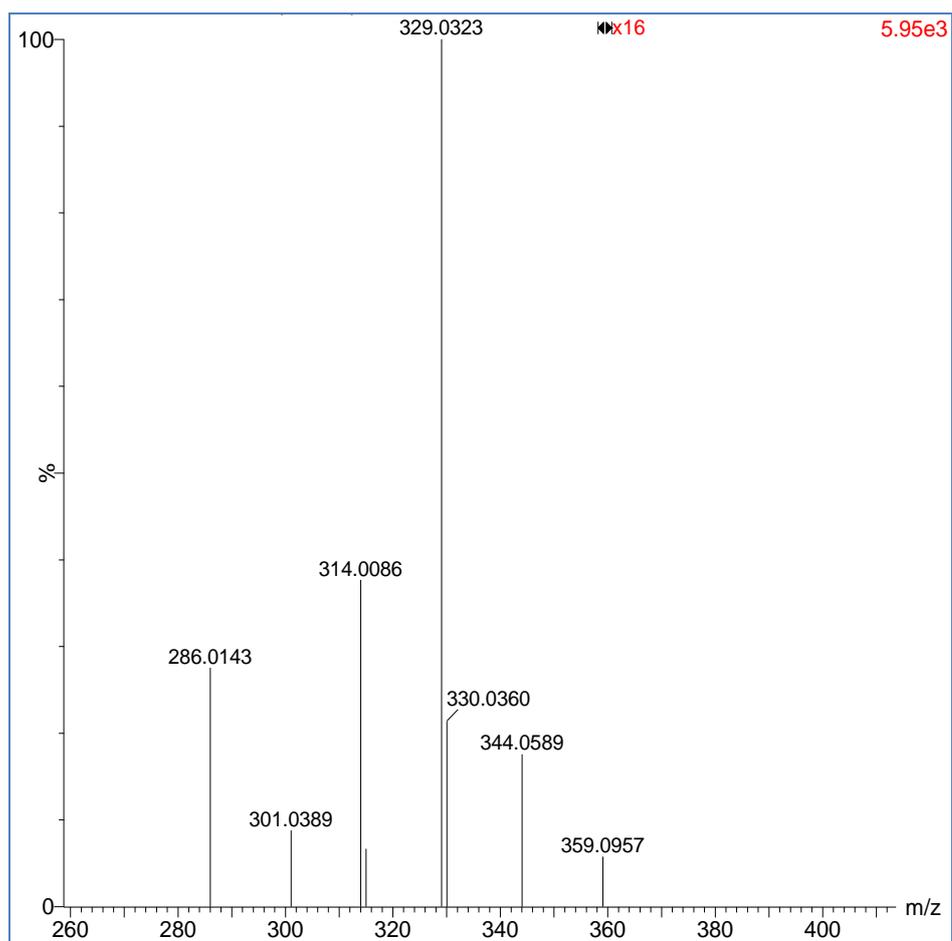


Figure IV.24: Spectre de masse (ES-) et ions filles de F61 (Chrysoplénol B) (après trapping). Formule brute: $C_{18}H_{16}O_8$. Masse (M): 360.

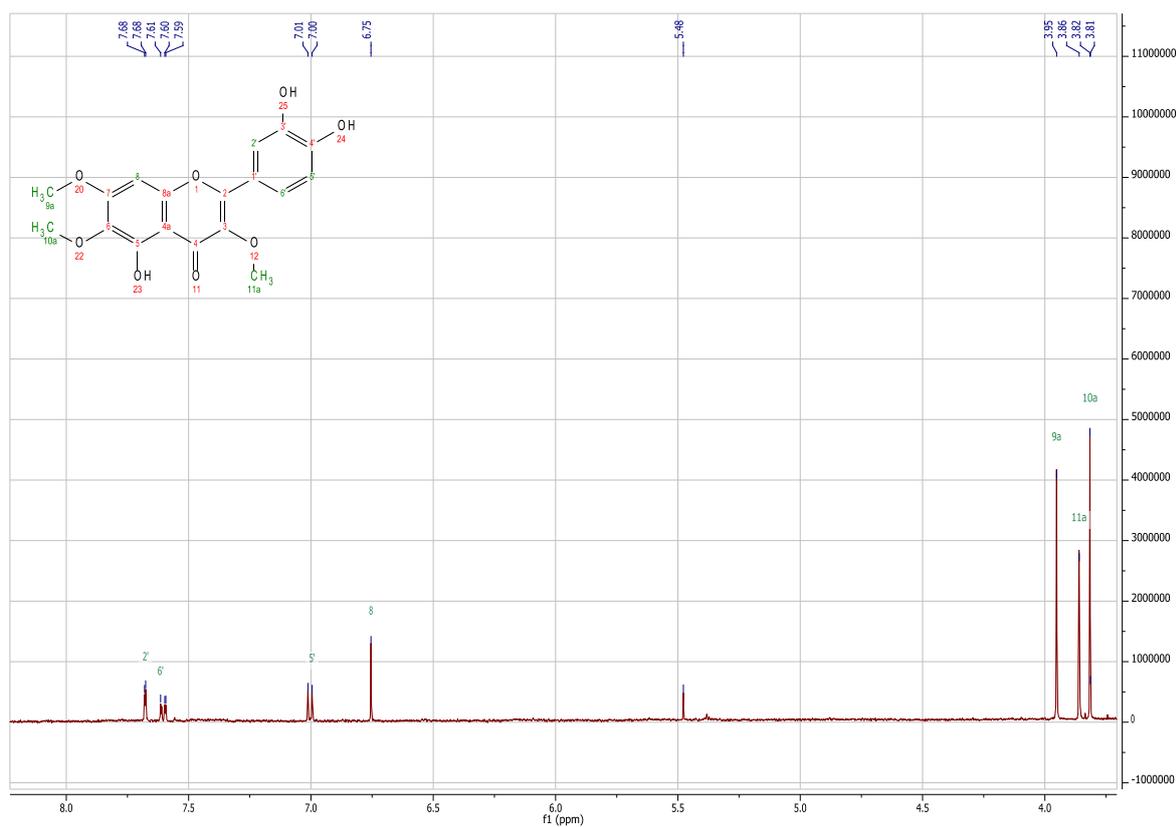


Figure IV.25: Spectre RMN-¹H du Chrysoptanol B dans le CD₃CN.

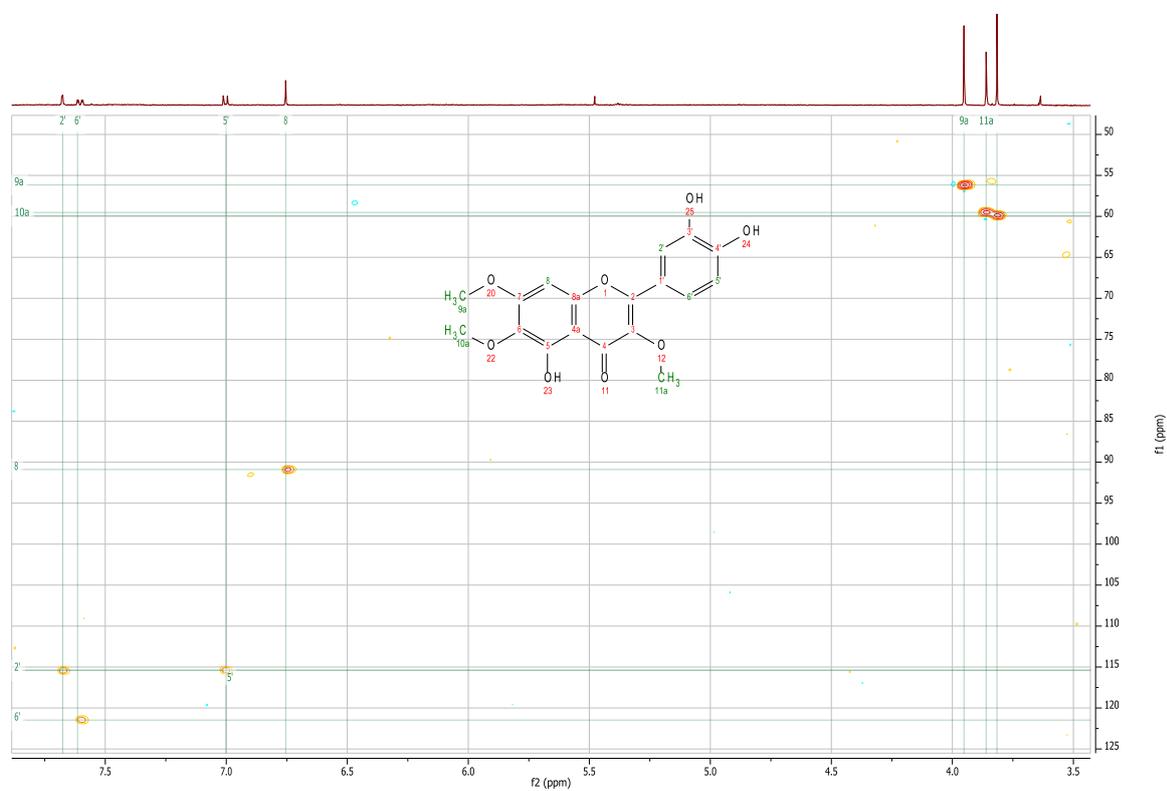


Figure IV.26: Spectre HSQC du Chrysoptanol B dans le CD₃CN.

Tableau IV.12: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du chrysosplénol B (nd = non déterminé) dans le CD_3CN .

N°	^1H	^{13}C
2	-	155.9
3	-	138.8
4	-	Nd
4a	-	105.9
5	-	Nd
6	-	132.2
7	-	159.4
8	6.75	90.9
8a	-	152.5
9a	3.95	56.2
10a	3.82	59.9
11a	3.86	59.5
1'	-	122.8
2'	7.68	115.4
3'	-	144.1
4'	-	148.1
5'	7.00	115.4
6'	7.61	121.5

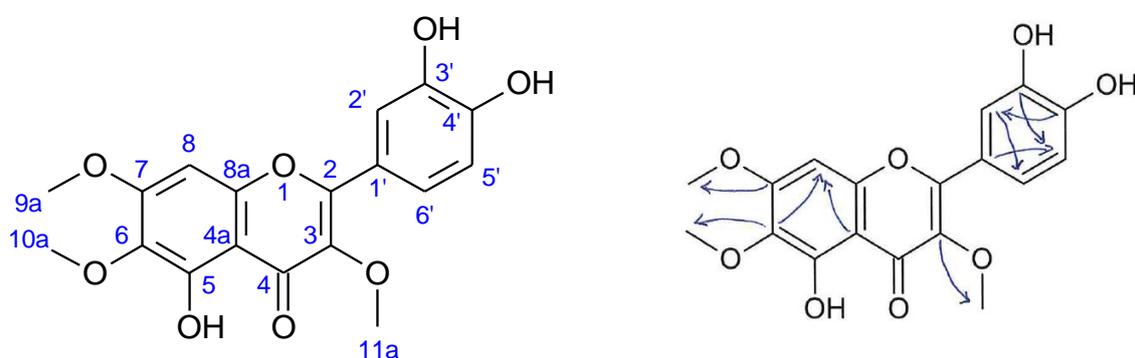


Figure IV.27: Structure de la Fraction F61 (Chrysosplénol B) et corrélations HMBC clés.

CI_{50} : 30,5 μM

Purification de F64 par LC-SPE-NMR-MS :

L'analyse LC-SPE-NMR-MS de F64 a été réalisée en utilisant exactement les mêmes conditions CLHP que pour F61.

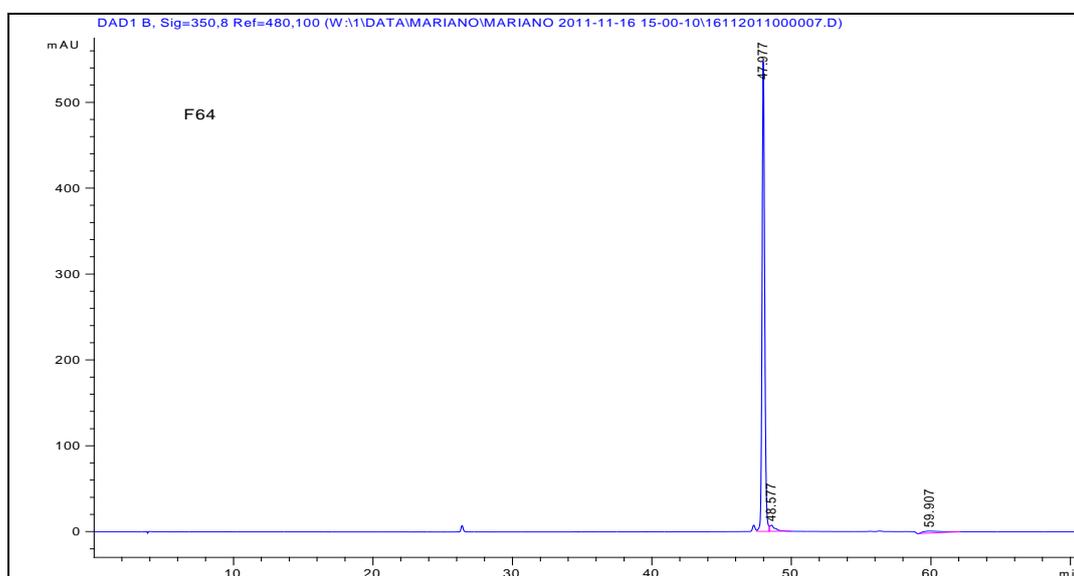


Figure IV.28: Chromatogramme de CLHP-analytique de F64 (dans le MeOH). (T_R: 47,9 min).

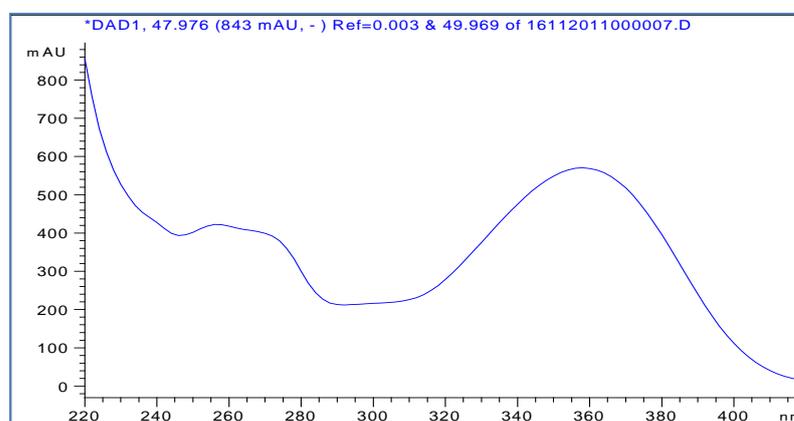


Figure IV.29: Spectre UV à 350 nm du pic principal de la F64.

Les spectres de masse ont été obtenus en mode négatif (ES-) et sont présentés aux figures IV.30 et 31, les spectres RMN-¹H et HMBC sont présentés aux figures IV.32 et IV.33. L'analyse des différents spectres nous a permis d'identifier le composé F64 comme étant également un flavonoïde, possédant vraisemblablement un méthoxy supplémentaire par rapport au Chrysosplénol B. Malheureusement, le spectre HMBC que nous avons pu mesurer ne nous a pas permis d'obtenir suffisamment de corrélations pour déterminer avec certitude la

structure exacte de ce composé. Il apparaît néanmoins clairement grâce aux corrélations HMBC que ce méthoxy supplémentaire se situe sur le cycle externe du flavonoïde. La structure possible de F64 est donc présentée à la figure IV.34 mais devra être confirmée après isolement de quantités supplémentaires du composé. Ce flavonoïde rare a été antérieurement isolé de quelques espèces de *Gardenia* (Gunatikala et al., 1982).

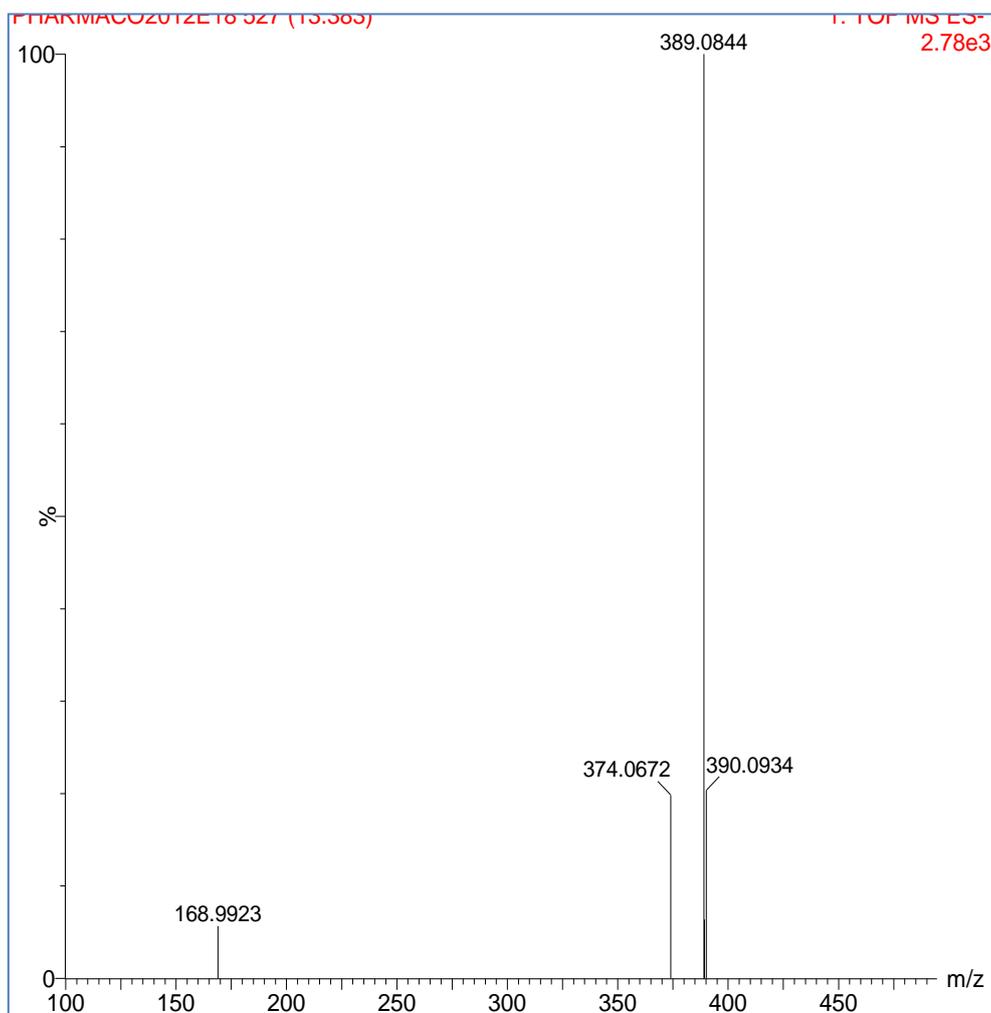
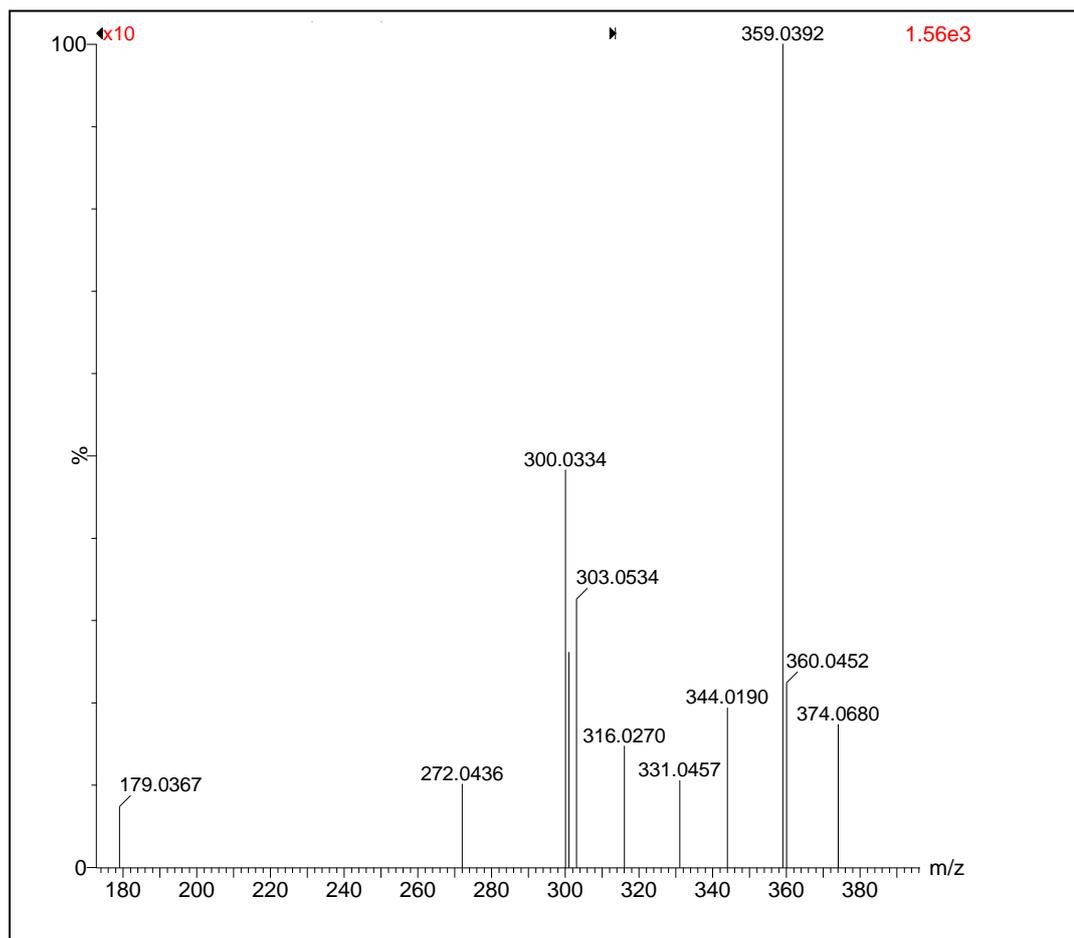


Figure IV.30: Spectre de masse (ES-) et ions filles du composé F64 (après trapping).



**Figure IV.31: Spectre de masse (ES-) et ions filles de l'ion majoritaire (après trapping).
Formule brute: $C_{19}H_{18}O_9$, Masse (M): 390**

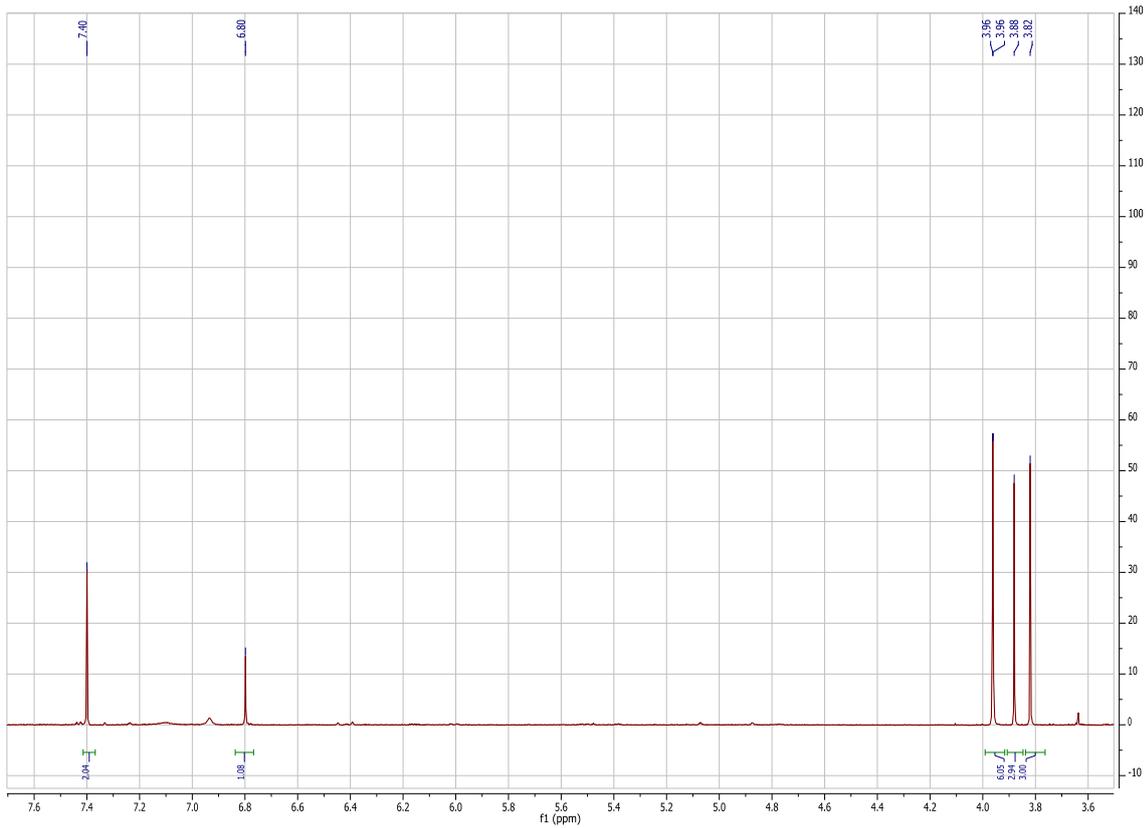


Figure IV.32: Spectre RMN-¹H de F64 dans le CD3CN

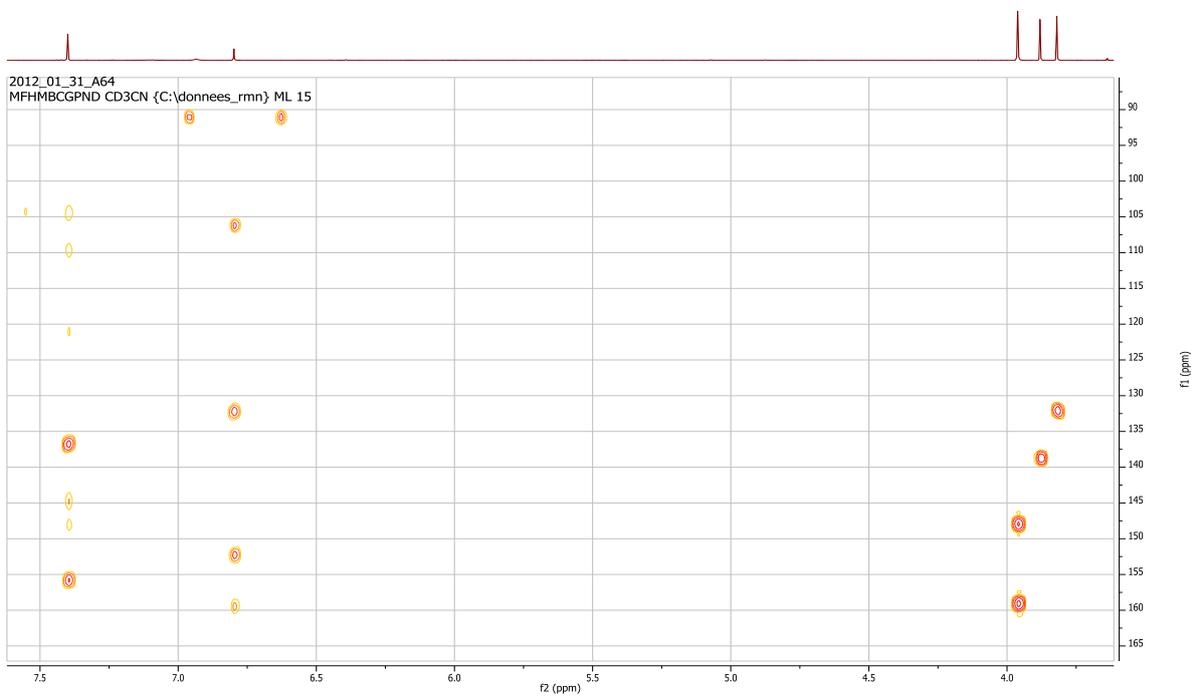


Figure IV.33: Spectre HMBC de F64 dans le CD3CN.

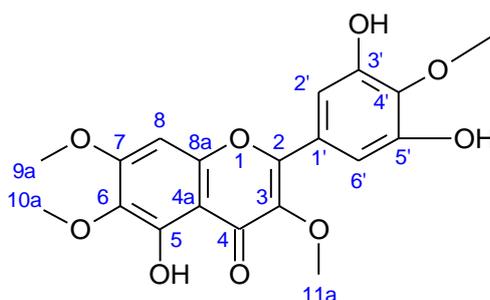


Figure IV.34: Structure possible du composé F64.

IV.2.2.4. Identification d'acides phénols dans l'extrait méthanolique.

En parallèle à l'étude des flavonoïdes génines dans l'extrait dichlorométhane, nous nous sommes également intéressés aux composés présents dans l'extrait méthanolique. Deux extraits méthanoliques d'*Anisopappus chinensis* obtenus par percolation directe et séquentielle ont été comparés par CLHP. La figure IV.35 présente le chromatogramme et le tableau IV.13 montre les conditions utilisées.

Tableau IV.13: Conditions CLHP utilisées.

Colonne: Hypersyl ODS (250 mm x 4,6 mm)		
T°: 25°C		
Débit: 1ml/min		
Echantillon: 10mg/ml		
Phase mobile: TFA/MeOH		
Détection: 340 nm		
Gradient:		
T _G (minutes)	TFA 0,05%	MeOH
0	100	0
3	97	3
45	40	60
55	40	60
56	100	0

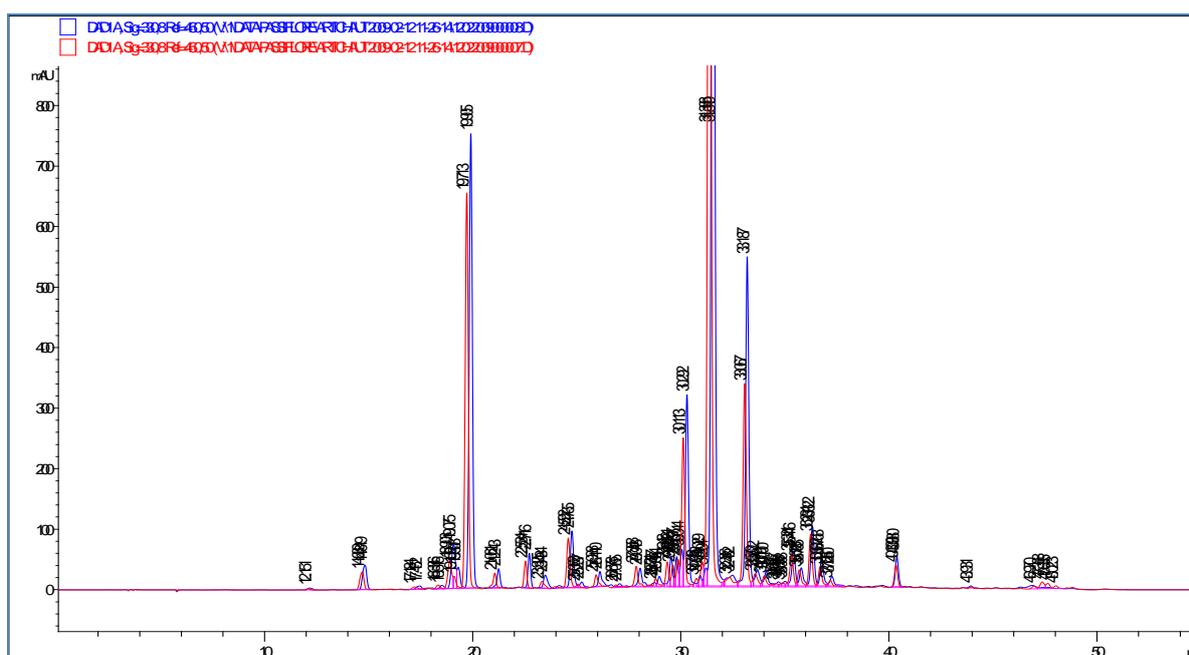


Figure IV.35: Chromatogrammes de deux extraits méthanoliques: rouge: percolation séquentielle; bleu: percolation directe.

Les deux extraits présentent un profil chromatographique identique, l'un ou l'autre pourrait être utilisé pour l'identification des acides phénols et flavonoïdes. Nous avons donc continué les analyses sur l'extrait obtenu par percolation directe. Par comparaison avec des substances de référence disponibles dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège (comparaison des temps de rétention et des spectres UV-visible), nous avons pu identifier la présence d'acide chlorogénique et de l'acide 3,4 dicafféoyl-quinique, 3,5dicafféoyl quinique, 4,5 dicafféoyl-quinique. Plusieurs autres hétérosides flavonoïdiques, de type apigénine et quercétine ont été également identifiés aux temps de rétention 20 à 30 min. Les résultats sont présentés dans les figures IV.36 à IV.39.

Nous avons alors dosé l'acide chlorogénique (monocafféoyl quinique) et dérivés (par rapport à l'acide chlorogénique) présents dans la plante (*Anisopappus chinensis*) par CLHP. Les conditions et les résultats sont présentés par les tableaux IV.14; IV.15 et figures IV.40 à IV.41.

Tableau IV.14: Conditions CLHP utilisées

Phase stationnaire: Hypersyl ODS (250 mm X 4,6 mm)		
Phase mobile: TFA 0,05% / MeCN		
Débit: 1ml/min		
T°: 25°C		
Acide chlorogénique (référence): 1mg/20ml (dans le MeOH)		
<i>Anisopappus chinensis</i> : 1g/20ml (dans le MeOH)		
Détection: 330 nm		
T _G (minutes)	TFA 0,05 %	MeCN
0	100	0
3	97	3
45	40	60
55	40	60
56	100	0

Identification de l'acide chlorogénique et dérivés

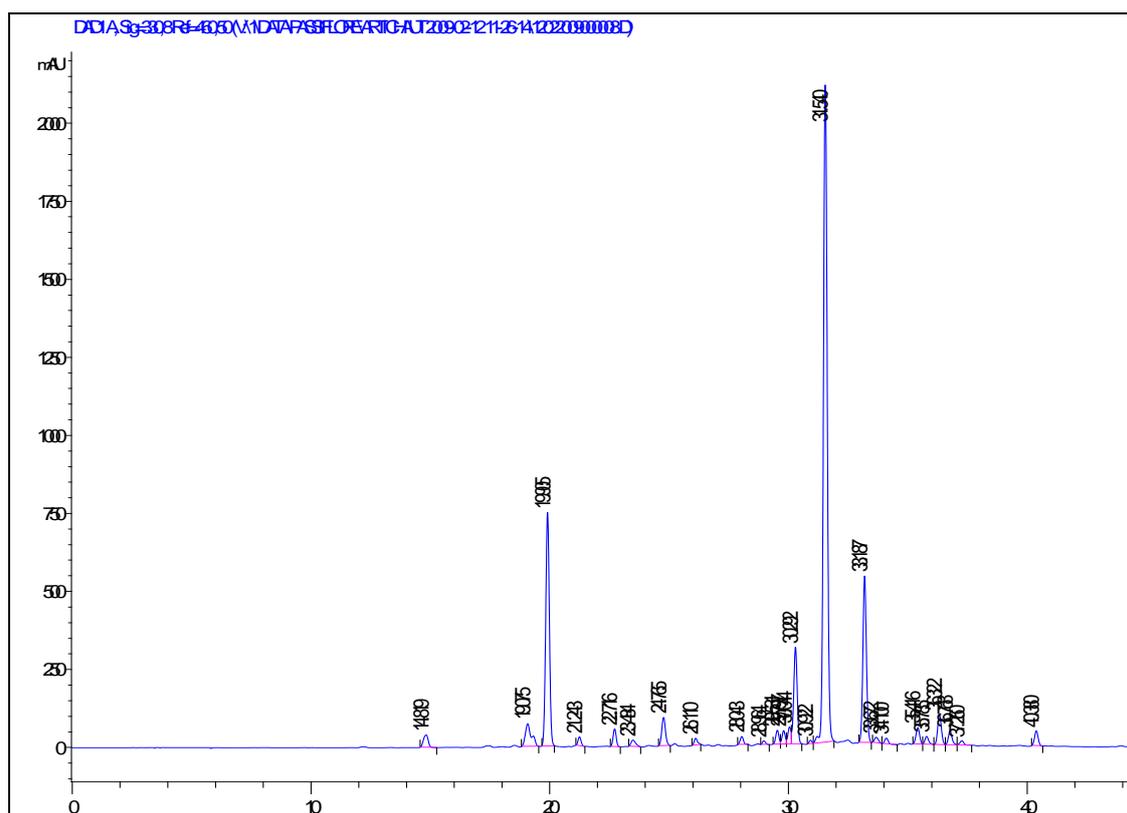


Figure IV. 36: Chromatogramme représentant les différents acides phénols ayant un spectre UV similaire à l'acide chlorogénique (Extrait MeOH d'*Anisopappus chinensis* à 330 nm)

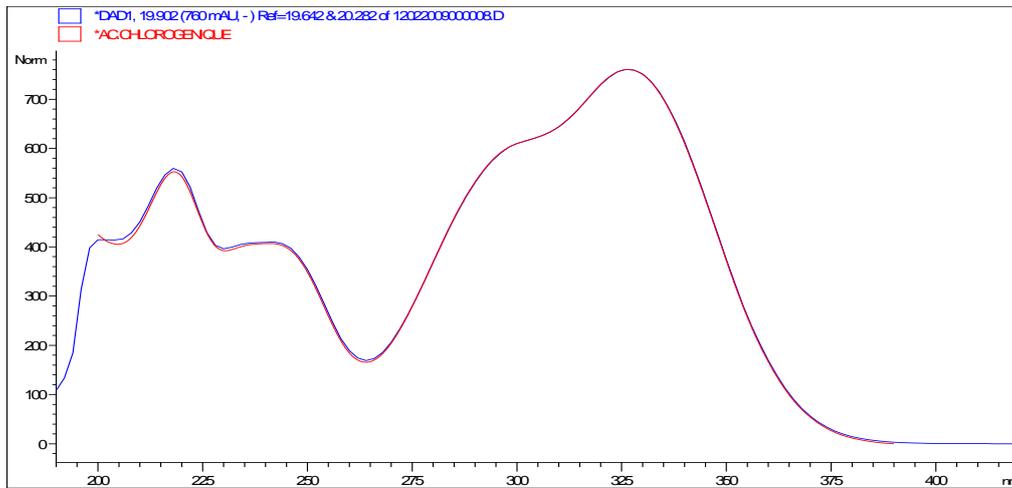


Figure IV.37: Spectre UV de l'acide chlorogénique à 330 nm. T_R : 19,9 min.

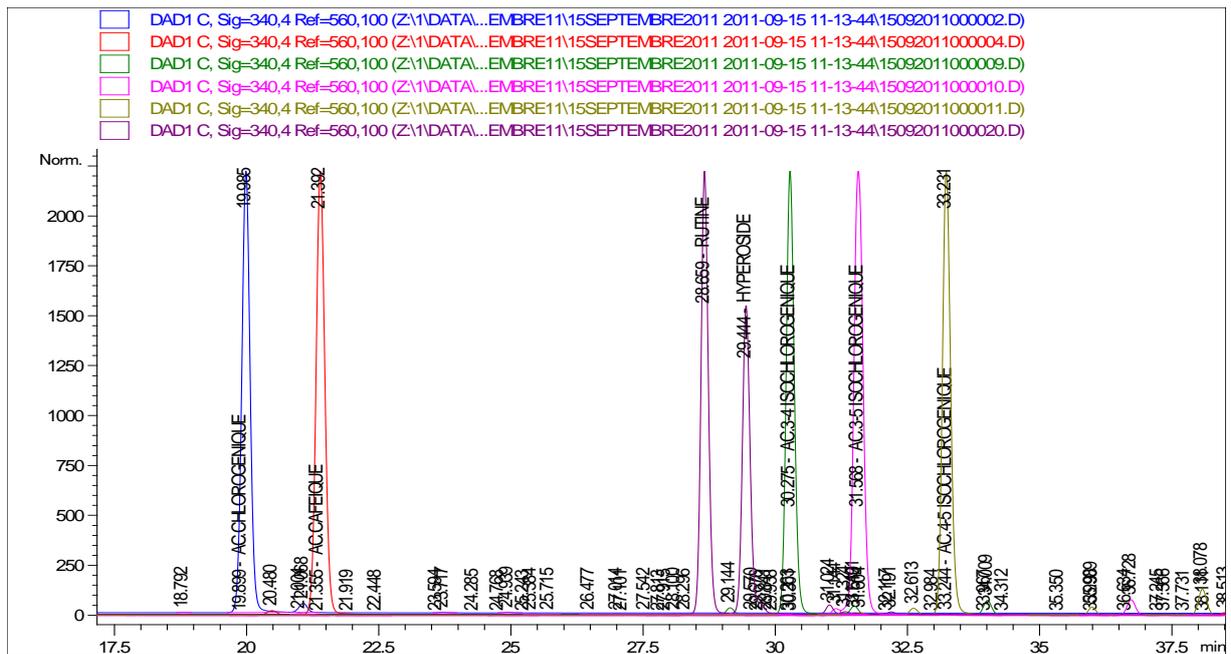


Figure IV.38: Chromatogrammes des substances de référence et leur T_R (Acides phénols et Flavonoïdes sous forme hétérosidique) à 330 nm.

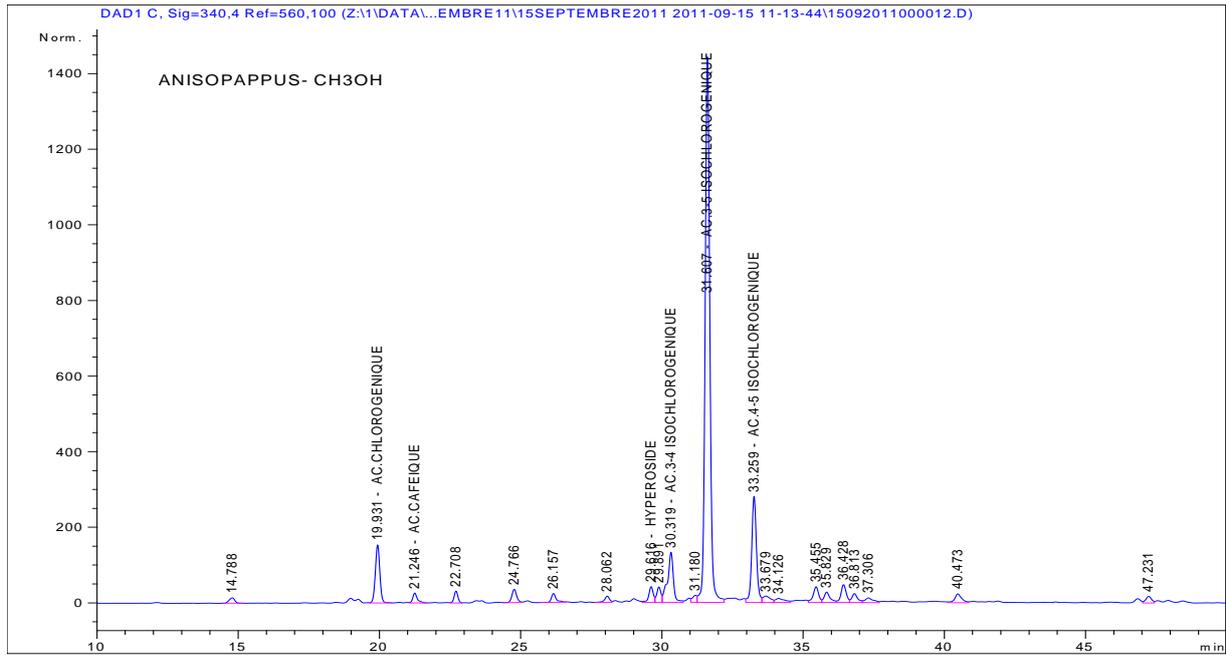


Figure IV.39: Chromatogramme des différents acides phénols (à 330 nm) identifiés dans l'extrait MeOH.

Dosage des acides phénols exprimé en acide chlorogénique

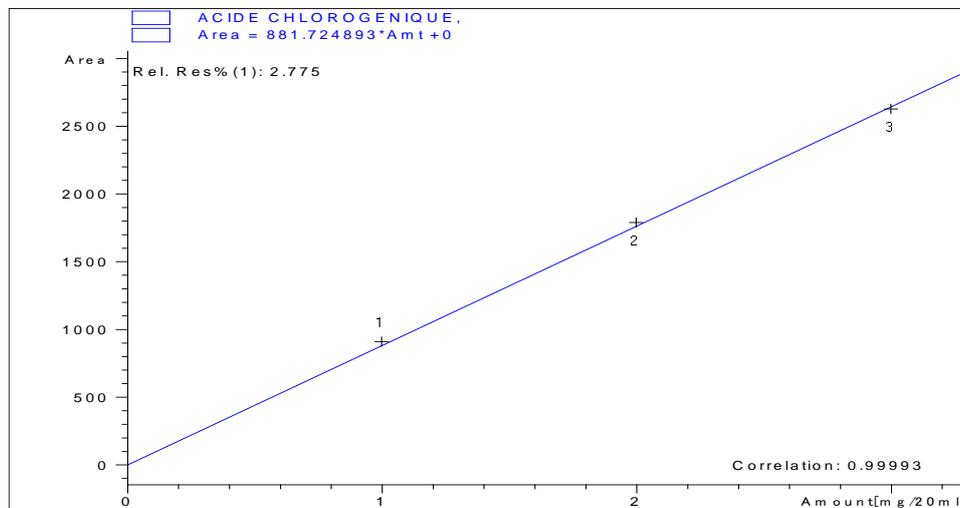


Figure IV.40: Droite de calibration du dosage de l'acide chlorogénique

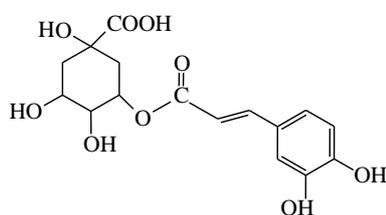
Tableau IV.15. Quantité (%) d'acide chlorogénique et dérivés présents dans *Anisopappus chinensis*.

Composés	<i>Anisopappus chinensis</i> (%)
Acide chlorogénique (97%)	0,020
Acides chlorogéniques totaux (pics à 14, 19, 24, 29, 30, 32, 34, 35, 36 min) exprimés en acide chlorogénique	0,39

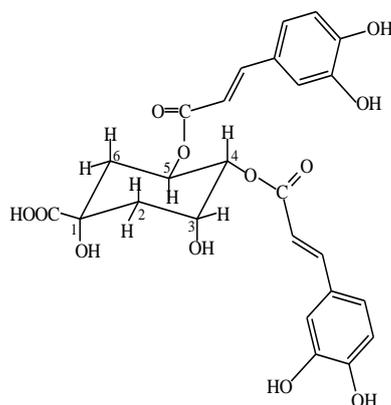
Figure IV.41: Structures de l'acide chlorogénique et des acides isochlorogéniques.

Acide chlorogénique

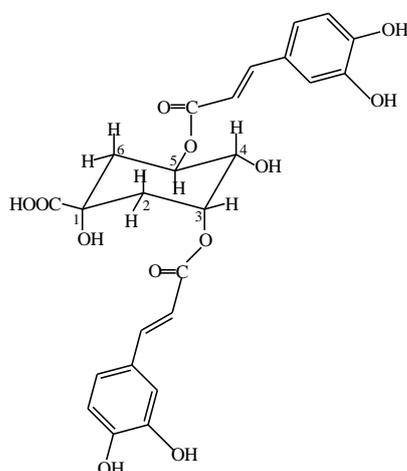
(monocaféoyl-quinique)



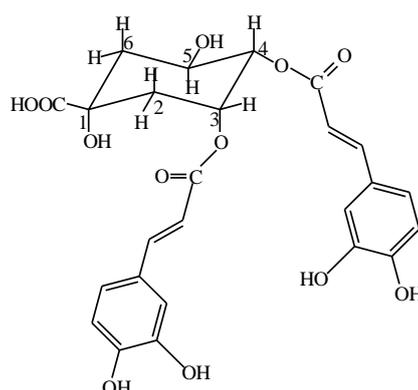
Acide 4,5 dicaféoyl-quinique



Acide 3,5 dicaféoyl-quinique



Acide 3,4 dicaféoyl-quinique



IV.2.2.5. Discussion de l'étude phytochimique d'*Anisopappus chinensis*

Deux diterpènes de type clerodane sont isolés pour la première fois à partir de l'extrait lipophile (CH₂Cl₂) d'*Anisopappus chinensis*, et ont présenté une activité antiplasmodiale modérée (CI₅₀ : 18,6 et 20,2 μM). Ces métabolites sont connus chez les Astéracées car ils ont été déjà isolés de *Microglossa angolensis* (Tene et al., 2005). Ils avaient été évalués *in vitro* sur les bactéries et les champignons avec une activité intéressante (Tamokou et al., 2009).

En outre, dans le même extrait, deux génines flavonoïdiques tri et tétra méthoxylées ont également été isolées et ont montré une activité antiplasmodiale modérée sur la souche chloroquino-sensible 3D7, avec des CI₅₀ respectives de 30,5μM et 22,6 μM. D'autres flavonoïdes hétérosidiques, de type apigénine et quercétine sont également présents dans l'extrait méthanolique de la plante, de même que divers acides cafféoyl-quiniques. Tous ces composés doivent contribuer à l'activité antipaludique de la plante.

Notons que les travaux effectués sur *Artemisia annua* (Asteraceae) par Mueller et al. en 2000, Wilcox et al. en 2004 ; Li et al. en 2006 ; Carbonara et al. en 2012, ont montré le rôle des flavonoïdes dans le renforcement ou la potentialisation de l'activité antipaludique de l'artémisinine. Par ailleurs, il a déjà été montré que des flavonoïdes méthoxylés pouvaient posséder une activité antiplasmodiale non négligeable (Nour et al., 2010). Enfin, Les travaux effectués par Subramanian et al. en 2012 ont montré que les acides cafféoyl-quiniques pouvaient aussi participer à l'activité antipaludique. Différentes équipes (Carbonara et al., 2012; Rath et al., 2004) ont également montré que les acides phénols cafféoyl-quiniques d'*Artemisia annua* augmenteraient de façon considérable la solubilité de l'artémisinine ainsi que

son extraction dans une infusion aqueuse. Une telle amélioration de l'extraction de l'artémisinine induit une meilleure efficacité de l'extrait obtenu.

Une dizaine d'acides gras ont été trouvés dans l'extrait au CH_2Cl_2 parmi lesquels trois sont insaturés (l'acide oléique, linoléique et linoléique). L'activité antiplasmodiale faible de l'acide linoléique (CI_{50} : 27,27 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sur la souche 3D7 mais toute fois ces acides polyinsaturés pourraient contribuer à l'activité antiplasmodiale de la plante

IV.2.2. Etude phytochimique de *Physalis angulata* (feuilles)

Deux types d'extraits (MeOH et CH_2Cl_2) ont été préparés par percolation à partir de la poudre des tiges feuillées de la plante. Les deux extraits ont présenté une activité similaire sur les deux souches de *Plasmodium falciparum* étudiées (Chapitre III). L'extrait CH_2Cl_2 a été choisi pour la suite de nos travaux. Un fractionnement bioguidé a dès lors été entrepris selon le schéma détaillé aux figures IV.42 et 43.

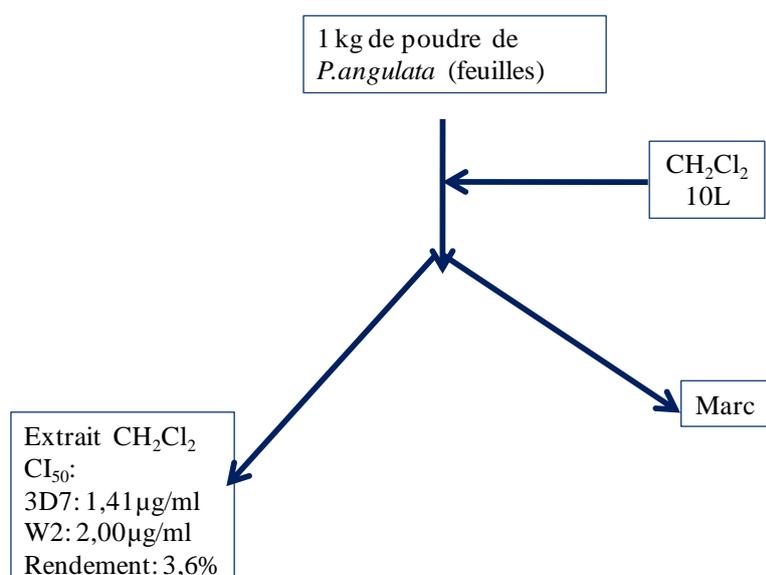


Figure IV.42: Schéma d'extraction de l'extrait dichlorométhane de *Physalis angulata*

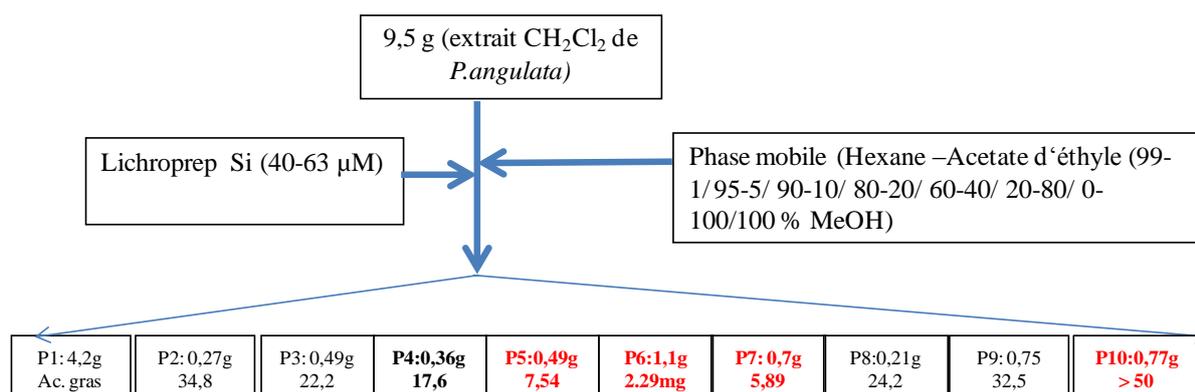


Figure IV.43: Schéma de fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ de *Physalis angulata*.

L'activité antiplasmodiale a été concentrée dans les fractions P5, P6, P7, plus particulièrement dans la fraction P6, qui présentait une CI₅₀ < 3µg/ml et a donc été sélectionnée pour poursuivre la purification bioguidée et l'isolement. Une CLHP préparative sur phase inverse a été réalisée (figure IV.44).

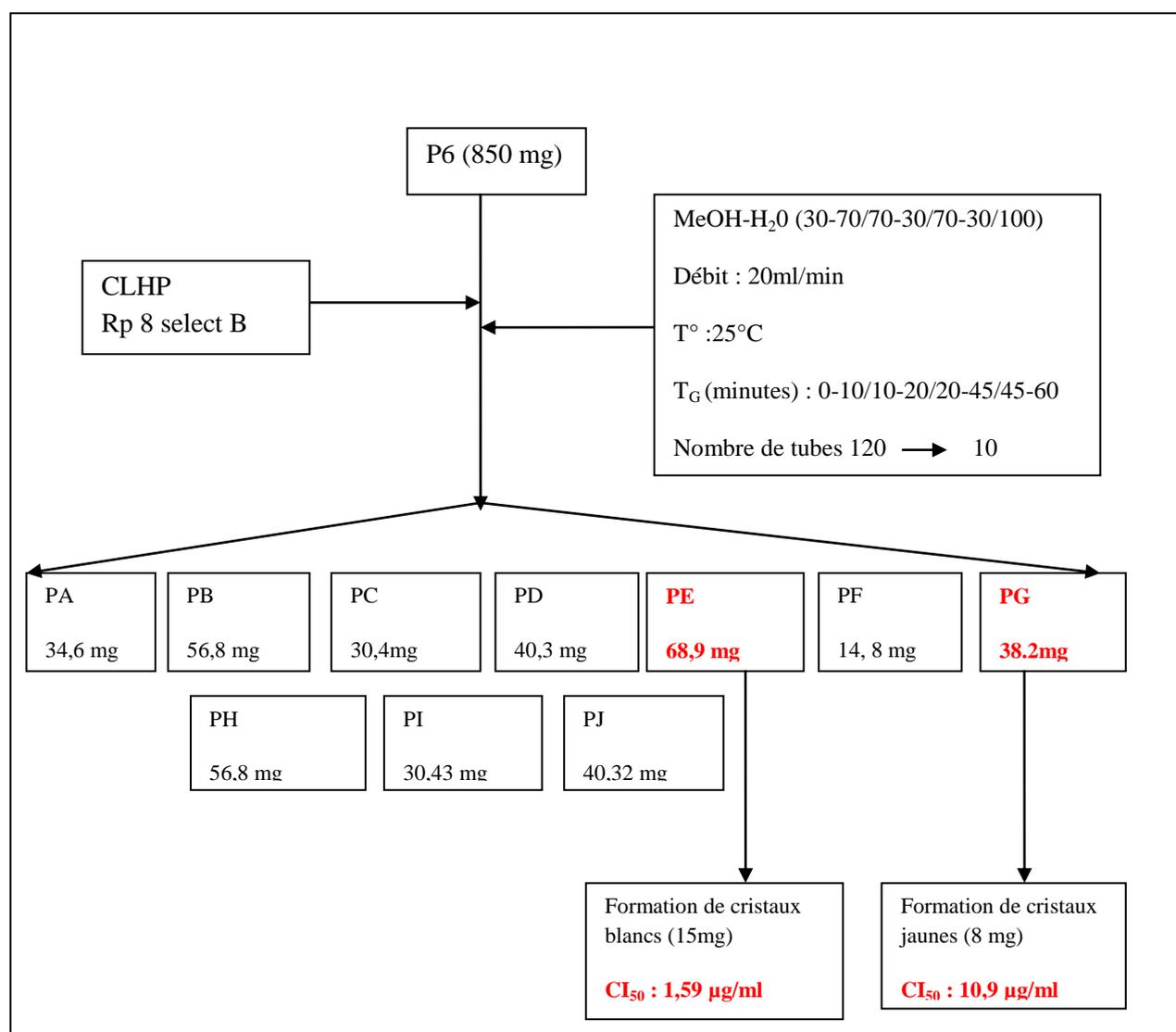


Figure IV. 44 : Schéma de purification et d'isolement de la fraction P6

A l'issue de cette CLHP, l'activité antipaludique s'est concentrée dans les sous-fractions PE et PG. Un composé a cristallisé dans la sous-fraction PE; celui-ci, pur, a pu être soumis à une analyse en vue de déterminer sa structure. Il n'a malheureusement pas été possible de purifier plus avant la sous-fraction PG.

Un nouveau fractionnement bioguidé de l'extrait CH₂Cl₂ a donc été entamé. Celui-ci est décrit à la figure IV.45. L'activité antiplasmodiale s'est concentrée dans les fractions P14 à P18 mais était plus importante dans la fraction P15, laquelle a donc été sélectionnée pour poursuivre la purification (figure IV.46).

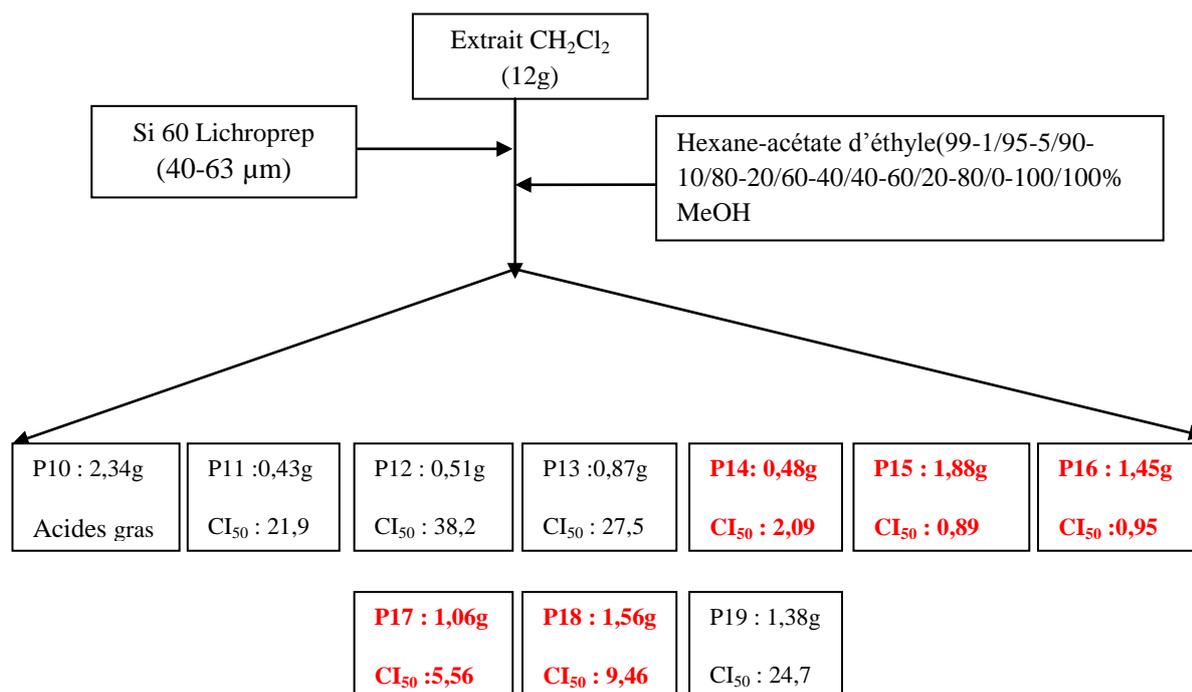


Figure IV.45: Schéma de fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂ de *Physalis angulata* (2^e essai). CI₅₀ en μg/ml

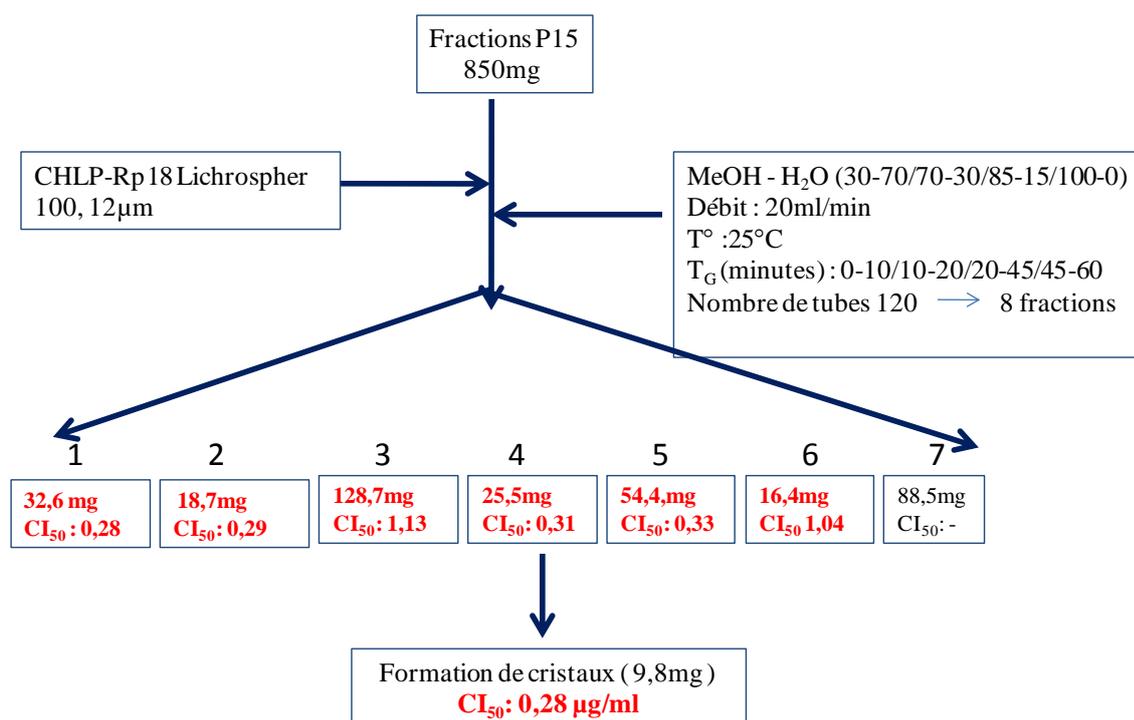


Figure IV.46: Schéma de purification de la fraction P15.

IV.2.3.1. Identification structurale de PE et P15-4

La structure de ces deux composés a été obtenue par diffraction des rayons X grâce à une collaboration avec la KUL (Chapitre V). Les structures ont été confirmées par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire et comparaison avec des données de la littérature (Makino et al., 1995; Damu et al., 2007).

Les deux composés, PE et P15-4, sont respectivement les physalines B et F, deux sécostéroïdes en C28 connus dans *Physalis angulata* (figures IV.47 et IV.48). Les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C de la physaline B se trouvent au tableau IV.16.

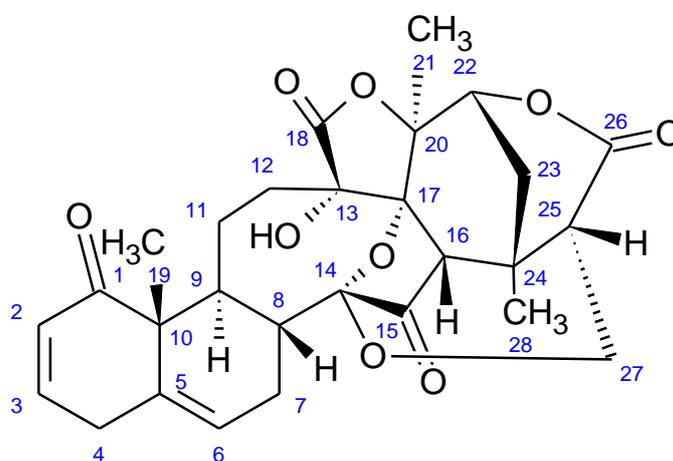


Figure IV.47 : Structure de la physaline B. CI_{50} : 1,6 μM . Index de sélectivité: 3,6.

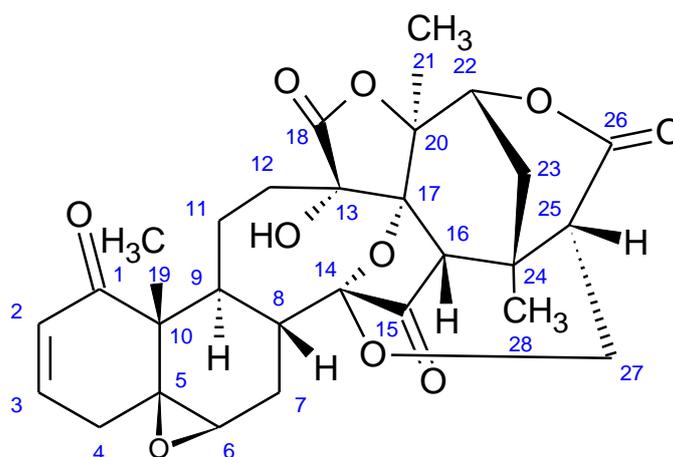


Figure IV.48 : Structure de la physaline F. CI_{50} : 0,54 μM . Index de sélectivité: 2,3.

Tableau IV.16: Valeurs (ppm) RMN-¹H, ¹³C et HMBC de la physaline B provenant de la sous-fraction PE. (Dans CDCl₃).

	¹ H	¹³ C	Principales corrélations HMBC (H→C)
1		205.75	
2	6.79	146.17	
3	5.94	127.33	
4	3.31 2.92	32.86	C-3, C-6, C-10
5		133.87	
6	5.58	124.42	C-10,
7	2.36 2.21	24.15	
8	2.18	39.87	
9	2.90	33.09	
10		52.67	
11	2.59 1.39	25.81	
12	1.99 1.25	25.83	
13	-	80.16	
13-OH	4.03		C-12, C-13
14	-	107.52	
15	-	208.23	
16	2.23	56.44	C-13, C-14, C-15, C-24, C-25, C-28
17	-	79.66	
18	-	172.30	
19	1.22	17.90	C-1, C-5, C-9, C-10
20	-	80.00	
21	1.97	21.40	C-20, C-22
22	4.55	77.16	C-24
23	2.07	33.00	
24		31.12	
25	2.45	50.89	C-16, C-24, C-26, C-27, C-28
26	-	166.89	
27	4.52 3.78	60.67	C-14, C-25 C-26
28	1.27	26.54	C-16, C-23, C-24

IV.2.3.2. Dosage de la physaline B dans *Physalis angulata* par CLHP-analytique

En utilisant la physaline B isolée au cours de notre travail, nous avons déterminé par CLHP (tableau IV.17, figures IV.49, IV.50, IV.51) la présence de 0,04% de physaline B dans les parties aériennes de *Physalis angulata*.

Tableau IV.17: Conditions CLHP utilisées.

Phase stationnaire: Hypersyl ODS (250 mm X 4,6 mm)		
Phase mobile: TFA 0,05% / MeCN		
Débit: 1ml/min		
T°: 25°C		
Physaline B: 1mg/ml et 0,1mg/ml (dans le MeOH)		
<i>Physalis angulata</i> : 2g/10ml (dans le MeOH)		
T _G (minutes)	TFA	MeCN
0	100	0
3	97	3
45	40	60
55	40	60
56	100	0

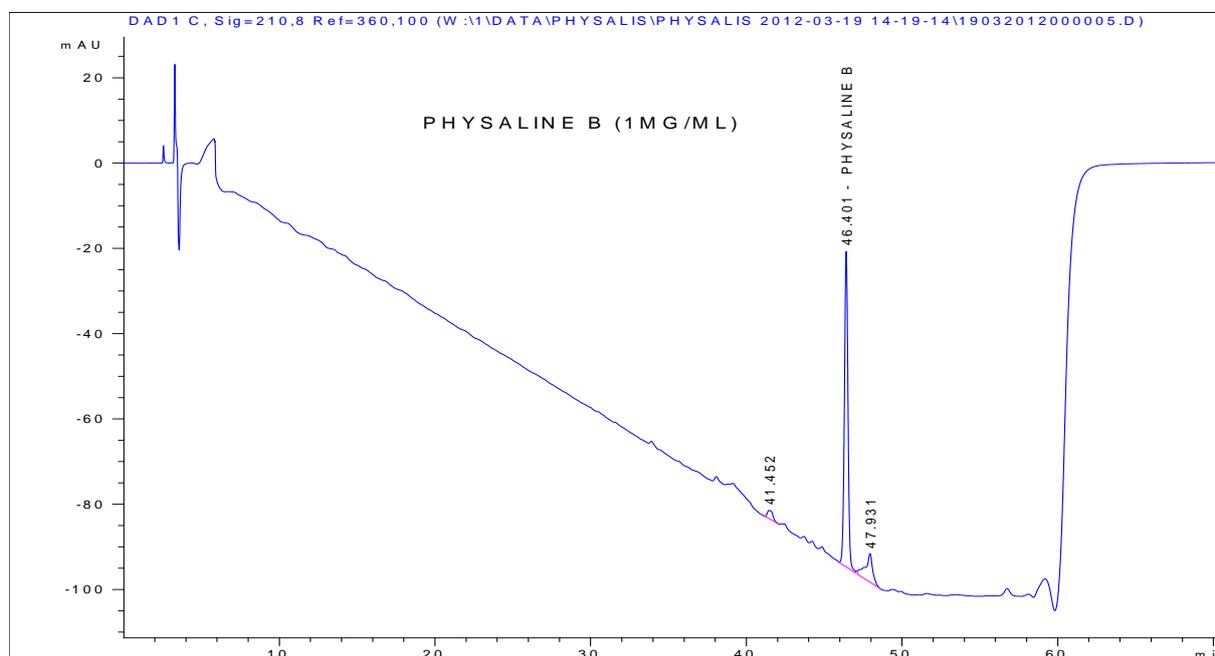


Figure IV.49: Chromatogramme de la physaline B isolée de *Physalis angulata*. (Temps de rétention: 46.2)

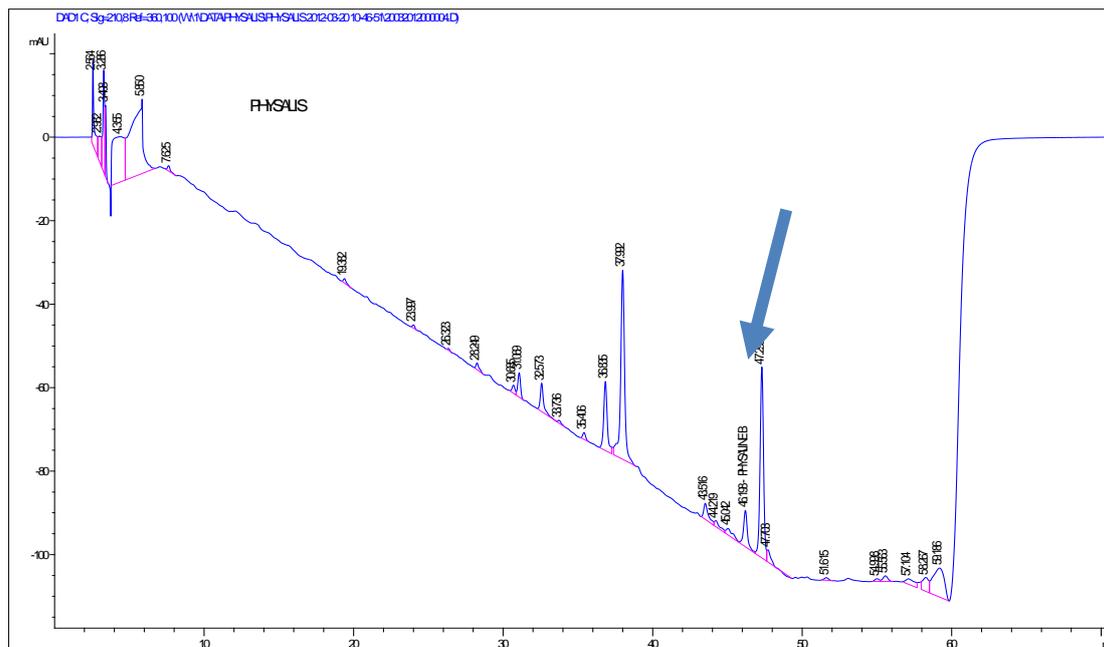


Figure IV.50 : Chromatogramme de l'extract CH₂Cl₂ de *Physalis angulata*.

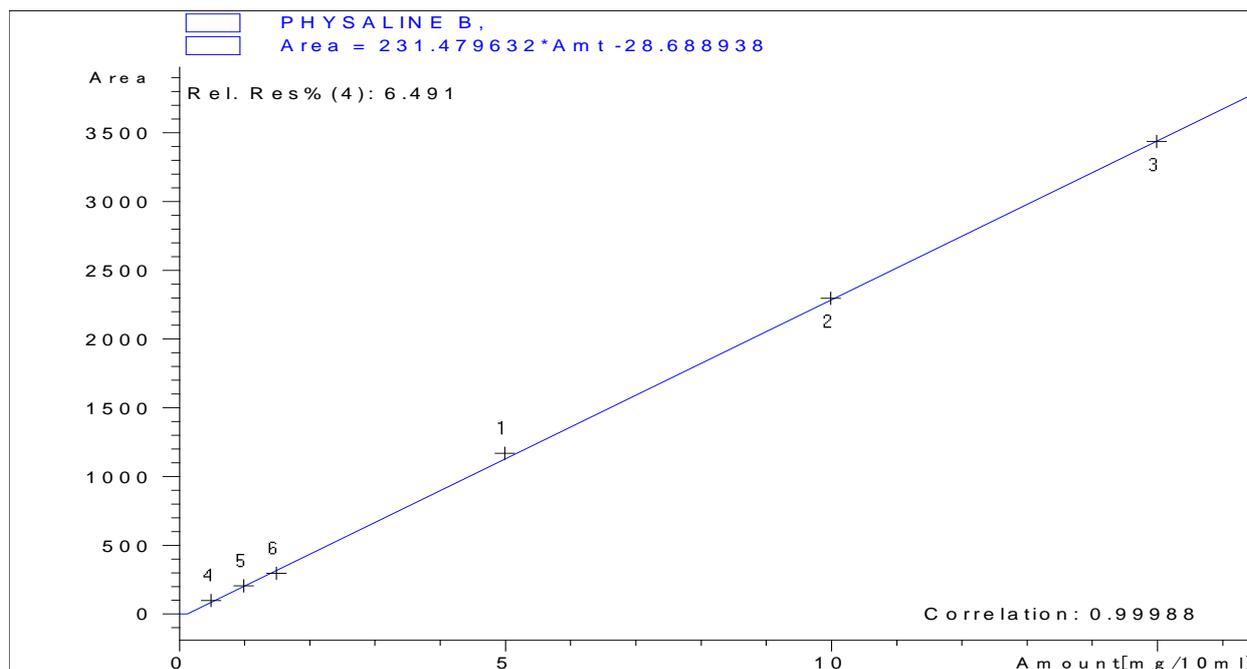
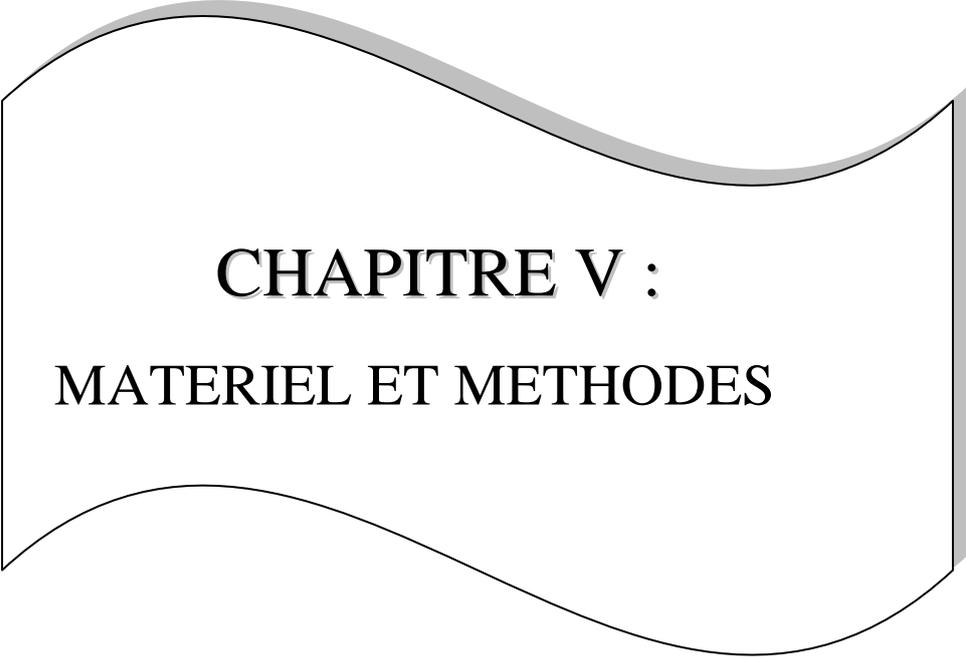


Figure IV.51: Droite de calibration de la physaline B isolée de *Physalis angulata*.

IV.2.3.3. Discussion de l'étude phytochimique de *Physalis angulata*

Deux sécostéroïdes, déjà décrits dans la plante, ont été isolés des fractions les plus actives de *P.angulata* (les physalines B et F) et ont montré une activité importante sur la souche 3D7 ($CI_{50} < 2 \mu M$). Ces séco-stéroïdes seraient donc responsables, en grande partie, de l'activité antipaludique de la plante. Ces deux composés ont été déjà isolés dans la même espèce et dans d'autres espèces du genre *Physalis* (Jin et al., 2012). Malheureusement, fin 2011, une autre équipe a déjà relié l'activité antipaludique de *Physalis angulata* aux physalines B, D, F et G (Sá, et al., 2011). Nous avons pu enfin quantifier à 0,04% la quantité de physaline B dans les feuilles de *Physalis angulata*.



CHAPITRE V :
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE V: MATERIEL ET METHODES

V.1. Matériel végétal

Récolte et Séchage

Les différentes espèces ont été récoltées dans différentes régions ou provinces de la R.D.Congo sur base de l'étude ethnobotanique (Chapitre.II). L'identification a été faite par Mr M.Nlandu de l'Institut National de Recherches Agronomiques (INERA) de l'Université de Kinshasa; les herbiers ont été déposés à l'herbarium de l'Institut National de Recherches Agronomiques et deux de ces herbiers (*Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata*) ont été également déposés à l'herbarium du jardin botanique National de Belgique à Meise. (Tableau V.1). Tous ces échantillons ont été séparément séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité au laboratoire de pharmacologie de l'Université de Kinshasa et broyés au laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Liège.

Des échantillons d'*Anisopappus chinensis* ont été récoltés à trois reprises (2008/2009/2011) et ceux de *Physalis angulata* à deux reprises (2008/2010). Les trois autres plantes n'ont été récoltées qu'une seule fois (Tableau V.1).

Tableau V.1 : Plantes sélectionnées, familles, noms vernaculaires, partie utilisée, lieu de récolte, période de récolte, numéro d'herbier et type de plante.

Espèces	Familles	Noms vernaculaires	Partie utilisée	Lieu de récolte	Période de récolte	Voucher Meise	Voucher Kinshasa	Type de plante
<i>A.chinensis</i> Hook & Arn	Asteraceae	Kasol-sol,	Plante Entière	Katanga (Kolwezi)	02/2008, 01/2009,02/2011	00000692238	3278	Herbe
<i>E.palustre</i> Staner	Meliaceae	Pake	Ecorce de tronc	Kasaï- oriental (Sankuru)	10/2000		9287	Arbre
<i>M.azedarach</i> L.	Meliaceae	kamunara	Feuilles	Maniema (kindu)	09/2007	-	141	arbuste
<i>P.angulata</i> L.	Solanaceae	Ndimba, lundumba	Feuilles, Plante Entière	Bas- Congo	02/2008,01/2010	00000692869921	974	Herbe
<i>S.icaja</i> Baill	Loganiaceae	Bondo bololo	Ecorce de Racines	Equateur	02/2008	-	357	Liane

V.2. Solvants et réactifs utilisés:

Les réactifs et solvants utilisés sont repris dans le tableau V.2.

Tableau V.2: Solvants et réactifs utilisés lors du screening phytochimique préliminaire et de l'extraction.

Solvant	Concentration et/ou qualité	Fournisseurs
Acétate d'éthyle	Hypersolv chromanorm	VWR prolabo
Acétone	AnalaR	VWR prolabo
Acétonitrile	Lichrosolv reag. Ph. Eur. gradient liq chromatography	Merck
Dichloromethane	Hypersolv pour HPLC <i>isocratic grade</i>	VWR prolabo
Ethanol	Dénaturé Ph. Eur. 96% dénaturé 3% à l'éther	Royal Nadalco
Ether de pétrole	AnalaR normapur	VWR
Ether diéthylique	AnalaR normapur	VWR prolabo
Hexane	AnalaR normapur	VWR prolabo
Méthanol	Hypersolv chromanorm Lichrosolv reag. Ph. Eur. gradient liq chromatography	VWR prolabo Merck
n-Heptane	Pour analyse Emsure	Merck
Toluène	Pour analyse	Merck
Réactifs	Concentration et/ou qualité	Fournisseurs
Acide acétique glacial	Acs iso reag Ph. Eur. 100%	Merck
Acide chlorhydrique	Pour analyse	Merck
Acide formique	Pour analyse 98-100%	Merck
Acide sulfurique	Pour analyse 98%	Merck
Acide trifluoroacétique	Pour analyse 96-98%	Merck
Acide trifluoroacétique	Pour analyse	J.T.Baker
Ammoniaque	Pour analyse 25%	Merck
Chlorure ferrique		Merck
Diphénylborate d' aminoéthanol		Fluka analyticals
Hydroxyde de potassium	Pour analyse	Merck
Iodure de mercure		Merck
Iodure de potassium	Ph Eur, BP, USP	Merck
Polyéthylène glycol 400	Pour analyse	Merck
Soude caustique	Pour analyse	Merck
Sous nitrate de Bismuth		UCB
Sulfate sodique anhydre	Acs iso reag ph. Eur.	Merck
Vanilline		AnalaR, BHD

Réactifs préparés au laboratoire:

1. Réactif de Mayer:

Dissoudre 1,35g de HgCl_2 dans 50ml d'eau, y ajouter 5 g de KI et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée

2. Réactif de Kedde:

Mélanger 5 ml d'une solution éthanolique à 3% d'acide 3,5 dinitrobenzoïque avec 5 ml hydroxyde de sodiu 5M;

3. Vanilline sulfurique:

Solubiliser 1g de vanilline dans 100 ml d'éthanol acidifié par 2 ml d'acide sulfurique;

4. Réactif de Liebermann:

Le réactif est composé d'anhydride acétique /acide sulfurique: 2-1

5. Réactif de Dragendorff:

Peser 1,7g de sous-nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau. A cette suspension ajouter une solution P /V à 40% de KI. La solution stock résultante est mélangée pendant une heure puis filtrée. Avant usage, la solution stock est diluée 4 fois dans l'eau distillée.

6. Réactif de Stiasny:

Solution constituée de formol à 30% et de HCl concentré dans les proportions (2:1)

7. Réactif des flavonoïdes (Révélation des CCM):

Solution composée de 10 g /l de diphénylborate d'aminoéthanol (DPBAO) dans le méthanol. La pulvérisation de la plaque avec ce réactif est suivie d'une pulvérisation avec du polyéthylène glycol 400R 50 g/l dans le méthanol.

8. Réactif de Borntrager:

Préparer une solution d'ammoniaque à 10% ou de soude caustique à 10 %.

V.3. Préparation des extraits

Les différents extraits utilisés pour le screening phytochimique, pour les tests d'activité antiplasmodiale et pour l'analyse phytochimique des plantes ont été préparés par macération, décoction ou percolation et concentrés sous pression réduite (au moyen d'un évaporateur rotatif sous vide (Büchi R-134) ou lyophilisés (extraits aqueux).

V.3.1. Macération:

Extraits MeOH, EtOH, CH₂Cl₂, EtOH-Eau (70-30), EtOH-Eau (50-50):

Agiter pendant 30 minutes, 2g de poudre de chaque espèce végétale (Tableau V.1) avec 3 X 30 ml du solvant correspondant, puis filtrer sur papier filtre wattman. Les filtrats réunis sont alors évaporés à sec sous pression réduite à 40 °C.

V.3.2. Décoction (extraits aqueux):

Chauffer à reflux pendant 30 minutes 4g de poudre de chaque espèce (Tableau V.1) dans ±75 ml d'eau puis filtrer sur ouate. Le filtrat est congelé puis lyophilisé au moyen d'un lyophilisateur Alpha, Chriss Services pendant 16-24 heures.

V.3.3. Percolation (en vue de l'isolement des principes actifs):

Percoler 1 kg de poudre (*Anisopappus chinensis* ou *Physalis angulata*) à l'aide de 10 L de solvant (CH₂Cl₂, MeOH). Le percolat récupéré goutte à goutte est évaporé à sec sous pression réduite à 40 °C.

V.4. Screening phytochimique :

Les différentes poudres végétales obtenues après broyage ont servi à la réalisation du screening phytochimique préliminaire, soit par des réactions en solution dans des tubes à essai, soit par CCM (Wagner, 1984).

V.4.1. Test général des alcaloïdes en milieu acide

A 0.3g de poudre de chaque espèce (Tableau V.1), ajouter 3ml de HCl dilué à 5%, et laisser sous agitation pendant 30 minutes puis filtrer. 1ml du filtrat est prélevé et placé dans un tube à essai avec quelques gouttes de réactif de Mayer. La présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité ou d'un trouble blanc.

V.4.2. Test des alcaloïdes par chromatographie sur Couche Mince (CCM)

A 1 g de poudre de chaque espèce (Tableau V.1), ajouter 1 ml d'ammoniaque à 10 % et 5 ml d'acétate d'éthyle et laisser sous agitation pendant 30 minutes. 20 µl ou 50 µl du filtrat sont déposés pour une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

- Phase mobile: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 25% (8/2/0.5)

La quinine est utilisée comme témoin positif (5mg/ml dans le MeOH et dépôt 10 µl). Le chromatogramme développé est observé aux UV à 254 nm et 366 nm puis la plaque est pulvérisée au moyen du réactif de Dragendorff et observée dans le visible. La présence d'alcaloïdes est confirmée par des bandes jaune-orange ou jaune-brun.

V.4.3. Test des flavonoïdes et acides phénols

Test CCM:

Agiter durant 10 minutes 1g de poudre de chaque espèce (Tableau V.1) avec 5 ml de MeOH. Déposer 20µl de filtrat pour l'analyse CCM.

- Phase mobile: EtOAc - HCOOH - CH₃COOH glacial- H₂O (100/11/11/26) (flavonoïdes sous forme hétérosidique)

Témoin: rutine (5mg/ml dans le MeOH, dépôt: 10 µl).

- Phase mobile: CH₂Cl₂-HCOOH-CH₃COCH₃ (85-8.5-25) (flavonoïdes génines)
- Révélation: observation à 254 et 366 nm puis pulvérisation par le réactif DPBAO. En présence de flavonoïdes, on observe des fluorescences orange, jaune, ou rouge-orangé.

Test de coloration:

Les flavonoïdes sont également mis en évidence par le réactif de Shinoda :

Agiter durant 5 à 10 minutes 0,2 g de poudre de chaque espèce (Tableau V.1) avec 10 ml de MeOH puis filtrer. Au filtrat, on ajoute 1 ml de HCl concentré, 0,2 g de poudre de Mg ou de Zn et quelques ml d'alcool isoamylique. En présence de flavonoïdes, une coloration rouge-orangée (flavones); rouge cerise (flavonols) ; rouge-violacée (flavonones) apparaît dans la phase alcoolique.

V.4.4. Test des anthraquinones (Réaction de Borntrager)

Chauffer à reflux pendant 15 minutes, 100mg de poudre de chaque espèce dans 50 ml d'eau additionnée de 2 ml de HCl concentré. Une fois la solution refroidie, ajouter dans une ampoule à décanter 40 ml d'éther diéthylique et récupérer la couche étherée. Filtrer sur sulfate sodique anhydre pour éliminer les dernières traces d'eau et évaporer à siccité. Ajouter alors 5ml d'ammoniaque dilué (41 g d'ammoniaque concentré dans 100 ml d'eau), l'apparition d'une coloration jaune ou orange indique la présence de quinones liées et une coloration rouge violacée, la présence de quinones libres.

V.4.4.1. Recherche des anthraquinones par CCM

- Solution à examiner : voir solution préparée pour la recherche des flavonoïdes (V.4.3)
- Dépôt: 20 ou 50 μ l
- Phase mobile : EtOAc –MeOH-H₂O : (100/13,5/10)
- Témoin: Franguloside: 5 mg/ml dans le MeOH, dépôt : 10 μ l.

La plaque est observée aux UV à 254 et 366 nm et pulvérisée avec du KOH éthanolique à 10%. La présence des anthraquinones est confirmée par l'apparition d'une fluorescence rouge à 366 nm, les anthrones donnent une coloration jaune.

V.4.5. Test des Terpènes

Chauffer à reflux pendant 15 minutes, 1g de poudre de chaque espèce dans 10 ml de CH₂Cl₂ puis filtrer. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est dissout dans 0.5 ml de toluène.

- Dépôt: 20 μ l
- Phase mobile : C₆H₅CH₃-EtOAc: 93/7
- Témoin: thymol : 5mg/ml dans le méthanol; dépôt: 10 μ l
- Révélation : vanilline sulfurique puis chauffage à 100°C pendant 10 minutes

La présence de terpènes est confirmée par l'apparition de diverses colorations. Toute fois ce test n'est pas spécifique car d'autres classes de métabolites peuvent donner des colorations avec la vanilline sulfurique.

V.4.6. Test des coumarines

L'extrait obtenu dans la recherche des terpènes (V.4.5) est utilisé pour la recherche des coumarines.

- Dépôt: 20 μ l
- Phase mobile: Toluène-éther éthylique (1/1) saturé avec de l'acide acétique à 10 % (mélanger 10ml de toluène, 10 ml d'éther et 10 ml d'acide acétique glacial 10 % dans une ampoule à décanter et éliminer la phase inférieure. Utiliser la phase supérieure comme phase mobile).
- Témoin: scopolétine : 5 mg/ml dans le méthanol.
- Révélation: pulvériser du KOH éthanolique à 10 %, l'apparition d'une fluorescence bleue indique la présence de coumarines (observation aux UV à 254/366 nm).

V.4.7. Test des saponines (saponosides)

V.4.7.1. Test général basé sur la détermination de l'indice mousse

Les saponosides ou saponines sont caractérisés par leur grand pouvoir tensio-actif naturel dû à leur caractère amphotère.

0,5 g de poudre de chaque espèce sont placés dans une fiole conique renfermant 50 ml d'eau bouillante, une ébullition modérée est maintenue durant 30 minutes (chauffage à reflux) et la solution est filtrée dans deux tubes à essai de 16 mm de diamètre et 16 cm de hauteur. On mesure 1 et 10 ml de décocté, on ajuste le cas échéant à 10ml avec de l'eau distillée, on agite très fortement pendant 15 secondes en bouchant le tube avec le pouce et on laisse reposer 15 minutes. On mesure alors la hauteur de la mousse, la présence de saponosides est confirmée par une hauteur de mousse de plus d'un cm dans un des tubes.

V.4.7.2. Chromatographie sur couche mince

Prélever 3-4 ml de la solution méthanolique obtenue lors du test des flavonoïdes (V.4.3), les réduire à 0,5 ml et ajouter 1 ml d'eau distillée. Extraire par 3 ml de n-butanol saturé d'eau.

- Dépôt: 20-100 µl.
- Phase mobile: CHCl_3 - CH_3COOH glacial- MeOH - H_2O (64-32-12-8).
- Témoin: aescine: 5 mg/ml dans le méthanol.
- Révélation: pulvérisation de vanilline sulfurique et chauffage à 100 °C pendant 10 minutes, la présence de saponines est confirmée par l'apparition de diverses couleurs (bleu, bleu-violet, rouge) après observation aux UV à 254/366 nm.

V.4.8. Test des hétérosides cardiotoniques

Mélanger 0,5 g de poudre de chaque espèce avec 5ml de MeOH à 50 % et 10 ml d'acétate de plomb(II) à 2%, chauffer pendant 10 minutes à 60 °C (reflux) puis filtrer, le filtrat est refroidit et est extrait 2 X par 10ml de CH_2Cl_2 . Les extraits réunis sont évaporés à sec, le résidu est dissous dans 200 µl de CH_2Cl_2 et 200 µl de MeOH .

- Dépôt: 100µl.
- Phase mobile : EtOAc - MeOH - H_2O : 100-13.5-10.
- Témoin: digoxine: 5mg/ml dans le méthanol.
- Révélation:

- pulvérisation du réactif de Kedde et observation dans le visible, l'obtention d'une coloration fugace rose-bleu-violet indique la présence des hétérosides cardiotoniques (cardenolides).
- Sur une autre plaque, on pulvérise de la vanilline sulfurique et on chauffe à 100°C pendant 10 minutes, la présence des hétérosides cardiotoniques est confirmée par l'apparition d'une coloration bleue.

V.4.9. Test des tanins galliques et catéchiques

Le filtrat obtenu lors de la recherche des saponines (V.4.7) est également utilisé pour la recherche des tanins.

- A 2 ml de la solution, ajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 1 %, la coloration bleue-foncée, noire ou verte indique la présence de tanins.
- A 30 ml de la solution, ajouter 15 ml de réactif de Stiasny et chauffer au bain-marie à 90°C. L'obtention d'un précipité rose quantitativement important indique la présence de tanins catéchiques. Après filtration, on sature le filtrat avec de l'acétate sodique et on y ajoute quelques gouttes de FeCl_3 à 1%, l'obtention d'une coloration noire ou bleue ou d'une teinte noire ou bleue indique la présence de tanins galliques.

V.4.10. Test des anthocyanes

La présence d'anthocyanes dans un décocté ou un infusé est indiquée par une coloration rouge qui s'accroît par l'addition de HCl dilué et vire au bleu-violacé-verdâtre par l'ajout d'ammoniaque.

V.5. Techniques chromatographiques

Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé les techniques suivantes:

V.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La phase stationnaire utilisée est un gel de silice d'épaisseur 0,2 mm imprégnée d'un indicateur de fluorescence sur plaque en plastique 20 cm X 20 cm (silice 60 F₂₅₄, Merck1.05735). Les dépôts sur la plaque se font au moyen de capillaires (Micropipettes, BLAUBRAND® intraMARK) ayant une capacité de 5- 20 µl. Après migration, la plaque est séchée et observée à 254 et/ou 366 nm puis pulvérisée à l'aide d'un ou des réactifs appropriés et observée à la lumière visible. Les images chromatographiques sont numérisées à l'aide d'un

dispositif DESAGA (SARSTEDT- GRUPP) équipé d'une caméra color vidéo CCD-400 (MITSUBISHI).

V.5.2. Chromatographie sur couche mince préparative

La phase stationnaire est composée de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck, 10747, 100g/ 240 ml d'eau distillée) fixé sur des plaques en verre de 20 cm X 20 cm ou 40 cm X 20 cm au moyen d'un étaleur (DESAGA) et séchées pendant 48 heures à température ambiante. Avant usage, les plaques sont activées à l'étuve (Heraeus) à 120°C pendant 1heure, puis placées dans un dessiccateur pour éviter tout contact avec l'humidité. L'échantillon solubilisé dans du méthanol est déposé en bande au bas de la plaque. Après migration de la phase mobile, la plaque est observée aux UV puis si nécessaire, pulvérisée au niveau de bord (1,5 cm) afin de mieux visualiser la bande d'intérêt qui est ensuite grattée et extraite par un solvant adéquat.

V.5.3. Chromatographie liquide sur colonne ouverte

Des colonnes en verre de hauteur et de diamètre variables sont remplies de silice Lichroprep (40-63µm, Merck, 113905) à raison de 100g pour 1 g d'extrait. L'extrait à séparer est déposé au sommet de la colonne soit sous forme de dépôt sec (dissolution de l'extrait dans un solvant volatil adéquat puis mélange avec un peu de silice de la phase stationnaire) soit après solubilisation dans un minimum de solvant.

V.5.4. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

V.5.4.1. Chromatographie liquide haute performance analytique

Les phases stationnaires utilisées sont les suivantes :

- Silice: Lichrospher Si 60 (250 cm X 4,6mm, 5µm, Merck)
- Silice greffée C8: Lichrospher Si 60 RP-select B (250 cm X 4,6mm, 5µm, Merck)
- Silice greffée C18: Lichrospher hypersyl ODS (C18) (250 cm X 4,6mm,5µm, Alltech)
- PFP (pentafluorophenyl): (250 mm X 4,6mm, 5µm, Luna phenomenex®)
- Pursuit diphenyl (250mm X 4,6mm, 5µm, Varian)

Le système utilisé est composé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un injecteur automatique (Agilent 1100 series), d'un détecteur DAD (détecteur à barettes de diodes) et d'une enceinte thermostatée (Agilent 1200 séries). Le système est contrôlé par un logiciel

Agilent chemstation et est aussi couplé à un détecteur ELSD (Alltech 3300 avec générateur d'azote).

V.5.4.2. Chromatographie liquide haute performance préparative

Le système utilisé comprend : une pompe quaternaire (ARMEN AP100), une valve d'injection manuelle (6port- 3channel valve, KNAUER), une boucle d'injection, un collecteur automatique (Fraction collector C-660, BUCHI) ayant une capacité maximale de 120 tubes avec un débit variant entre 10-30 ml/minutes. Les colonnes sont remplies au laboratoire par un système *self packing device for 25cm columns Merck*.

Un autre système composé d'une pompe binaire (Varian), couplée à un détecteur UV/Vis (Varian) et à un collecteur de fraction automatique (varian 440- LC fraction collector) a également été utilisé.

Pour notre travail les colonnes suivantes ont été utilisées :

- Silice greffée C8: Lichrospher 60 RP- select B, 12 µm (250 x 25mm) Merck
- Silice greffée C18: Lichrospher RP-18, 12 µm (250x 25 mm) Merck
- PFP (pentafluorophényle): luna, 5µm (250 x 21, 20mm) Phenomex[®]

V.5.4.3. Chromatographie liquide couplée à la résonance Magnétique Nucléaire (LC-SPE- NMR)

Le système est composé d'une chaîne HPLC quaternaire (Agilent 1100 series), d'un système SPE (Prospekt 2 Spark) et d'une interface BPSU (Bruker). Il est contrôlé par le logiciel HYSTAR 3.2 (BRUKER). Ce système a été utilisé pour l'identification des flavonoïdes d'*Anisopappus chinensis*

V.5.5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La GC 8000 séries (FISONS Intruments Interscience) a été utilisée pour l'identification d'acides gras méthylés contenus dans *A.chinensis*. La méthode utilisée était celle décrite dans la Pharmacopée Européenne 7^e édition. De l'hélium (Westfalen) a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1,3ml/min et une colonne en polyéthylène glycol 20M (WCOT FUSED SILICA 60M x 0,25mm coating CP Wax 52 CB (DF) 0,25µm) comme phase stationnaire. L'analyse se déroule à la température de 180°C (isotherme), la chambre d'injection étant portée à 250°C (injection 1µl, le rapport de division de 1/100). Le

chromatographe est couplé à un détecteur FID (détecteur à ionisation à flamme) et la température de la chambre est de 250°C.

V.5.5.1. Mode opératoire pour la méthylation des acides gras

De l'huile de colza et de l'huile de palme sont utilisées comme référence.

Dans un ballon à fond rond sont placés 5g d'huile plus 10ml de MeOH et 20ml de KOH méthanolique 1M, puis chauffés entre 40-50° C pendant 30minutes. Après refroidissement, on ajoute 50 ml d'eau distillée et on acidifie jusqu'à pH 4 avec de l'acide acétique glacial, puis, on extrait par du dichlorométhane et on évapore à sec.

À 50 mg d'extrait au CH₂Cl₂ d'acides gras, on ajoute 10 ml de MeOH anhydre (MeOH 24H dans un tamis moléculaire de 4A) et 3,5 ml de KOH (6g/l dans le MeOH R), on chauffe à reflux sous azote à la pression de 50 ml/min pendant 30 min tout en remuant jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Après refroidissement, on place la solution dans une ampoule à décanter et on y ajoute 10 ml de solution de NaCl R (200 g/l) + 20 ml de n-heptane. La phase organique est récupérée dans un flacon contenant du sulfate de sodium anhydre puis filtrée et évaporée sous pression réduite.

V.6. Techniques de détermination de structures de composés isolés

V.6.1. Techniques spectroscopiques

V.6.1.1. Spectroscopie infra rouge (IR)

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre FT-IR SPECTRUM 2000 (Perkin-Elmer) équipé d'un détecteur BTGS (Chimie analytique, pharmacie Ulg). Les substances (cristaux obtenus à partir d'extrait de *Physalis angulata*) à analyser sont dissoutes dans le tétrachloroéthylène (C₂Cl₄, Merck) à raison de 100µg/ml.

V.6.1.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance II 500 MHz (Département de Pharmacie, Ulg), résonant respectivement à 500MHz (¹H) et 125 MHz (¹³C). Les déplacements chimiques sont enregistrés en δ (ppm) en considérant le déplacement chimique du tétraméthylsilane (TMS, comme référence) δTMS = 0. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Ce spectromètre est équipé d'une cryosonde. Les substances à analyser sont dissoutes dans des solvants deutérés (CD₃CN, MeOD, DMSO-d₆,

CD₃COCD₃, CDCl₃...) (Eurisotop). Pour la détermination de structures des composés isolés, les séquences classiques de RMN-¹H, RMN-¹³C, COSY¹ H-¹H, HSQC, HMBC sont utilisées. Le traitement des spectres est réalisé grâce au logiciel MestRenova.

V.6.1.3. Spectrométrie de masse

Les spectres de masses et les masses exactes ont été mesurés au laboratoire de spectrométrie de masse du département de pharmacie de l'Ulg. L'appareil utilisé est un spectromètre de masse à haute résolution (Mass spectrometer Time of flight QToF₂, Waters, UK, Altrincham) couplé à la chromatographie liquide (LC-MS/LC-MS/MS) Waters 2695 et équipé d'une colonne CLHP Phenomenex Luna (Phenyl Hexyl phase, 5µm, 250mm x 4.6 mm with a guard filter). Les masses des flavonoïdes et acides phénols sont déterminées en mode négatif (ES-) et celles des terpènes en mode positif. (ES+).

V.6.1.4. Diffraction aux rayons X

La détermination de structure des cristaux isolés de *Physalis angulata* est faite en collaboration avec le département de chimie dirigé par le professeur Luc Van MEERVEELT de KUL au moyen d'un diffractomètre (Bruker SMART 6000 CCD Diffractometer) muni d'une source de radiation, d'un détecteur de résolution et d'un correcteur d'absorption multi-scan (SADAB Bruker).

V.7. Tests pharmacologiques

V.7.1. Tests antiplasmodiaux *in vitro*

Ces tests sont réalisés au laboratoire de pharmacognosie (département de pharmacie) de l'Ulg. L'évaluation de l'inhibition de la prolifération parasitaire érythrocytaire est faite par colorimétrie en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase plasmodiale.

L'activité des extraits bruts ou des composés purs testés *in vitro* sur le *P. falciparum* est exprimée en concentration inhibitrice 50 (ou CI₅₀), en anglais IC₅₀ (c'est la concentration nécessaire d'un extrait ou d'un composé pour réduire de 50% la croissance d'une population de parasites et elle est exprimée en µg/ml pour les extraits bruts et en µM ou nM pour les composés purs.

Suite aux recommandations de l'OMS et aux résultats obtenus par nos prédécesseurs dans plusieurs criblages antiplasmodiaux sur des extraits de plantes et des composés purs (Jonville

et al., 2009, Bero et al., 2009; 2011; Frédérick et al., 2001), l'activité antiplasmodiale des extraits et des composés purs est classifiée comme suit:

Tableau V.3: Classification de l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes et des composés purs isolés.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml ou µM)	Classification
Bruts (µg/ml)	>50	Inactif
	15 < IC ₅₀ < 50	Activité modérée
	5 < IC ₅₀ < 15	Actif
	< 5	Très actif
Composés purs (µM)	> 50	Inactif
	11 < IC ₅₀ < 50	Composé peu actif
	2 < IC ₅₀ < 11	Composé actif
	< 1	Composé très actif (<i>lead compound</i>)

V.7.1.1. Souches de *Plasmodium falciparum*

Dans nos tests, nous avons utilisé deux souches de *P. falciparum*:

- La souche 3D7 (souche chloroquino- sensible), originaire de l'Afrique de l'Ouest, obtenue de Mr le Pr Grellier du Muséum d'histoire naturelle de Paris. Dans nos conditions de travail, la CI₅₀ moyenne de la chloroquine pour cette souche varie entre 0,020 – 0,025 µM ;
- La souche W2 (souche chloroquino-résistante), originaire d'Indochine (Vietnam), c'est un clone de référence pour le programme de criblage des antipaludiques du Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, Washington), elle a été obtenue du Pr Le Bras de l'hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de parasitologie, Centre National de Référence de la chimio sensibilité du paludisme, Paris. Dans nos conditions expérimentales, la CI₅₀ moyenne de la chloroquine pour cette souche varie entre 0,7- 0,8 µM.

V.7.1.2. Culture de *Plasmodium falciparum*

La méthode de culture de *P. falciparum* mise au point par Trager et Jensen (1976), modifiée par Frédérick et al. en 2001, est utilisée pour la mise en culture continue de nos deux souches de *Plasmodium*. Les manipulations sont faites dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire verticale (Gera filtration technology).

Milieu de culture:

Du milieu stock est préparé par addition de glucose à 100 g/l (Sigma, D-9434) et d'hypoxanthine à 2,5g/l (Sigma) à 500 ml de milieu RPMI 1640 contenant 25mM d'HEPES et de 300 mg/l de L-glutamine (GIBCO 52400-041).

Pour préparer 200 ml du milieu de culture prêt à l'emploi ou milieu complet, nous ajoutons à 180 ml de milieu stock 20 ml de plasma humain du groupe A⁺ ou O⁺ (en provenance du centre de transfusion sanguine de la croix rouge de Belgique et préalablement décomplémenté à 56°C pendant 45 minutes et centrifugé à 3000-3700 tours/minutes pendant 5-10 minutes) et 0,4 ml de gentamycine (GIBCO, 50 mg/ml). Ce milieu est conservé à 4°C pendant 7- 14 jours.

Culture *in vitro*

Les parasites au stade érythrocytaire sont maintenus en culture à 37°C dans des globules rouges humains (centre de transfusion sanguine de la croix rouge de Belgique) sous une atmosphère de 5% CO₂, 5% O₂, et 90% N₂ dans des flacons de culture cellulaire stériles (Nunc WVR) de 25, 75, 175 cm² et fermant hermétiquement. L'hématocrite est maintenu à 3% et la culture est repiquée tous les 2 à 3 jours en fonction de la parasitémie désirée. La parasitémie est déterminée au moyen d'un frottis sanguin mince. Les frottis sont fixés pendant 3 minutes avec du réactif de May-Grünwald (Merck, 101424) ou avec du MeOH pur puis lavés à l'eau du robinet. Les lames subissent alors une seconde coloration au Giemsa (Merck, 109204) à 6% dans du tampon phosphate à pH= 7,4 (Sigma, P4417). Au cas où la fixation est faite par du MeOH, la coloration au Giemsa dure 30 minutes.

Les lames sont lues au microscope optique (ZEISS Axiolab) avec un objectif 100X, sous immersion. Les différentes souches de plasmodium peuvent être congelées et conservées à - 195,79°C dans l'azote liquide.

Synchronisation de *Plasmodium falciparum*

Cette technique a pour but de synchroniser les parasites dans un seul de leurs stades de développement, en l'occurrence le stade "jeune trophozoïte". La technique utilisée est celle mise au point par Lambros .C et Vanderberg JP (1979). Cette technique utilise le sorbitol (Merck ,107759) pour provoquer des modifications de pressions osmotiques internes et entrainer la lyse de la membrane des globules rouges infectés par le *plasmodium* au stade schizonte. On exploite alors la capacité de *Plasmodium* au stade schizonte mûr de perméabiliser la membrane cellulaire et de faciliter la pénétration de métabolites plasmatiques rendant ainsi la cellule sensible à la plasmolyse. Seules les formes trophozoïtes ou jeunes anneaux survivent.

La technique exige, en outre, une culture à une parasitémie d'au moins 5% où la forme trophozoïte est majoritaire. La culture est tout d'abord centrifugée à 2000 tours/minutes pendant 5minutes. A un volume égal de surnageant, on ajoute un volume de sorbitol 5% P/V dans l'eau distillée stérile. Le flacon de culture est alors incubé pendant 10 minutes à température ambiante en remuant de temps en temps. Après centrifugation, le culot est lavé au moins 3 fois avec du milieu RPMI 1640 prêt à l'emploi et ajusté à la fin à un hématoците de 5 %.

V.7.1.3. Tests de chimiosensibilité ou évaluation de l'activité antiplasmodiale in vitro

Les extraits et/ou les composés purs (1 mg) sont dissous dans 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich D- 4540) ou du MeOH pour donner une solution de 10 mg/ml qui est ensuite diluée 10X avec du milieu de culture prêt à l'emploi pour donner une solution à 1 mg/ml (concentration finale de DMSO ou MeOH: 10 %). Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits (Nunc, 167008). Chaque extrait ou composé pur est testé en double et à 8 concentrations finales allant de 100 µg/ml à 0,045µg/ml (concentrations préparées par dilutions successives de 3 en 3 ou 1/3). La parasitémie est de 2 % et l'hématoците de 1%. L'artémisinine, 98% (Sigma), la chloroquine diphosphate (Sigma, C6628) et la quinine, 90% (Sigma) sont utilisés comme substances de référence. Des globules rouges infectés sont utilisés comme témoin positif de croissance et des hématies non parasitées sont également utilisées comme témoin négatif (blanc). La plaque est incubée pendant 48 heures à 37°C dans

une boîte à culture hermétiquement fermée imprégnée d'un sachet de gaz Genbox microaer (Biomérieux, 96125) générant un milieu microaérobie.

La mesure de l'inhibition de la prolifération parasitaire ou détermination de l'IC₅₀ est réalisée grâce à une méthode colorimétrique exploitant la lactate déshydrogénase (LDH) du *P. falciparum*. Celle-ci a été mise au point par Delhaes et al, en 1999, et est appelée *microculture tetrazolium assay* (MTA); c'est une méthode dérivée de celle de Makler et al, décrite en 1993.

L'essai est basé sur le fait que la lactate déshydrogénase plasmodiale a la capacité d'utiliser l'APAD (3-acétylpyridine adénine dinucléotide) comme coenzyme dans la transformation de lactate en pyruvate alors que cette réaction est très lentement réalisée par la lactate déshydrogénase humaine (de l'ordre de 300 fois moins) en présence de ce même coenzyme (Makler M.; Hinrichs D., 1993).

Après 48 heures, les plaques à 96 puits sont congelées pendant plus ou moins 24 heures puis décongelées à 37 °C pendant 45 minutes. Après homogénéisation, 20 µl de chaque puit sont transférés dans une nouvelle plaque à 96 puits et additionnés de 100 µl de la solution I composée de:

- Lithium lactate (Sigma, L2250) : 1 g
- Saponine (Merck, A18820) : 10 mg
- APAD (Sigma, A5251) : 50 mg
- Triton-X 100 (sigma X-100) : 1 ml
- Tampon tris PH 8(Sigma,T6664) : 100 ml

La nouvelle plaque multipuits est remplacée à nouveau à 37°C pendant 15 minutes puis additionnée de 20 µl du mélange à parties égales de la solution II (PES: phénazine éthosulfate (sigma, P4554) à 0,1mg/ml dans du tampon Tris pH 8) et de la solution III (NTB: *nitrotetrazolium blue chloride*, (Sigma, N6639) à 2mg/ml dans de l'eau distillée). La plaque est encore incubée à 37°C pendant 30-45 minutes, puis la lecture de chaque puits est faite à 630 nm au moyen d'un spectrophotomètre (stat Fax 2100). Pendant la réaction, le sel de bleu de tétrazolium (transparent) est transformé en un dérivé bleu (le formazan) et c'est l'intensité de coloration de ce dernier qui est mesurée au spectrophotomètre à 630 nm. L'intensité de

coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu réactionnel et donc à la quantité de parasites.

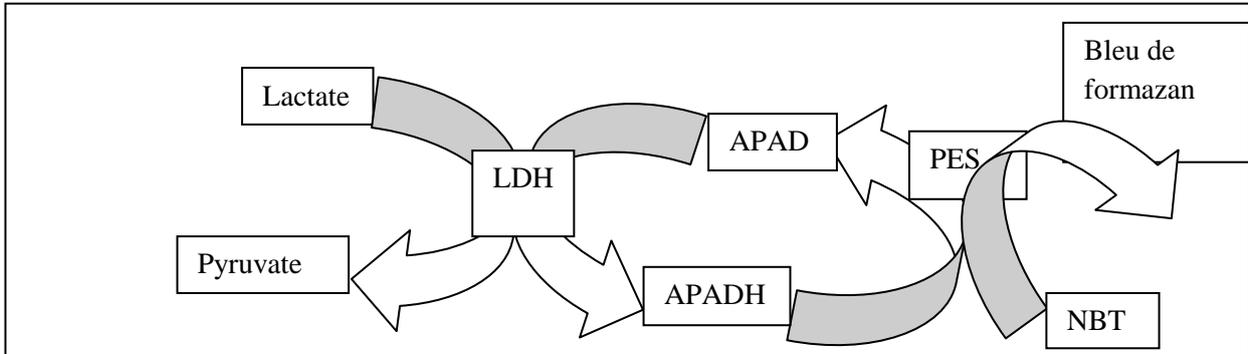


Figure V.1: Réaction de la transformation de pyruvate et formation de bleu de formazan

V.7.2. Test antiplasmodial *ex-vivo* (*in vitro*)

V.7.2.1. Principe du test

Le test est dit *ex-vivo* par le fait qu'on utilise du sang humain impaludé et non une souche isolée de *Plasmodium falciparum* comme dans la méthode décrite précédemment, c'est une méthode de criblage préliminaire de nos plantes sélectionnées après étude ethnobotanique.

La méthode utilisée est une variante de la méthode de culture de *P. falciparum* de Trager et Jensen (1976) décrite ci-dessus. Dans cette méthode, décrite par Tona et al., en 1999, le *Plasmodium* provenant de sang impaludé est mis en culture au même moment que les extraits de plantes.

Le sang veineux impaludé (± 3 ml) est obtenu des patients en ambulatoire atteints du paludisme à *Plasmodium falciparum* (après examen microscopique positif de leur goutte épaisse colorée au Giemsa) au centre Hospitalier de Kindele (commune de Mont- ngafula); au centre hospitalier du Mont-Amba (commune de Lemba) et à l'hôpital des sœurs de Kingasani (commune de Kimbanseke). Ces centres ont été choisis car ils sont localisés dans des zones à haute fréquence de paludisme dans la ville de Kinshasa. Les patients donateurs ne devaient pas avoir pris un antipaludéen deux semaines avant la manifestation de la maladie et devaient présenter une goutte épaisse positive avec en moyenne 1000 - 100000 trophozoïtes /mm³.

V.7.2.2. Préparation du milieu de culture RPMI 1640 (milieu stock) et des extraits

Le milieu utilisé est du RPMI 1640 solide (+ HEPES, + L-glutamine, sans NaHCO₃, Sigma – Aldrich R4130). 1g de RPMI 1640 est dissous dans un litre d'eau stérile sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète de la poudre. Le pH est alors ajusté à 7,2 par NaOH 1M ou HCl 1M. On y ajoute 2,0 g de NaHCO₃ sous agitation magnétique avant une filtration stérilisante finale sous hotte à flux laminaire à l'aide d'un filtre Nalgène (158-0020).

Les extraits sont préparés dans le mélange EtOH-H₂O (4/1) et les différentes dilutions sont faites afin d'obtenir une concentration de 200µg/ml dans les premiers puits après mélange avec le sang impaludé / le milieu stock.

V.7.2.3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale

Les extraits sont testés en double à raison de 8 concentrations (200 µg/ml – 1,56 µg/ml) préparées par dilutions de deux en deux (1/2). La quinine est utilisée comme substance de référence et le sang impaludé comme témoin positif de croissance. Le test est réalisé en triplicata.

50µl de chaque échantillon sont déposés dans les plaques à 96 puits et évaporés à sec à 37°C dans un incubateur. On y ajoute 50µl ou 100µl du mélange milieu de culture RPMI 1640 + sang impaludé 9 / 1. Une fois que les contenus de différents puits sont homogénéisés, les plaques sont placées dans une cloche à bougie puis à l'incubateur pendant 48 heures à 37°C.

L'évaluation du test est basée sur l'inhibition de la maturation des trophozoïtes en schizontes. Durant l'expérience, on évalue la capacité des extraits à empêcher la maturation des trophozoïtes en schizontes et on l'exprime en pourcentage d'inhibition comparativement au témoin positif (0 % d'inhibition, 100 % de maturation).

Après 48 heures, les plaques à 96 puits sont congelées et 24 heures après décongelées. Après homogénéisation du contenu de chaque puits, 20µl sont placés sur une lame porte objet pour préparer une goutte épaisse qui est fixée au May-Grünwald ou au MeOH puis colorée au Giemsa 6% dans du tampon phosphate et lue au microscope à l'objectif 100X. Les parasites sont comptés dans au moins 20 champs microscopiques par rapport à 200 érythrocytes.

L'expression des résultats se fait par rapport au témoin positif qui donne l'indication réelle de la maturation en schizontes. En pratique, le nombre de schizontes à deux noyaux ou plus, par rapport à 200 parasites asexués observés au microscope sont notifiés.

Le calcul se fait de la manière suivante :

$$\% \text{ }^{\text{age}} \text{ de maturation } Z = (X / Y) \times 100$$

$$\% \text{ }^{\text{age}} \text{ d'inhibition } P = 100 - Z$$

Soit :

- X: le nombre de schizontes pour 200 parasites, pour l'extrait à la concentration considérée;
- Y: le nombre de schizontes pour 200 parasites, pour le témoin positif.

V.7.3. Test de cytotoxicité *in vitro*

La lignée cellulaire WI-38 de fibroblastes humains immortalisés (poumons) est utilisée dans la réalisation de ce test. Elle est mise en culture à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% (76% d'azote et 19 % d'oxygène) d'humidité dans de flacon approprié pour la culture cellulaire. Le milieu de culture utilisée est le DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium LONZA) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) décomplémenté, de 1% de L-glutamine (200 mM, LONZA) et de 1% du mélange pénicilline - streptomycine (100UI/ml et 100 µg /ml, respectivement - LONZA).

Des repiquages sont réalisés toutes les 72 à 120 heures en fonction du nombre de cellules. Celles-ci sont comptées au moyen d'une cellule de Thomas (après étalement de 20 µl d'un mélange homogène (1:1) de bleu de trypan (0,4%) et de suspension cellulaire).

Les cellules de la lignée (WI-38) sontensemencées dans des plaques à 96 puits en raison 8000 cellules/200µl/puits. Après 24 heures d'incubation, temps nécessaire pour favoriser l'adhésion cellulaire dans les puits, l'ancien milieu est remplacé par des concentrations croissantes des différents extraits afin d'obtenir des concentrations allant de 100 µg/ml à 0,41 µg/ml. La camptothécine (Sigma, C9911) est utilisée comme substance de référence (25µg/ml-0,25ng/ml).

Après 48 heures d'incubation, l'évaluation de la viabilité cellulaire est mesurée par la méthode colorimétrique classique qui se base sur le clivage du sel de tétrazolium (WST-1,

Roche) par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables formant ainsi un colorant azoïque, le formazan (Figure V.2) (Stévigny et al., 2002).

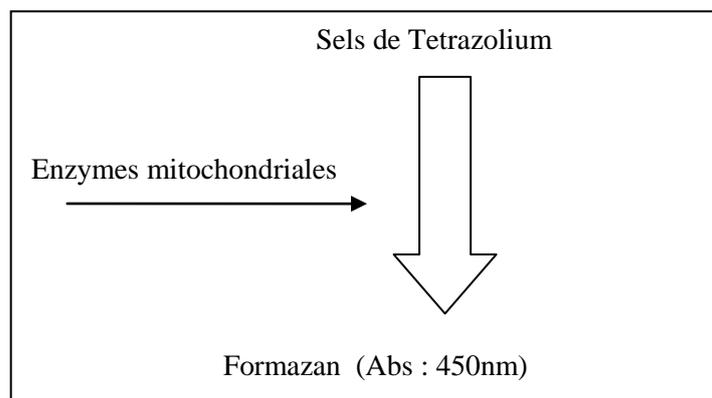


Figure V.2: Réaction de formation du formazan

En bref, le milieu de culture est remplacé par 200µl de solution contenant 1ml de WST-1 et 9ml de DMEM et les plaques sont incubées pendant 30-45 minutes à 37°C. L'absorbance est mesurée à 450 nm au moyen d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer Wallac Victor² TM 1420 Multilabel Counter).

Les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice 50 ou CI₅₀ (concentration de l'extrait ou du composé pur capable d'inhiber 50% de la prolifération cellulaire).

La CI₅₀ est déterminée par régression linéaire. Le rapport CI₅₀ cytotoxicité/CI₅₀ antiplasmodial donne une idée de l'index de sélectivité antiplasmodial de l'extrait testé. Plus la valeur de cet index est élevée, plus l'extrait possède une action sélective sur le plasmodium.

V.7.4. Test d'hémolyse *in vitro*

Le but de ce test est de déterminer si l'activité antiplasmodiale observée *in vitro* n'est pas liée à une simple hémolyse des globules rouges. Dans ce test, nous utilisons des hématies humaines à un hématocrite de 10 % dans du PBS. Chaque produit ou témoin est testé en triplicata.

Une solution mère de chaque échantillon à tester est préparée par dissolution de 1 mg dans 100 µl de DMSO afin d'avoir une concentration de 10mg/ml qu'on dilue ensuite 5 X dans du PBS pour obtenir une solution finale 2mg/ml (solution stock).

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml on place :

- 10 µl de la solution stock + 190 µl de GR à 10%

- 10 µl de DMSO + 190 µl de GR à 10% (blanc)
- 10 µl de triton- X + 190 µl de GR à 10% (témoin positif)
- 10 µl de PBS + 190 µl de GR à 10 % (témoin négatif)

Les eppendorfs préparés sont incubés à température ambiante pendant une heure sous agitation lente à 300 rpm et 22 °C. Après incubation, les eppendorfs sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 min, 150µl de surnageant sont prélevés et placés dans une plaque à 96 puits et les absorbances sont lues à 492 nm, 550 nm et 570 nm.

Pour évaluer l'hémolyse des échantillons, la formule suivante est utilisée (A = Absorbance):

$$\% \text{ hémolyse} = \frac{A(\text{échantillon}) - A(\text{blanc})}{A(\text{témoin positif}) - A(\text{témoin négatif})} * 100$$

V.7.5. Tests *in vivo*

Nous avons réalisé *in vivo* sur souris infectées par *Plasmodium berghei berghei* le test d'activité antiplasmodiale et sur des rats, des essais de toxicité aigue qui ont abouti à la détermination de la dose létale 100 (DL₁₀₀) et de la dose létale 50 (DL₅₀) ainsi qu'à la vérification de quelques paramètres biochimiques et hématologiques sur les rats ayant survécu (en comparaison de rats non traités).

V.7.5.1. Test antiplasmodial *in vivo*

Pour ce test, nous avons utilisé la méthode mise au point par David A. Fidock et al. (2004) et une variante décrite par Tona et al. en 2001. C'est le test préliminaire *in vivo* d'évaluation de l'efficacité de composés antipaludiques et d'extraits à propriétés antipaludiques dit: « *rodent malaria four days suppressive test* ». Test de Peters (Peters et al., 1975)

Les tests ont été réalisés sur des souris femelles NMRI, de poids moyen 23,9 g ± 4,2 g provenant de l'animalerie de l'Institut National de Recherches Biomédicales (INRB) de Kinshasa et sur des souris Swiss de poids moyen 22,5 g ± 3.1 g du Laboratoire Charles River de Bruxelles. Les souris ont été acclimatées pendant une semaine dans des cages en plastique avec des grilles en inox, à la température de 25-28°C et avec respect de la photo-périodicité. Elles ont alors été infestées par le *Plasmodium berghei berghei*. Pour les souris NMRI, le jour 4, après vérification de la parasitémie, chaque extrait (dissous dans le mélange Eau – (EtOH –

Tween 80): 9/ (0,3+0,7)) a été administré par voie orale à la dose de 300mg/kg et pour des souris Swiss, 4 heures après infestation, la dose de 400 mg/kg a été administrée par la même voie et ce pendant 4 jours pour les deux types (J4-J7 et J0-J4). Des frottis sanguins ont alors été réalisés à partir de sang prélevé au niveau de la veine caudale aux J8 à J14 (NMRI) et J5 à J14 (Swiss). La chloroquine et la quinine ont été utilisées comme témoins positifs et le sérum physiologique comme témoin négatif.

L'activité des extraits est déterminée par le % d'inhibition de la parasitémie comparativement aux témoins non traités par la formule suivante:

$$\%age\ d'inhibition = 100 - \left(\frac{\text{parasitémie moyenne souris traitées}}{\text{Parasitémie moyenne témoins négatifs}} * 100 \right)$$

Le test du *t*-Student a été utilisé afin de prouver l'existence ou non d'une différence significative entre les groupes traités et non traités en fixant une valeur de $P \leq 0,05$ (logiciel STATISTICA, version 10).

V.4.2.2. Toxicité *in vivo*

La méthode utilisée est celle décrite par Hilaly et al. en 2004, Mesia et al. en 2005 et Ahmed et al. en 2010. Des rats wistar mâles ($134,3g \pm 5.6g$) et femelles ($128,3g \pm 7.4g$) de l'animalerie de l'INRB de Kinshasa (Institut National de Recherches Biomédicales) ont été utilisés. Avant le début de l'expérimentation, ils ont été répartis séparément dans différentes cages en plastique (5/cage) et acclimatés pendant une semaine ($24-28^{\circ}C$, photopériode de 8-16h). Après administration d'une dose unique d'extrait aqueux des plantes (selon les directives de l'OCDE en 2000 et 2001 et du CCPA en 1993), les paramètres suivants ont été mesurés:

- l'alimentation (nourriture et eau),
- le poids,
- la chute des poils,
- la respiration,
- le comportement physique.

A la fin de l'expérience les survivants sont euthanasiés par dislocation cervicale et un prélèvement sanguin est réalisé au niveau cardiaque afin de mesurer les différents paramètres hématologiques et biochimiques qui pourraient subir ou non de modifications.

Détermination de la dose létale 100 (DL₁₀₀)

Les rats ont été mis en jeun un jour avant l'administration des extraits et bien avant l'administration des extraits (par voie orale), ils ont été pesés afin de calculer la dose exacte à administrer à chacun d'entre eux. 110 rats ont été repartis de façon homogène à raison de 55 mâles et 55 femelles (5/cage/sexe) en fonction de différentes doses à administrer qui varient entre 1 à 15 g/kg)

Durant l'observation (14 jours), le nombre de décès par cage et par dose est enregistré afin de déterminer la dose létale 100 (qui est celle qui tue 100% d'animaux soumis à l'expérimentation).

Détermination de la dose létale 50 (DL₅₀)

La dose létale 50 correspond à la dose qui tue 50% des animaux soumis à l'expérimentation toxicologique. Dans notre cas, nous avons évalué la DL₅₀ des extraits aqueux d'*Anisopappus chinensis* et *Physalis angulata* sur des rats mâles et femelles qui ont été repartis par groupe de 10 en fonction du sexe et des différentes doses à administrer. Après administration de l'extrait et observation pendant 14 jours, nous avons enregistré le nombre de décès dans chaque groupe. La DL₅₀ est déterminée par régression linéaire, selon la méthode des moindres carrés et le logiciel JMP version 5.1, SAS a été utilisé en vue de choisir le modèle de régression adéquat.

Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques

Les rats ayant survécu après 14 jours ont été sacrifiés comme décrit ci-dessus et du sang a été prélevé. Les échantillons analysés sont prélevés chez des animaux à jeun pendant au moins 12 heures. Les tests statistiques du t de Student et de Dunnet ont été utilisés pour vérifier la significativité des résultats.

Dosage des enzymes hépatiques

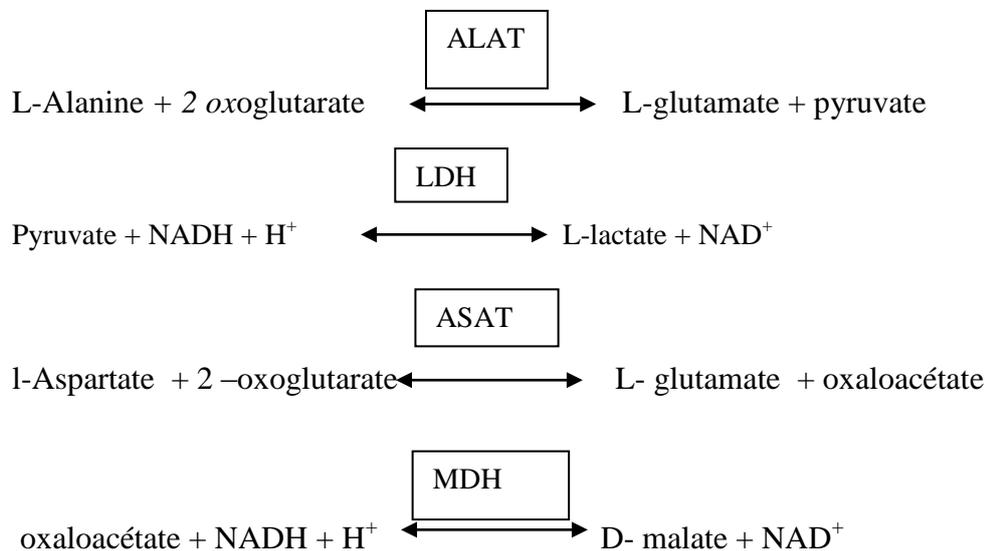
Les transaminases (ALAT ou GPT) et les amino transférases (ASAT ou GOT) ont été dosées dans les échantillons sanguins de rats traités et non traités. La méthode utilisée est le test UV optimisé selon les recommandations de L'IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) en partie modifié (Thomas, 1998; Moss, 1999; Schumann, 2002; Guder, 2001). Le dosage a été réalisé au laboratoire de biologie clinique des Cliniques universitaires de

Kinshasa à l'aide d'un kit DiaSys diagnostic systems GmbH (65558) en utilisant une mesure spectrophotométrique à 340 nm.

La substance dont on mesure, la vitesse de disparition ou d'apparition doit posséder une propriété spectrale spécifique dans l'ultra-violet ou dans le visible. Le couple NAD/NADH₂ ou NADP/NADPH₂ est couramment utilisé et le spectre d'absorption présente deux bandes dont l'une à 340nm.

Si la réaction évolue dans le sens de la réduction de NAD⁺, la densité optique augmente à l'inverse, si elle évolue dans le sens de l'oxydation du NAD⁺, la densité optique diminue

- Principe du test:



La vitesse de consommation de NADH est déterminée par spectrophotométrie et celle-ci est directement proportionnelle à l'activité des enzymes ALAT et ASAT dans l'échantillon. Les valeurs sont présentées en UI/L.

Dosage des paramètres hématologiques

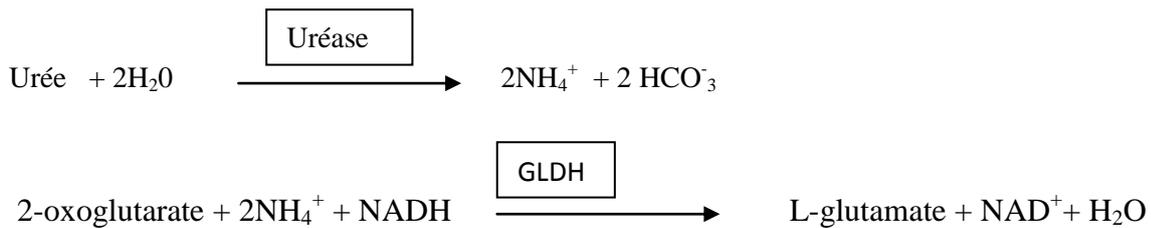
- Dosage de la créatinine

La créatinine est un produit d'hydrolyse de la créatine dont l'élimination se passe au niveau rénal par filtration glomérulaire. Le dosage dans le sang se fait par test cinétique selon la méthode modifiée de Jaffé (Junge et al., 2004). En présence de l'acide picrique et en solution alcaline, il se forme un complexe coloré rouge - orange, la variation d'absorbance de ce

complexe mesurée à des temps déterminés est proportionnelle à la concentration de la créatinine. La mesure se fait à 492 nm (490 -510nm). Les résultats sont exprimés en mg/dl.

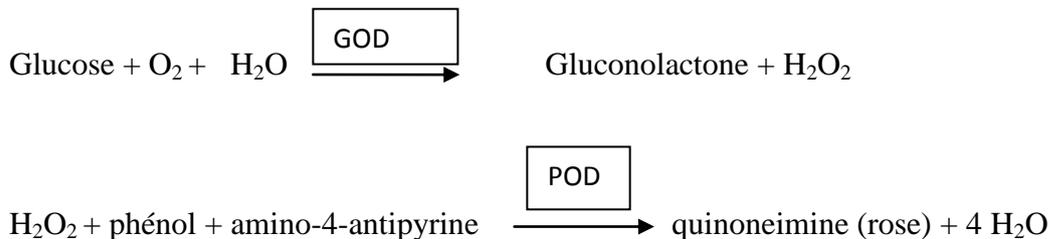
- Dosage de l'urée

C'est un produit azoté final du catabolisme protéique, le dosage se fait par test enzymatique utilisant l'uréase- glutamate déshydrogénase et une mesure spectrophotométrique à 340nm. Les résultats sont présentés en mg/dl.



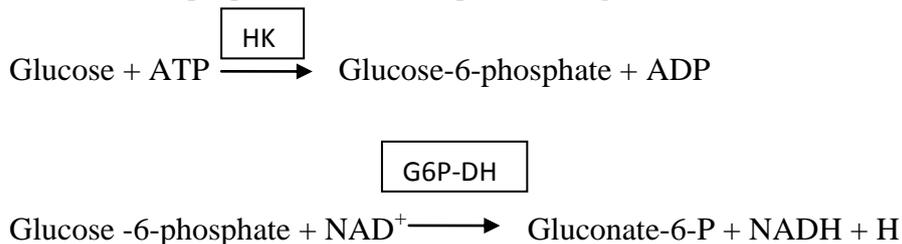
- Dosage du glucose

Méthode 1: Le glucose est oxydé en gluconolactone et en peroxyde d'hydrogène sous l'action de la glucose oxydase (GOD). Le peroxyde d'hydrogène résultant est détecté par une réaction avec le phénol et l' amino-4-antipyrine en présence de peroxydase (POD).



L'intensité de la coloration (de la quinoneimine) est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon. L'absorbance est prise à 340 nm et les résultats sont exprimés en mg/dl.

Méthode 2: on exploite l'action de l'hexokinase (HK) et on dose le NADH produit dont la concentration est proportionnelle à la quantité de glucose dans l'échantillon:



- Dosage de l'Hémoglobine (Hb)

La méthode utilisée exploite le réactif de Drabkin (ferricyanure de potassium + cyanure de potassium), appelée aussi méthode à la cyanométhémoglobine. En présence de ferricyanure de potassium, l'Hb est oxydée en méthémoglobine. La méthémoglobine en présence de cyanure de potassium donne la cyanométhémoglobine dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration de l'hémoglobine dans l'échantillon. La lecture se fait à 540nm, les résultats sont exprimés en g /dl.



**CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherches du service de Pharmacognosie de l'Université de Liège dont l'objectif principal est la découverte de nouvelles molécules à partir d'espèces végétales, en particulier dans le domaine antipaludique. Il a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, de l'Université de Kinshasa (République Démocratique du Congo). La grande biodiversité végétale de ce pays nous a permis d'étudier différentes plantes à potentiel antipaludique et d'en isoler pour la première fois divers métabolites secondaires.

La première partie de ce travail a consisté en une enquête ethnobotanique nécessaire non seulement à la récolte de plantes mais aussi à la collecte des savoirs en vue de leur utilisation. Cela a été effectué auprès des populations congolaises de 7 provinces (Bandundu, Bas-Congo, Equateur, Kasai-Oriental, Katanga, Kinshasa, Maniema). Suite à cette enquête ethnobotanique cinq plantes utilisées en médecine traditionnelle congolaise dans le traitement de la fièvre, de la malaria, des céphalées, de l'inflammation ont été sélectionnées: *Anisopappus chinensis* Hook & Arn., *Entandrophragma palustre* Staner, *Melia azedarach* L., *Physalis angulata* L., *Strychnos icaja* Baill.

Un criblage antiplasmodial *in vitro* des différents extraits a été réalisé sur les souches chloroquino-sensible et chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (3D7 et W2) Il a permis de sélectionner deux de ces cinq plantes qui se sont révélées particulièrement actives et qui n'avaient pas encore été étudiées sur le paludisme. Il s'agit d'*Anisopappus chinensis* (Asteraceae) et de *Physalis angulata* (Solanaceae). L'activité antiplasmodiale *in vitro* de ces deux plantes a été confirmée par un test *in vivo* sur des souris femelles NMRI et SWISS infestées par le *Plasmodium berghei berghei*. Des essais de cytotoxicité *in vitro* sur des fibroblastes de poumons humains (souche, WI-38) ainsi que la mesure de la dose létale 50 sur rats wistars mâles et femelles (> 5g/kg pour les deux plantes) ont été réalisés.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude phytochimique approfondie des deux plantes sélectionnées. L'étude phytochimique de l'extrait dichlorométhane d'*Anisopappus chinensis* à activité antipaludique intéressante, a abouti à l'identification ainsi qu'à la purification et à l'isolement d'acide linoléique, de deux diterpènes du type clérodane et de deux flavonoïdes méthoxylés (tri et tetraméthoxyflavones). Tous ces composés sont identifiés pour la première fois dans la plante. Par ailleurs, l'étude de l'extrait méthanolique

nous a permis d'identifier divers acides phénols et de mettre en évidence la présence de flavonoïdes sous forme hétérosides.

La détermination des structures de ces différentes molécules a été possible grâce à la RMN, la LC-MS/MS-MS et la LC-SPE-RMN. Ces composés testés *in vitro* sur la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* présentent une activité modérée de 97,3 μM pour l'acide linoléique, de respectivement 22 et 30 μM pour les tri et tétraméthoxyflavones et enfin de 18,6 et 20,4 μM pour les clérodanes diterpéniques. Vu ces résultats, nous pensons que l'activité antipaludique de la plante serait due à plusieurs composés agissant de façon synergique.

Concernant *Physalis angulata*, l'étude phytochimique de l'extrait dichlorométhane des tiges feuillées de la plante dont nous avons pu confirmer l'activité antiplasmodiale, nous a permis d'isoler deux séco-stéroïdes: la Physaline B et la 5 β -6 β epoxyphysaline B. La détermination des structures a été possible grâce à la cristallographie (diffraction aux rayons X). Tous deux présentent une activité antiplasmodiale très intéressante ($\text{IC}_{50} < 2 \mu\text{M}$). Leur cytotoxicité *in vitro* a été déterminée ($\text{IS} < 5$). Ces composés sont bel et bien responsables de l'activité antipaludique de la plante.

Pour la poursuite de nos investigations sur ces deux plantes, nous pensons nous consacrer plus particulièrement à *A. chinensis* qui jusqu'à présent, n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études phytochimiques et pharmacologiques. Cela nous permettra peut-être d'isoler d'autres métabolites secondaires participant à l'activité de cette plante. Nous pensons également continuer la purification et l'isolement des flavonoïdes afin de compléter les analyses RMN et de déterminer avec précision la structure de la tétraméthoxyflavone.

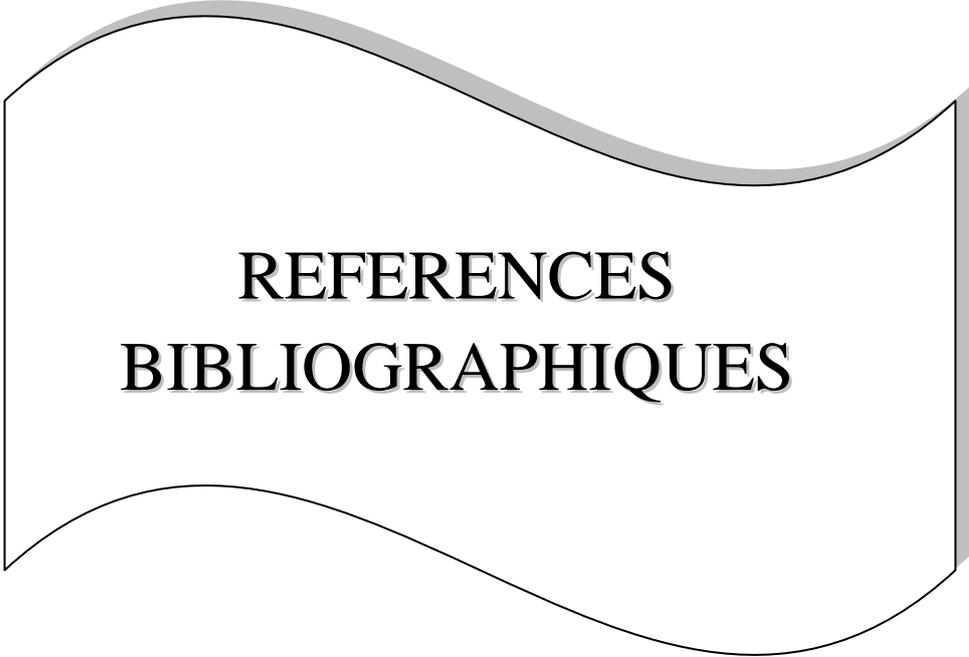
L'activité antiplasmodiale *in vitro* et *in vivo* ainsi que les essais de cytotoxicité *in vitro* et de toxicité *in vivo* de ces composés isolés seront effectués et si possible les modèles pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques seront définis.

Étant donné que plus de 80% de la population rurale africaine, en particulier congolaise, recourent aux plantes médicinales comme médicaments de première intention pour traiter des maladies notamment la malaria et que peu d'études pharmacologiques et phytochimiques sont entreprises sur ces dernières, nous souhaiterions standardiser les extraits d'*Anisopappus chinensis* et de *Physalis angulata* afin de mettre des médicaments traditionnels améliorés (MTA) efficaces et contrôlés au profit de la population. Ces plantes et éventuellement leurs

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

extraits pourraient aussi être intégrés dans les pharmacopées locales et dans le système des soins de santé primaires accessibles à toute la population.

Nous souhaiterons également entreprendre les études cliniques de phase I et phase II selon la nouvelle approche tout en s'appuyant sur l'ethnopharmacologie (Wilcox et al. 2004, 2011). Tout cela, sans oublier la formation continue du personnel soignant en phytothérapie et en phytovigilance.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, Fumiko., Nagafuji, Shinya., Okawa, Masafumi., Kinjo, Junei., 2006. Trypanocidal constituents in plants 6. Minor withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 54(8), 1226-1228.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., D'Alessandro, U., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. Malaria Journal, 10:144-155.
- Ahmed, F.Z.B., Merzouk, H., Bouanane, S., Benkalfat N.B., Merzouk, S.A., Mulengi, J.K., Narce, M., 2010. Evaluation de la toxicité aigue de la 2- hydroxyl-méthyl-1(N-phtaloytryptophyl) aziridine chez le rat Wistar. Annales de toxicologie analytique, 22 (3): 115-121.
- Akubue P.I., Mittal G.C., 1982. Clinical evaluation of a traditional herbal practice in Nigeria: a preliminary report. Journal of Ethnopharmacology, 6(3): 355-359.
- Amooru G. Damu, Ping-Chung Kuo, Chung-Ren Su, Tsung-Hsiao Kuo, Tzu-Hsuan Chen, Kenneth F. Bastow, Kuo-Hsiung Lee, and Tian-Shung Wu.2007. Isolation, Structures, and Structure–Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. Journal of Natural Products, 70 (7): 1146–1152.
- Ankrah, N.A., Nyarko, A.K., Addo, P.G.A., Ofosuhene, M., Dzokoto, C., Marley, E., Addae, M.M., Ekuban, F.A., 2003. Evaluation of efficacy and safety of a herbal medicine used for the treatment of malaria. Phytotherapy Research 17, 697–701.
- Banzouzi, J.T., Prado, R., Menan, H., Valentin, A., Roumestan, C., Mallie, M., Pelissier, Y., Blache, Y., 2002. In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. Journal of Ethnopharmacology, 81(3): 399-401.
- Bastos, G.N.T; Silveira A.J.A; Salgado, C.G; Picanco-Diniz D.L.W; Do Nascimento J.L.M., 2008. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. Journal of Ethnopharmacology, 118(2), 246-51.
- Bero J, Ganfon H., Jonville M.C, Frédéricich, M., Gbaguidi, F., DeMol, P., Moudachirou, M, Quetin-Leclercq, J., 2009. In vitro antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. Journal of Ethnopharmacology. 122(3):439-44.
- Bero, J., Frédéricich, M., Quetin-Leclercq, J., 2009. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. Journal of Pharm. Pharmacology. 61(11):1401-33.
- Bero, J., Quetin-Leclercq, J., 2011. Natural products published in 2009 from plants traditionally used to treat malaria. Planta Medica. 77(6):631-40. Review.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bjorkman, A., Phillips-howard P.A., 1990. The epidemiology of drug resistant malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiène*, 84:177-180.
- Bloland, P., 2001. Drug resistance in malaria. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4.
- Brasseur, P., Agnamey, P., Ekobo, A.S., Samba, G., Favennec, L., Kouamouo, J., 1995. Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine and chloroquine in central Africa: a comparative study in vivo and in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5):528-30.
- Brasseur, P., Guiguemde, R., Diallo, S., Guiyedi, V., Kombila, M., Ringwald, P., Olliaro, P., 1999. Amodiaquine remains effective for treating uncomplicated malaria in west and central Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(6):645-50.
- Braz. F.R. and Gottlieb O.R., 1971. The flavonoids of *Apuleia leiocarpa*. *Phytochemistry*, 10: 2433-2450.
- Bruce – Chwatt L.J., 1986a, *Essential malarialogy* London: William Heinnemann Medicals books.
- Brustolim Daniele; Vasconcelos Juliana F; Freitas Luiz Antonio R; Teixeira Mauro M; Farias Marcel T; Ribeiro Yvone M; Tomassini Therezinha C B; Oliveira Geraldo G S; Pontes-de-Carvalho Lain C; Ribeiro-dos-Santos Ricardo; et al., 2010. Activity of physalin F in a collagen-induced arthritis model. *Journal of Natural Products* 73(8): 1323-6.
- Carbonara, T., Pascale. R., Argentieri, M.P., Papadia, P., Fanizzi, F.P., Villanova, L., Avato, P., 2012. Phytochemicals analysis of a herbal tea from *Artemisia annua* L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 62, 79-86.
- Carter, R., Mendis, K.M., 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 15:564-594.
- Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C., Azambuja, P., Garcia, E.S., 2008. Immune depression in *Rhodnius prolixus* by seco-steroids, physalins. *Journal of Insect and Physiology*, 54(3):555-62.
- CCPA, Conseil Canadien de Protection des Animaux (1993) Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Ottawa. 1: 232–256.
- CDC, malaria 2011, centers for diseases control and prevention www.cdc.org 20/02/2012.
- Chen, N., Kyle, D.E., Pasay, C., Fowler, E.V., Baker, J., Peters, J.M., Cheng, Q., pfcrt Allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11):3500-5.
- Chin, W., Coatney, G.R., 1971. Relapse activity in sporozoite-induced infections with a West african strain of *Plasmodium ovale*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 20(6):825-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chitnis CE, Miller LH., 1994. Identification of the erythrocytes binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium Knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *Journal of Experimental Medicine* 180 (2) 497- 506.
- Christopher J.L, Murray, Lisa C., Rosenfeld, Stephen S., Lim, Kathryn G., Andrews, Kyle J., Foreman, Diana Haring., Nancy Fullman., Mohsen Naghavi., Rafael Lozano., Alan D. Lopez., 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet* 379 (9814): 413 – 431.
- Cimanga R.K, Tona, L., Luyindula, N., Mesia, K., Lusakibanza, M., Musuamba, C.T, Apers, S., De Bruyne, T., Van Miert, S., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2004. In *vitro* antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3):399-404.
- Cimanga, R.K., 1997. The biologically active constituents of two african Medicinal plants: *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl) Schelechter (Periplocaceae) and *Morinda morindoides* (Baker) Milne – redhead (Rubiaceae).Phd. Thesis, departement of pharmaceutical Sciences, University of Antwerp (UIA), Belgium.
- Colebunders, R., Bahwe, Y., Nekwei, W., Ryder, R., Perriens, J., Nsimba, K., Turner, A., Francis, H., Lebughe, I., Van der Stuyft, P., Piot, P., 1990. Incidence of malaria and efficacy of oral quinine in patients recently infected with human immunodeficiency virus in Kinshasa, Zaire. *Journal of Infectiology*, 21(2):167-173.
- Cordel, G.A., Quinn-Beattie, M.L., 2005. Unpublished results from Napralert database, University of Illinois at Chigago.
- Cox-Singh, J., Davis, T.M., Lee, K.S., Shamsul, S.S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H.A., Conway, D.J., Singh, B., 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infections Diseases*, 46(2):165-71.
- Cowman, A.F., Galatis, D., Thomson, J.K., 1994. Selection for mefloquine resisitance in plasmodium falciparum is linked to amplification of the pfmr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 1143-1147.
- Dahl, E.L., Rosenthal, P.J., 2007. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:3485-3490.
- D’Ambrosso, M., Guerriero,A., 2002. Degraded limonoids from *Melia azedarach* and biogenetic implications. *Phytochemistry*, 60: 419-424.
- Damu, A.G., Kuo, P.C., Su, C.R., Kuo, T.H., Chen, T.H., Bastow, K.F., Lee, K.H., Wu,T.S., 2007. Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70 (7): 1146–1152.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delacollette, C., Embonga, B., Malengugreau, M., 1983. Response to chloroquine of infections with *Plasmodium falciparum* in the Kivu region of Zaïre. Preliminary observations. *Annales de la société belge de Médecine tropicale*, 63: 171-181.
- Delhaes, L., Lazaro, J-E., Gay, F., Thellier, M., and Danis, M., 1999. The microculture tetrazolium assay (MTA): another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* chemosensitivity. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 93:31-40.
- Desowitz, R., Canfield, C., 1999. Milestones and millstones in the history of malaria In: Wahlgren M., perlam P. (ed.), malaria: molecular and clinical aspects, Harwood academic publishers Amsterdam, 1-16.
- De wildeman, E. 1939. Notes sur les plantes médicinales et alimentaires du Congo Belge, Bruxelles.
- Dondorp, A.M, Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arieu, F., Hanpithakpong, W., Lee, S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S.S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P., Lindegardh, N., Socheat, D., White, N.J., 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, 361(5):455- 67
- Dos santos, J. and Fleurentin, J., 1991. In *Ethnopharmacologie, sources, méthodes, objectifs*. Paris-Strasbourg: ORSTOM - SFE.
- Dorsey, G., Gandhi, M., Oyugi, H., Rosenthal, P.J., 2000. Difficulties in the prevention, diagnostics and treatment of imported malaria. *Archives of International Medicine* 160:2505-2510.
- Dousset J-C., 1985. *Histoire des médicaments des origines à nos jours*, Payot, Paris, 161-163.
- Duraisingh, M.T., Jones P., Sambou I., et al., 2000. The tyrosine-86 allele of the pfmdr 1 gene of *Plasmodium falciparum* is linked to the anti malarials mefloquine and artemisinin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108: 13-23.
- Eastman, R.T, Fidock, D.A. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12):864-74.
- Elufioye T.O., Agbedahunsi J.M., 2004. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 93(2-3):167-71.
- Eisenberg D.M., Davis R.B., Ettner S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., Kessler, R.C., 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *The Journal of American Medical Association*, 280(18):1569-75.
- Evans, W.C., 2002. An overview of drugs with antihepatotoxic and oral hypoglycaemic activities, in: Trease and Evans pharmacognosy (W.C. Evans, ed.), W.B. Saunders, Edinburgh, 414-420.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109: S69-S75.

Farooq Umar & Mahajan, R.C., 2004. Drug resistance in malaria. Review Article of the *Journal of Vector Borne Diseases*, 41: 45–53.

Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellem, T.E., 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6(4):861-71.

Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., Nwaka, S., 2004. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. *Nature reviews. Drug Discovery*, 3: 509–520.

Foley, M., Tilley, L., 1998. Quinolines antimalarials, mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology & therapeutics*, 79: 55- 87.

Frederich, M., De Pauw, M.C., Llabres, G., Tits, M., Hayette, M.P., Brandt, V., Penelle, J., De Mol, P., Angenot, L., 2000. New antimalarial and cytotoxic strychnine derivatives from *Strychnos icaja* roots. *Planta Medica*, 66: 262–269.

Frederich, M., De Pauw, M.C., Prospero, C., Tits, M., Brandt, V., Penelle, J., Hayette, M.P., DeMol, P., Angenot, L., 2001. Strychnogucines A and B, two new antiplasmodial bisindole alkaloids from *Strychnos icaja*. *Journal of Natural Products*, 64: 12–16.

Frederich, M., Hayette, M.P., Tits, M., DeMol, P., Angenot, L., 1999. In vitro activities of Strychnos alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2328–2331.

Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I, Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C, Carucci, D.J, Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M, Barrell, B., 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Nature*, 419 (6906): 498-511.

Garcia Eloi, S.; Castro Daniele, P.; Ribeiro Ivone, M.; Tomassini Therezinha, C. B.; Azambuja Patricia., 2006. *Trypanosoma rangeli*: effects of physalin B on the immune reactions of the infected larvae of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 112(1), 37-43.

Gaur D., Mayer, G., Miller L., 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International Journal of parasitology* 34, 1413-1429.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Giboda, M., Denis, MB., 1990. Response of kmpucuan strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: in vivo assesment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance in vitro. *Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 21: 205-21.
- Goodman, C.D., Su,V., McFadden G.I., 2007. The effects of antibacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical. Parasitology*, 152: 181-191.
- Grau, G.E., Taylor, T.E, Molyneux M.E., Wirima J.J., Vassalli, P., Hommel, M., Lambert, P.H., 1989. Tumor Necrosis Factor and Disease Severity in Children with *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*, 320 (24):1586-1591.
- Greenberg, A.E., Nsa, W., Ryder, RW., Medi, M., Nzeza, M., Kitadi, N., Baangi, M., Malanda N. Davachi., F.Hassig S.E.,1991. *Plasmodium Falciparum* malaria and prenatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection in Kinshasa, Zaire. A prospective, longitudinal cohort study of 587 children. *The New England Journal of Medicine*, 325(2):105-109.
- Greenwood B. Mutabingwa T., 2002. Malaria in 2002. *Nature*, 415: 670-672.
- Greenwood, B., Bojang, K., Whitty, C., Targett, G., 2005. Malaria. *Lancet* 365:1487-1498.
- Guder, WG., Zawta, B., Narayan, S., Wisser, H., 2001. *The quality of diagnostic samples*; 1st ed . Darmstadt: GIT Verlag 14-15; 18-19.
- Guerra, F., 1997. Notes on the early history of cinchonia plantations, *Acta Leidensia*, 55: 5-13.
- Guimaraes, Elisalva T., Lima, Milena S., Santos, Luana, A., Ribeiro, Ivone M., Tomassini, Therezinha B. C., Ribeiro dos Santos, Ricardo, dos Santos, Washington L. C., Soares, Milena B. P., 2009. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous *leishmaniasis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1): 84-87.
- Guimaraes, Elisalva T., Lima, Milena S.; Santos, Luana A., Ribeiro, Ivone M., Tomassini, Therezinha B. C., Ribeiro dos Santos, Ricardo., dos Santos, Washington L. C., Soares, Milena B. P., 2010. Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania sp.* *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6): 945-949.
- Gunatilaka A.A.L., Sirimanne, S.R., Sotheeswaran S., Sriyani H.T.B., 1982. Flavonoids of *Gardenia cramerii* and *G. fosbergii* bud exudates. *Phytochemistry*, 21(3): 805–806.
- Happi, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Bolaji, O.M., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., Oduola, AM., 2006. Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1):155-61.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Harinasuta, T., Bunnag, D., Lasserre, R., 1990. Quinine resistant *plasmodium falciparum* malaria treated with mefloquine. Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine and public health, 21: 552-557.
- Hay, S.I., Guerra, C.A., Tatem, A.J., Noor, A.M., Snow, R.W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. The Lancet Infectious diseases, 4: 327-336.
- He, Qing-Ping; Ma, Lei; Luo, Jie-Ying; He, Fu-Yuan; Lou, Li-Guang; Hu, Li-Hong., 2007. Cytotoxic withanolides *Physalis angulata* L. Chemistry & Biodiversity, 4(3): 443-449.
- Hilaly, J.E., Israili Z.H., Lyousst, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals Journal of Ethnopharmacology, 91 (2004) 43–50.
- Hinrichs, D., 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48: 205-210.
- Hostettmann K., Marson A., Hostettmann M., 1997. Preparative chromatography techniques. Applications in natural products isolation, 2^e éd., Springer, Berlin.
- Hseu You-Cheng; Wu Chi-Rei; Chang Hsueh-Wei; Kumar K J Senthil; Lin Ming-Kuem; Chen Chih-Sheng; Cho Hsin-Ju; Huang Chun-Yin; Huang Chih-Yang; Lee Hong-Zin; et al., 2011. Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. Journal of Ethnopharmacology, 135(3), 762-771.
- Hsieh, W.T., Huang, K.Y., Lin, H.Y., Chung, J.G., 2006. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology, 44: 974–983.
- Humphreys, G.S., Merinopoulos, I., Ahmed, J., Whitty, C.J., Mutabingwa, T.K., Sutherland, C.J., Hallett, R.L., 2007. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(3):991-7.
- Ismail, N.; Alam, M., 2001. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. Fitoterapia, 72(6): 676-679.
- Jambou, R., Martinelli, A., Pinto, J, Gribaldo, S., Legrand. E., Niang, M., Kim, N., Pharath, L., Volnay, B., Ekala, M.T., Bouchie,r C., Fandeur, T., Berzosa, P., Benito, A., Ferreira, I.D., Ferreira, C., Vieira, P.P., Alecrim, M.G., Mercereau-Puijalon, O., Cravo, P., 2010. Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (PfSERCA) gene diversity. PLoS One, 5(2): e9424.
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., et al., 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in vitro arthemeter and point mutations of the SERCA-type pfATPase. The Lancet, 366: 1960-1963.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Januario, A. H., Rodrigues Filho, E., Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., Franca, S. C., 2002. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, 16(5): 445-448.
- Jelinek, T., Schelbert, P., Löscher, T., Eichenlaub, D., 1995. Quinine resistant falciparum malaria acquired in East Africa. *Tropical Medicine and Parasitology*, 46: 38 - 40.
- Jin, Zhuang; Mashuta, Mark S.; Stolowich, Nea, I J.; Vaisberg, Abraham J.; Stivers, Nicole S.; Bates, Paula J.; Lewis, Walter H.; Hammond, Gerald B., 2012. Physangulidines A, B, and C: Three New Antiproliferative Withanolides from *Physalis angulata* L. *Organic Letters*, 14(5):1230-1233.
- Johnson, D.J, Fidock, D.A., Mungthin M., Lakshmanan, V., Sidhu, A.B., Bray, P.G., Ward, S.A., 2004. Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Molecular Cell*, 15(6):867-77.
- Jonathan A. Patz and Sarah H. Olson., 2006. Malaria risk and temperature: Influences from global climate change and local land uses practices *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15): 5635–5636.
- Jonville, M.C., Kodja, H., Humeau, L., Fournel, J., De Mol, P., Cao, M., Angenot, L., Frederich, M., 2008. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 382–386.
- Junge, W., Wilke, B., Halabi, A., Klein, G., 2004. Determination of reference creatinine intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with enzymatic and a modified jaffé method. *Clinica Chimica Acta*, 344: 137-14.
- Kambu K., 1990. *Eléments de phytothérapie comparée, plantes médicinales africaines* C.R.P Kinshasa.
- Kambu, K., Coune, C., Angenot, L., 1979. Nouveaux alcaloïdes des racines du *strychnos icaja* *Planta Medica* 37, 161-164.
- Kambu, K., 1988. *Médecine traditionnelle africaine*, C.R.P. Kinshasa.
- Kazadi W.M, Vong, S., Makina B.N, Mantshumba, J.C., Kabuya, W., Kebela, B.I., Ngimbi, N.P., 2003. Assessing the efficacy of chloroquine and sulfadoxine–pyrimethamine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Democratic Republic of Congo. *Tropical Medicine & International Health*, 8(10) 868-875.
- Khoo S. Back., D.Winstanley, P., 2005. The potential for the interactions between antimalarial and antiretroviral drugs. *AIDS*, 19(10): 995-1005.
- Kiszewski, A., Mellinger, Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S.E., Sachs, J., 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70 (5): 486-498.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kitwa, A.Y., Malebo, H.M., 2004. Malaria control in Africa and the role of traditional medicine, in: Wilcox, M., bodeker, G. and Rasoanaivo P. traditional Medecinal plants abd malaria. CRC Press, boca Raton, FL, 3-18.
- Kokai Tokkyo koho, 1986. Food improving blood glucose and blood pressure contzaining powder of aerial part of *Physalis angulata* L. and /or its extract, and its preparation method JP 61143324 A 19860701.(patent).
- Kraus Georges and Roy Sudipta., 2008. Direct Synthesis of Chrysosplenol D Journal of Natural Products, 71: 1961–1962.
- Krotoski, W.A., Garnham, P.C., Bray, R.S., Krotoski, D.M., Killick-Kendrick, R., Draper, C.C., Targett, G.A., Guy, M.W., 1982. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 31(1):24-35.
- Kuo, Ping-Chung; Kuo, Tsung-Hsiao; Damu, Amooru G.; Su, Chung-Ren; Lee, E-Jian; Wu, Tian-Shung; Shu, Rexen; Chen, Chou-Ming; Bastow, Kenneth F.; Chen, Tzu-Hsuan; et al.,2006. Physanolide A, a Novel Skeleton Steroid, and Other Cytotoxic Principles from *Physalis angulata* . Organic Letters, 8(14), 2953-2956.
- Kvist, L.R., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology, 106: 390–402.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronisation of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of parasitology, 65(3) : 418-420).
- Leaf A, 2007 Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown). Suppl 1:S27-9.
- Leaman, D.J., Arnasonj, J.T., Yusuf, R., Sangat-Roemantyo, H., Soedjito, H., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., 1995. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: a quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. Journal of Ethnopharmacology, 17; 49(1):1-16.
- Lee, K., Kim, TH., Kim, E.S., Lim, H.S., Yeom, J.S., Jun, G., 2009. Park JWShort report: chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea. American Journal of Tropical Medecine and Hygiene, 80 (2):215-7.
- Lee Shwu-Woan; Pan Min-Hsiung; Chen, Chiu-Ming; Chen Zong-Tsi., 2008. Withangulatin I, a new cytotoxic withanolide from *Physalis angulata*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 56(2): 234-236.
- Lee, H.-Z.; Liu, W.-Z.; Hsieh, W.-T.; Tang, F.-Y.; Chung, J.-G.; Leung, Henry W.-C., 2009. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. Food and Chemical Toxicology, 47(3), 561-570.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Legrand, E., Volney, B., Meynard, J.B., Esterre P., Mercereau-Puijalon, O., 2007. Resistance to dihydroartemisinin. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5):808-9.
- Li, Y., Huang, H., Wu, Y.L., 2006. Qinghaosu, (Artemisinin) a fantastic antimalarial drug from a traditional Chinese medicine, in: Liang, Fang (Eds.), *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*, 183–256.
- Lisowski, S. 1989. Flore d'Afrique Centrale (Zaire, Rwanda, Burundi, spermaphytes, Jardin Botanique National Belge.
- Luxemburger, C., McGready, R., Kham, A., Morison, L., Cho, T., Chongsuphajaisiddhi, T., White, N.J, Nosten, F., 2001. Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of low malaria transmission. *American Journal of Epidemiology*, 154 (5): 459-65.
- Luxemburger, C., Price, R.N, Nosten, F., Ter Kuile, F.O, Chongsuphajaisiddhi, T., White, N.J., 1996. Mefloquine in infants and young children. *Annals of Tropical Paediatrics*, 6 (4): 281-6.
- Mabika, K., 1983. Plantes médicinales et médecine traditionnelle au Kasai- occidental. Thèse de doctorat en sciences, option biologie, orientation ethnobotanique, Université de Kisangani, faculté des Sciences, département d'Ecologie et conservation de la nature.
- Magilu, M., Mbuyi, M., Ndjele, M.B., 1994. Use of medicinal plants among the pigmes (Mbutu) to treat malaria in the area of Mombassa, Ituri, Zaire. The biodiversity of African plants. Proceeding of the 14th AETFAT congress 22-27 august 1994, Wageningen.
- Maguire, J.D., Lacy, M.D., Sururi, Sismadi P., Krisin, Wiady I., Laksana B., Bangs M.J., Masbar, S., Susanti, I., Basuki, W., Barcus, M.J., Marwoto, H., Edstein M.D, Tjokrosonto, S., Baird, J.K., 2002. Chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria during an epidemic in Central Java, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96(7): 655-68.
- Mahady, G.B., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., 2001. Botanical dietary supplements; Quality safety and efficacy. Sweets & Zeitlinger BV. The Netherlands, 1-17.
- Makino, B., Kawai, M., Ogura, T., Nakanishi, M., Yamamura, H., Butsugan, Y., Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulata*. 1995. *Journal of Natural Products*, 58 (11) 1668-1674.
- Makler, M., Ries, J., Williams, J., Bancroft, J., Piper, R., Gibbons, B., Hinrichs, D., 1993. Parasite lactate deshydrogenase as an assay for *plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:739-741.
- Mavundza, E.J., Maharaj, R., Finnie, J.F., Kabera, G., Van Staden, J., 2011. An ethnobotanical survey of mosquito repellent plants in uMkhanyakude district, KwaZulu-Natal province, South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 137(3): 1516-20.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mbatchi, S.F., Mbatchi, B., Banzouzi, J.T., Bansimba, T., Nsonde Ntandou, G.F., Ouamba, J.M., Berry, A., Benoit-Vical, F., 2006. In vitro antiplasmodial activity of 18 plants used in Congo Brazzaville traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2): 168-74.
- McDermott, J.M., Wirima, J.J., Steketee, R.W., Breman, J.G., Heymann, D.L., 1996. The effects of placental malaria infection on perinatal mortality in rural Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene supplement*, 1: 61-65.
- 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(4): 244-8.
- Mesia, K., Cimanga, K., Tona, L., Mampunza, M.M., Ntamabyaliro, N., Muanda, T., Muyembe, T., Totté, J., Mets, T., Pieters, L., Vlietinck, A., 2011. Assessment of the short-term safety and tolerability of a quantified 80 % ethanol extract from the stem bark of *Nauclea pobeguinii* (PR 259 CT1) in healthy volunteers: a clinical phase I study. *Planta Medica*, 77(2): 111-6.
- Mesia, K., Tona, L., Mampunza, M.M., Ntamabyaliro, N., Muanda, T., Muyembe, T., Cimanga, K., Totté, J., Mets, T., Pieters, L., Vlietinck A.J., 2012. Antimalarial efficacy of a quantified extract of *Nauclea pobeguinii* stem bark in human adult volunteers with diagnosed uncomplicated falciparum malaria. Part 1: a clinical phase IIA trial. *Planta Medica*, 78(3): 211-8.
- Mesia, G.K, Tona, G.L, Nanga, T.H, Cimanga, R.K, Apers, S., Cos, P., Maes, L., Pieters, L., Vlietinck AJ., 2008. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3):409-15.
- Mesia Kahunu, 2009. Studies on the safety and efficacy of an oral standardized extract from *Nauclea pobeguinii* used in the treatment of uncomplicated malaria in the D.R.Congo. These de doctorat. University of Antwerp (UIA), Belgium.
- Mesia, G.K, Tona, G.L, Penge, O., Lusakibanza, M., Nanga, T.M., Cimanga, R.K., Apers, S., Van Miert, S., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck AJ., 2005. Antimalarial activities and toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo: *Croton mubango*, *Nauclea pobeguinii* and *Pyrenacantha staudtii*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(4): 345-57.
- Miller, L.H., Su X., 2011. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell*, 146: 855-858.
- Moss, D.W., Henderson, A.R., 1999. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz text Book of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company 617- 721.
- Mueller, I., Zimmerman, P.A., Reeder, J.C., 2007. *Plasmodium malariae* and *plasmodium ovale*, the bashful malaria parasites. *Trends in parasitology*. 23: 278-283.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mueller, M.S., Karhagomba, I.B., Hirt, H.M., Wemakor E., 2000. The potential of *Artemisia annua* L. as locally produced remedy for malaria in the tropics: Agricultural, chemical and clinical aspects. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 487–493.
- Mu, J., Ferdig, M.T., Feng, X., Joy D.A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R.A., Wootton, J.C., Xiong, M., Su, X.Z., 2003. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Molecular Microbiology*, 49(4): 977–89.
- Muregi, F.W., Chabra, S.C., Njagi, E.N.M., Lang’at-Thoruwa, C.C., Njue, W.M., Orago, A.S.S., Omar, S.A., Ndiege, I.O., 2004. Antiplasmodial activity of some Kenyan medicinal plant extracts singly and in combination with chloroquine. *Phytotherapy Research*, 18, 379–384.
- Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., Njagi E.N., 2007. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3):377-86.
- Nagafuji, Shinya., Okabe, Hikaru., Akahane, Hiroshige., Abe, Fumiko., 2004. Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27(2), 193-197.
- Nathan, S.S., Savitha, G., George, D.K., Narmadha, A., Suganya, L., Chung, P.G., 2006. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera: Culicidae*). *Bioresource Technology* 97, 1316–1323.
- Neuwinger HD. 1996. African ethnobotany. Poisons and drugs, Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Chapman et Hall, London, 569-578.
- Noedl, H., Schaecher, K., Smith, B.L., Socheat, D., Fukuda, M.M., 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *The New England Journal of Medicine* 359 (24):2619-2620.
- Nosten, F., McGready, R., Simpson, J.A, Thwai, K.L, Balkan, S., Cho T, Hkirijaroen L., Looareesuwan, S., White N.J., 1999. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *The Lancet*. 354(9178): 546-9.
- O'Brien, C., Henrich, P.P., Passi, N., Fidock, D.A., 2011. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(6): 570-7.
- OCDE. 2001. Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment, 24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OCDE. 2000. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment, 19.
- Okpekon, T., Yolou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F. Laurens, A., Hocquemiller, R., 2004. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1): 91-7.
- Olliario P.L., Taylor, W.R.J., 2003. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *Journal of Experimental Biology*, 206: 3753-3759. Review.
- Olliario, P., Nevill, C., LeBras, J., Ringwald, P., Mussano, P., Garner, P., Brasseur, P. 1996. Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet*, 348(9036): 1196-201.
- O.M.S (Organisation mondiale de la santé), 1978. promotion et développement de la médecine traditionnelle; séries de rapports techniques, 622, Genève.
- Orjih AU., 1997. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(1):108-12.
- Panero, J. L., Funk, V.A., 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: (in press).
- Pascual, M., Ahumada, A., Chaves, L.F., Rodo, X. and 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(15): 5829–5834.
- Peel, S.A., Bright, P., Yount, B., Handy, J., Baric, R.S., 1994. A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (pfmdr) of *Plasmodium falciparum in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(5): 648-58.
- Peters, W., Portus J.H. and Robinson, B.L., (1975). The chemotherapy of rodent malaria XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizonticidal activity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 69: 155-71.
- Philippe, G., De Mol, P., Angenot, L., Tits, M., Frederich, M., 2007. In vivo antimalarial activity of isosungucine, an inolonoterpenic alkaloid from *Strychnos icaja*. *Planta Medica*, 73: 478–479.
- Philippe, G., Angenot, L., Tits, M., Frederich, M., 2004. About the toxicity of some *Strychnos species* and their alkaloids. *Toxicon*. 44, 405–416.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pinto, N. B.; Morais, T. C.; Carvalho, K. M. B.; Silva, C. R.; Andrade, G. M.; Brito, G. A. C.; Veras, M. L.; Pessoa, O. D. L.; Rao, V. S.; Santos, F. A. 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine*, 17(10) : 740-743.

PNLP (programme national de lutte contre le paludisme), 2007. Faire reculer le paludisme, plan stratégique 2007-20011. Ministère de la santé publique de la République Démocratique du Congo.

PNLP (programme national de lutte contre le paludisme), 2001. Faire reculer le paludisme, plan stratégique 2000-2004. Ministère de la santé publique de la République Démocratique du Congo.

Pukrittayakamee, S., Prakongpan, S., Wanwimolruk, S., Clemens, R., Looareesuwan, S., White, N.J., 2003. Adverse effect of rifampin on quinine efficacy in uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47(5):1509-1513.

Rath, K.K., Taxis, G., Walz C.H., Gleiter, S.M., Li, L.H., 2004. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70:128-132

Ridley, R.G., 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415: 686-693.

Ridley, R.G., 2001. A role for public private partnership in controlling neglected diseases: *Bulletin of the World Health Organization*, 79 (8) 771-777.

Robert L. Goldenberg., Elizabeth M. McClure., Sarah Saleem., Uma M. Reddy., 2010. Distribution mondiale de l'espèce *plasmodium falciparum*. Infection-related stillbirths. *Lancet* 375: 1482-1490.

Rogers, D.J., Randolph, S.E., Snow, R.W., Hay, S.I., 2002. Satellite imagery in the study and forecast of malaria. *Nature*, 415: 710-715.

Rombo, L., Edwards, G., Ward, S.A., Eriksson G., Lindquist, L., Linberg, A., Runehagen, A. B., Jörkman, A., Hylandern, O. S., 1987. Patients with relapses of *P.vivax* or *P.ovale* despite primaquine treatment : *Tropical Medicine and Parasitology*, 38 (1) 49-50.

Sá, M.S, De Menezes, M.N., Krettli, A.U, Ribeiro, I.M, Tomassini, T.C, Ribeiro dos Santos, R., De Azevedo, W.F., Soares, M.B., 2011. Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. *Journal of Natural Products*, 74(10):2269-72.

Saleem, R., Rani, R., Ahmed, M., Sadaf, F., Ahmad, S.I., ul Zafar, N., Khan, S.S., Siddiqui, B.S., Lubna Ansari, F., Khan, S.A., Faizi, S., 2008. Effect of cream containing *Melia azedarach* flowers on skin diseases in children. *Phytomedicine*, 15: 231-236.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sanchez, C.P., Dave, A., Stein W.D., Lanzer, M., 2010. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 40(10): 1109-1118. Review.
- Sévenet, T. 1994. La chimie des substances naturelles en France. *Pour la Science* 201:46.
- Shim, Jae-Seok., Park, Kyung-Min., Chung, Jae-Youn., Hwang, Jae-Kwan., 2002. Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens *Nutraceuticals and Food*, 7(2), 215-218.
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Féraud, G., Ferrero, C.A., Franck, P.F., Gella, F.J., Hoelzel, W., Jørgensen, P.J., Kanno, T., Kessner, A., Klauke, R., Kristiansen, N., Lessinger, J.M., Linsinger, T.P., Misaki, H., Panteghini, M., Pauwels, J., Schiele, F., Schimmel, H.G., Weidemann, G., Siekmann, L., International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2002. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40: 718-24.; 725-733.
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Féraud, G., Ferrero, C.A., Franck, P.F., Gella, F.J., Hoelzel, W., Jørgensen, P.J., Kanno, T., Kessner, A., Klauke, R., Kristiansen, N., Lessinger, J.M., Linsinger, T.P., Misaki, H., Panteghini, M., Pauwels, J., Schiele, F., Schimmel, H.G., Weidemann, G., Siekmann, L., International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2002. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartateaminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40: 718-24.; 725-733.
- Silva, Melissa T. G., Simas, Sonia M., Batista, Terezinha G. F. M., Cardarelli., Paola, Tomassini., Therezinha, C. B., 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782.
- Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D.J., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* 363(9414): 1017–24.
- Snow, R.W, Guerra, C.A., Noor A.M, Myint, H.Y., Hay S.I., 2005. The global identification of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434 (7030): 214-217.
- Soares M B P; Brustolim D; Santos L A; Bellintani M C; Paiva F P; Ribeiro Y M; Tomassini T C B; Ribeiro Dos Santos R ., 2006. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6(3), 408-14.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Soares, Milena B. P.; Bellintani, Moema C.; Ribeiro, Ivone M.; Tomassini, Therezinha C. B., Ribeiro dos Santos, Ricardo., 2003. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology* 459(1), 107-112.
- Soyinka, J.O., Onyeji, C.O., Omoruyi, S.I., Owolabi, A.R., Sarma, P.V., Cook, J.M., 2009. Effects of concurrent administration of nevirapine on the disposition of quinine in healthy volunteers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(4):439-443.
- Staler, A., Cerani, A., 1992. Inhibition by chloroquine of a novel heme polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355: 167-169.
- Steketee, R.W., Nahlien, B.L., Parisse M.E. and Menendez, C., 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64(1,2):28-35.
- Steketee, R.W., Wirima, J.J., Campell, C.C., 1996. Developing effective strategies for malaria preventions programs for pregnant African women. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55 (suppl 1); 95-100.
- Steketee R.W, Wirima J.J., Slutsker L., Heymann D.L., Breman J.G., 1996. The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-saharan Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55 (1suppl):2-7.
- Stermitz, F., Scriven, L., Tegos, G., Lewis, K., 2002. Two flavonols from *Artemisia annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica*, 68: 1140-1141.
- Stevigny, C., Block, S., De Pauw-Gillet, M.C., de Hoffmann, E., Llabres, G., Adjakidje, V., Quetin-Leclercq, J., 2002. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*, 68: 1042-1044.
- Su, X., Mu, J., Joy, D., 2003. The malaria's Eve hypothesis and the debate concerning the origin of the human malaria parasite *P.falciparum*, *microbes and infection*. 5, 891-896.
- Subramanian, R. Asmawi, M.Z., Sadikun, A., 2012. A bitter plant with a sweet future? A comprehensive review of an oriental medicinal plant: *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry Review*, 11: 39-75.
- Sun Lijuan; Liu Jianwen; Liu Ping; Yu Youjun; Ma Lei; Hu Lihong., 2011. Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways. *Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 46(2): 482-488.
- Tageny, O.H., 1996. Contribution à l'étude des plantes médicinales utilisées contre le paludisme au Sankuru. Dissertation en D.E.S. université Patrice Emery Lumumba, Campus méthodiste de Wembo-nyama. République Démocratique du Congo.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

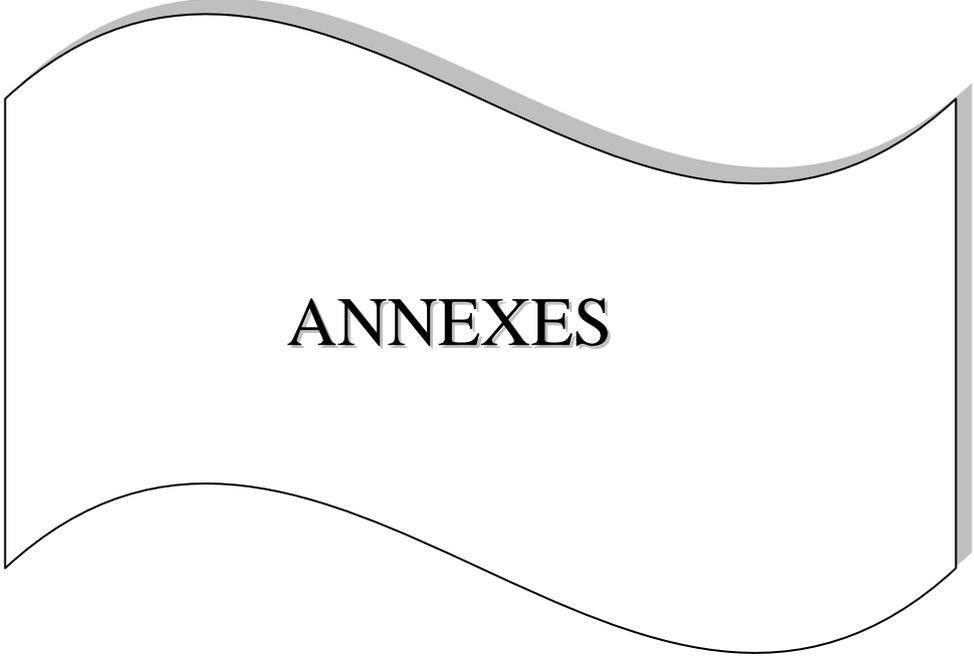
- Tamokou, J.D., Kuate, J.R., Tene, M., Tane, P., 2009. Antimicrobial clerodane diterpenoids from *Microglossa angolensis* Oliv. et Hiern. *Indian journal of pharmacology*, 41: 60-63.
- Tanaka, T., Hosokawa, M., Yasui, Y., Ishigamori, R., Miyashita, K., 2011. Cancer chemopreventive ability of conjugated linolenic acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11): 7495-509.
- Tchinda T.A., Tamze, V., Ngono, A.R.N., Ayimele, G.A., Cao, M. Angenot, L., Frédéricich, M., 2012. Alkaloids from the stem bark of *Strychnos icaia*. *Phytochemistry letter*, 5: 108-113.
- Tchoumboungang, F., Zollo, P.H., Dagne, E., Mekonnen, Y., 2005. In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta Medica*, 71(1): 20-3.
- Tene, M., Tane, P., Sondengam, B.L., Connolly, J.D., 2005. Clerodane diterpenoids from *Microglossa angolensis*. *Tetrahedron*, 61: 2655-2658.
- Tihon, L., 1934. *Entandrophragma palustris* Staner. *Bulletin Agricole du Congo* 25, 21-25.
- Thomas, L., 1998, Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate amino transferase (AST). In Thomas L, editor. *Clinical laboratory diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH-books verlagsgesellschaft 55-65.
- Tona, L., Cimanga, R.K., Mesia, K., Musuamba, C.T., De Bruyne, T., Apers, S., Hernans, N., Van Miert, S., Pieters, L., Totté, J., Vlietinck, A.J., 2004. In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1):27-32.
- Tona, L., Mesia, K., Ngimbi, N.P., Chrimwami, B., Okond'Ahoka, Cimanga, K., De Bruyne, T., Apers, S., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2001. In-vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95: 47-57.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Mesia, K., Penge, O., Lusakibanza, M., Cimanga, K., De Bruyne, T., Apers, S., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2000. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. *Phytomedicine*, 7: 31-38.
- Tona, L., Ngimbi, N.P., Tsakala, M., Mesia, K., Cimanga, K., Apers, S., De Bruyne, T., Pieters, L., Totte, J., Vlietinck, A.J., 1999. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 68:193-203.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., Vlietinck, A.J., 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 57-65.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Trager , W., Jensen, J., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 190, 673-675.
- Uhiemann, A.C., Krishna, S., 2005. Antimalarial multidrug resistance in Asia : Mechanisms and assessment. *Current Topics Microbiology and immunology*, 295: 39-53.
- Vallely, A., vallely, L., Changlucha, J., Greenwood, B., Chandramohan, D., 2007. Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa What news? What needed? *Malaria journal*, 6:16-28.
- Vishnukanta Rana, A.C., 2008. *Melia azedarach*: a phytopharmacological review. *Pharmacognosy Reviews*, 2: 173–184.
- Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M. Bi FT., Kamenan, A., Lobstein., A., Brun, R., Anton R., 2003. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3):221-5.
- Wagner, H., Bladt, S., 1984. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer, New-York.
- Wandscheer, C.B., Duque, J.E., Da Silva, M.A.N., Fukuyama, Y., Wohlke, J.L., Adelman,J., Fontana, J.D., 2004. Larvacidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44: 829-835.
- Wanwimolruk, S., Kang, W., Coville, P.F, Viriyayudhakorn, S., Thitiarchakul, S., 1995. Marked enhancement by rifampicin and lack of effect of isoniazid on the elimination of quinine in man. *Journal of Clinical Pharmacology* 40(1):87-91.
- Wéry M., 1995. *Protozoologie médicale De Boeck Université, Bruxelles*.
- WHO, world malaria report 2011. w.w.w. WHO.int/malaria/world malaria report. Consulted in March 2011
- WHO, 2006. *Guidelines for the treatment of malaria Geneva (world health organization)*.
- WHO, 2004, *A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the Africa regions; world organization regional office for Africa*.
- WHO, 2007. *The Abuja declaration and the plan of action. Extract of African summit on roll back malaria, 2000, Abuja (WHO/CDS/RBM/2000.17)*.
- Wilby, K.J., Lau, TT., Gilchrist, S.E., Ensom, M.H., 2012. A Novel Vaccine for the Prevention of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Ann. Pharmacother.* 46 (3):384-93.
- Wilcox , M.L., Graz, B., Falquet, L., Diakite, C., Giani, S., Diallo,D., 2011. A reverse pharmacology approach for developing an anti-malarial phytomedicine. *Malaria Journal* 10.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Willcox, M., Bodeker, G., Bourdy, G., Dhingra, V., Falquet, J., Ferreira, J.F.S., Graz, B., Hirt, H.M., Hsu, E., De Magalhaes, P.M., Provendier, D., Wright C.W., 2004. *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial, in: *Traditional Medicinal Plants and Malaria*, CRC Press, Boca Raton, FL, 43–59
- Wilson, C.M., Serrano, A.E., Wasley, A., et al., 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science*, 244:1184–1186.
- Wu, Shu-Jing; Ng, Lean-Teik; Chen, Ching-Hsein; Lin, Doung-Liang; Wang, Shyh-Shyan; Lin, Chun-Ching., 2004. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells *Life Sciences* (2004), 74(16), 2061-2073.
- Nour, A.M., Khalid, S.A., Kaiser, M., Brun, R., Abdalla, W.E., Schmidt, T.J., 2010. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(1):127-30.
- Yang, Y.Z., Little, B., Meshnick, S.R., 1994. Alkylation of proteins by artemisinin. *Biochemistry and Pharmacology* 48: 569- 57.
- Yu, Youjun; Sun, Lijuan; Ma, Lei; Li, Jiyu; Hu, Lihong; Liu, Jianwen., 2010. Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 10(3), 290-297.
- Zdero, C and F.Bohlmann., 1989. Pseudoguaianolides and other constituents from *Anisopappus pinnatifidus* and *Antiphiona* species. *Phytochemistry*, 28 (4): 1155-1161.
- Zirihi, G.N., Mambu, L., Guede-Guina, F., Bodo, B., Grellier, P., 2005. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 281–285.



ANNEXES