

**Evaluation in vivo de l'activité antipaludique des extraits de *Artemisia annua* L.,
Alisicarpus ovalifolius (SCHUM. et THONN.) J. LEONARD. et de *Securidaca longepedunculata*
FRESS. chez la souris nmri infestée par le *Plasmodium berghei* NK 65**

**[Evaluation in vivo of the antipaludic activity of extracts of *Artemisia annua* L.,
Alisicarpus ovalifolius (SCHUM. et THONN.) J. LEONARD. and *Securidaca longepedunculata*
FRESS. in nmri mice infected with *Plasmodium berghei* NK 65]**

Mounkaila Soumaila¹, Souley Kallo Moutari², Oubayyou Abdoulaye Mamoudou³, Idrissa Moussa², Mahamane Ali⁴, and Ikhri Kalid³

¹Department de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Agadez, BP 199, Agadez, Niger

²Department de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Abdou Moumouni, BP 10662, Niamey, Niger

³Laboratoire de Biochimie, Hôpital National Amirou Boubacar Diallo, BP 10146, Niamey, Niger

⁴Department de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Abdou Moumouni, BP 10662, Niamey, Niger

Copyright © 2023 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: This work aims to evaluate the antimalarial biological activities of medicinal plant extracts namely *Artemisia annua*, *Alisicarpus ovalifolius* and *Securidaca longepedunculata*. The phytochemical analysis of the extracts of these plants revealed the presence of saponins, alkaloids, flavonoids, quinones, phenols and terpenes. Toxicity tests according to the method proposed by OECD have made it possible to conclude that the plant extracts are not toxic. The tests were carried out on mice, inoculated intraperitoneally with *Plasmodium berghei*. These animals were divided into eleven groups of five, nine of which each received a dose of the extract to be tested and the other two, distilled water for the negative control and arthemether for the positive control. The different extracts showed various antimalarial activities using the four-day Peters test on infected mice. *Artemisia annua* gave the highest parasitaemia reduction percentages with 87.2; 96.8 and 96% respectively at doses of 100, 250 and 500 mg/kg, while *Alisicarpus ovalifolius* recorded 61.6; 71.20 and 80.8% respectively at the same doses. *Securidaca longepedunculata* extracts gave low percentage reductions in parasitaemia. Statistical analysis reveals that the extracts showed a significant difference compared to the negative control (P<0.05).

KEYWORDS: Artemether, healing plants, antimalarial, *Plasmodium berghei*, test in vivo.

RESUME: Ce travail a pour but d'évaluer les activités biologiques antipaludiques des extraits de plantes médicinales à savoir *Artemisia annua*, *Alisicarpus ovalifolius* et de *Securidaca longepedunculata*. L'analyse phytochimique des extraits de ces plantes, a révélé la présence de saponines, d'alcoïdes, de flavonoïdes, de quinones, de phénols et de terpènes. Les tests de toxicité selon la méthode proposée par OCDE ont permis de conclure que les extraits des plantes ne sont pas toxiques. Les tests ont été effectués sur des souris, inoculées par voie intrapéritonéale avec le *Plasmodium berghei*. Ces animaux ont été repartis en onze groupes de cinq, dont neuf ont reçu chacun une dose de l'extrait à tester et les deux autres, de l'eau distillée pour le témoin négatif et de l'arthémether pour le témoin positif. Les différents extraits ont montré diverses activités antipaludiques en utilisant le test de Peters de quatre jours sur les souris infectées. *Artemisia annua* a donné les pourcentages de réduction de la parasitémie, les plus élevés avec 87,2; 96,8 et 96 % respectivement aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg, tandis que *Alisicarpus ovalifolius* a enregistré 61,6; 71,20 et 80,8 % respectivement aux mêmes doses. Les extraits de *Securidaca longepedunculata* ont donné de faibles pourcentages de réduction de la parasitémie. L'analyse statistique révèle que les extraits ont montré une différence significative comparés au témoin négatif (P<0.05).

MOTS-CLEFS: Arthémether, plantes médicinales, antipaludique, *Plasmodium berghei*, test in vivo.

1 INTRODUCTION

La curiosité et le principe innés de la doctrine de signature préconisés par Paracelsus (1493–1541) qui, indiquant la possibilité d'identification des particularités et vertus de chaque plante par sa " signature " (forme, couleur), ont guidé les premiers hommes dans le choix des nouvelles préparations avant les tests [1]. Les substances naturelles dont les plantes constituent la source principale, représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nés de la modification chimique de molécules ou de parties de molécules naturelles prises comme "têtes de séries [2]. Il apparaît aujourd'hui urgent que la médecine et la pharmacopée traditionnelle africaine vers lesquelles les 3/4 de nos populations se tournent pour des raisons d'ordre socio-culturel, socio-économique et sanitaire, soient valorisées [3].

À l'heure actuelle, des équipes de chercheurs obtiennent à partir des plantes médicinales, des substances nécessaires à la création de nouveaux médicaments. Cependant, le potentiel des plantes comme sources pour la production de nouveaux médicaments est largement inexploité [4]. Donc, la connaissance des constituants chimiques des plantes facilite l'étude de leur activité biologique et un meilleur contrôle de qualité en vue d'une préparation pharmaceutique [5].

Ainsi, la recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs [6]. Dans le cas de la lutte contre le paludisme, les succès en clinique de la quinine et de l'artémisinine, molécules naturelles isolées respectivement de *Cinchona sp.* et *Artemisia sp.* encourage la recherche de nouvelles molécules antipaludiques issues de la biodiversité végétale [7].

Afin de valoriser la médecine traditionnelle plusieurs études portant sur la composition chimique des différentes parties des plantes ont été menées à travers le monde mais très peu au Niger. La Flore de ce pays est composée de 1567 espèces d'Angiospermes, 11 Bryophytes, 14 Ptéridophytes et 547 espèces d'Algues [8]. Ainsi, deux espèces végétales spontanées de ladite flore et de *Artemisia annua* produite au Niger ont été utilisées dans le cadre de cette étude. La première, *Alysicarpus ovalifolius* qui est connue des populations comme une plante fourragère. Au cours de l'enquête ethnobotanique, cette plante est utilisée dans le traitement du paludisme. Et la deuxième plante, *Securidaca longipedunculata* est utilisée dans le traitement de plusieurs maladies dont le paludisme. Ce qui lui a valu le nom de « *Uwan magunguna* » qui signifie la mère des remèdes en Haoussa.

L'objectif est d'étudier l'activité anti plasmodiale des deux (2) plantes spontanées (*Securidaca longipedunculata* et *Alysicarpus ovalifolius*) utilisées dans la pharmacopée du Niger et celle de *Artemisia annua* produite dans le même pays.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 PRÉSENTATION DU MILIEU D'ÉTUDE

L'étude phytochimique et pharmacologique ont été conduites au laboratoire du département de chimie de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Abdou Moumouni de Niamey. Le site de l'Université est situé dans la communauté urbaine de Niamey à la rive droite du fleuve Niger (figure 1). La température maximale moyenne mensuelle pendant l'expérimentation est de 38,21 °C pour une température minimale de 22,3 °C.



Fig. 1. Situation géographique de la zone d'étude

2.2 MATÉRIELS VÉGÉTAL

Le matériel végétal est constitué des feuilles de *Artemisia annua*, des racines de *Securidaca longepedunculata* et la plante entière de *Alisicarpus ovalifolius*. Ces plantes ont été fraîchement échantillonnées et identifiées au département de biologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Abdou Moumouni de Niamey. Des spécimens ont été déposés à l'herbier du dit département. Les plantes étudiées ont été d'abord lavées, séchées dans les conditions de laboratoire et pulvérisées sous forme de poudre qui par la suite a été utilisée pour effectuer les différentes extractions. Le choix des plantes a été guidé par les indications d'usage médicinal traditionnel antipaludique, mais aussi par le fait que ces plantes n'ont pas fait l'objet d'investigations chimiques au Niger.

2.3 MÉTHODES CHIMIQUES

2.3.1 MÉTHODES DE SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Des extraits ont été préparés à partir de ces différentes poudres fines, ont servi à la réalisation du screening phytochimique selon les méthodes rapportées par [9].

Après broyage, les différents échantillons ont été pesés.

Pour la décoction 50 g de la poudre fine de plante est introduit dans 250 mL d'eau distillée et chauffé pendant 15 minutes. Le mélange est filtré sur coton hydrophile, puis sur du papier filtre Wattman.

Pour l'extrait éthanolique, 50 g de poudre de plantes sont placés dans une fiole, on ajoute 250 mL d'éthanol et on agite pendant 24 heures. Le mélange est filtré sur coton hydrophile, puis sur du papier filtre Wattman. Les différents extraits ont été utilisés pour effectuer les tests de caractérisation phytochimique.

• Test des alcaloïdes

4 mL de décocté ont été évaporés à sec. Le résidu est repris dans 4 mL de HCl à 1%. Ensuite on le sépare à part égale dans deux tubes. Dans le tube 1 on n'ajoute rien, c'est le témoin; par contre dans le tube 2, on ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer. La présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité blanc ou d'une coloration jaunâtre.

Si c'est le réactif de Dragendorff qui est ajouté à la place du réactif de Mayer, il y aura une coloration rouge orangée ou rouge brique annonçant la présence des alcaloïdes.

Réactif de Wagner: Ajoutant quelques gouttes du réactif de Wagner dans le tube 2 en lieu et place du réactif de Mayer, l'apparition de précipité brun ou brun floconneux montre la présence des alcaloïdes.

• Test des flavonoïdes

2 mL de décocté ont été évaporés à sec. Le résidu est repris dans 2 mL d'un mélange d'eau et de méthanol (1: 1). On ajoute quelques gouttes de magnésium et de HCl concentré, une coloration rouge apparaît indiquant la présence des flavonoïdes.

• Test des quinones

5 mL de l'extrait ont été évaporés à sec. Le résidu est repris dans 5 mL de HCl à 20%. La solution est portée au bain marie pendant 30 mn, et on le laisse refroidir. Après refroidissement, on l'extrait avec 20 mL de CH₂Cl₂. On ajoute 0,5 ml de NH₃ à 50%. Une coloration rouge ou violacée indique la présence des quinones.

• Test des stérols et terpènes

5 mL d'extrait ont été évaporés à sec à 90 ° C. Au résidu, on ajoute 0,5 mL d'acide acétique puis 1 mL d'acide sulfurique concentré. Si dans la zone de contact entre les deux liquides, il y a apparition d'un cercle violé ou marron devenant gris par la suite, le test est positif.

• Test des tanins galliques et catéchiques

✓ Détection des tannoïdes

Les tannoïdes (tannins hydrolysables) et les tannins vrais (tannins ou condensés) sont des polymères de polyphénols responsables de colorations noires brunes des extraits végétaux. Ils ont été détectés en ajoutant quelques gouttes de solution de FeCl₃ diluée à 1 ou 2

% au décocté. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques ou bleue noirâtre pour les tanins galliques ([10], [11]).

✓ Détection des tannins vrais

Ces tanins ont été mis en évidence à chaud en présence de HCl concentré. À 2 ml d'extrait sont ajoutées quelques gouttes de HCl concentré, le tout est chauffé au bain-marie bouillant. La formation d'un précipité rouge indique un test positif [11].

• **Test des anthocyanes**

A 2,5 mL de décocté, on ajoute du HCl à 20 %. Le mélange est porté à chaud à 90° C dans un bain marie pendant 30 minutes. La présence des anthocyanes est confirmée par la formation d'un précipité blanc ou d'une coloration rouge violacée.

• **Test des coumarines**

Les coumarines ont été mises en évidence par la procédure décrite par 9Kallo *et al.*, 2018 et 10Bekro *et al.*, 2007. En effet, à 2 mL de solution éthanoïque est ajouté 0,5 mL de NaOH à 10 %. Après chauffage et refroidissement, 4 mL d'eau distillée sont rajoutés. La solution devient transparente par rapport au témoin. La réaction est positive si l'acidification de la solution transparente avec quelques gouttes de HCl concentré fait perdre sa coloration jaune pour la faire trouble ou s'il se forme un précipité.

• **Test de saponoside**

2 mL de décocté ont été introduits dans un tube puis agités pendant 30 secondes. Ensuite on laisse le tube au repos pendant 15 minutes. Si la mousse observée persiste et atteint une hauteur de 1 cm, le test est positif.

2.3.2 ETUDE BIOLOGIQUE

2.3.2.1 PRÉPARATION DES EXTRACTION

• **Macéré aqueux**

Le macéré aqueux a été préparé par macération sous agitation magnétique de 100 g du matériel végétal dans 500 mL pendant 24 heures. Le mélange est filtré sur coton hydrophile, puis sur du papier filtre Wattman. Pour élimination de l'eau, le filtrat a été placé dans l'étuve à 45°C jusqu'à l'obtention d'un extrait concentré qui a été lyophilisé et conservé dans un réfrigérateur, jusqu'à son utilisation.

• **Extrait éthanolique**

A 100 g de poudre de chaque matériel végétal, on ajoute 500 mL d'éthanol (80 %) et on laisse sous agitation pendant 24 heures. L'extrait obtenu est filtré sur coton hydrophile, puis sur du filtre Wattman est concentré, séché à l'aide du rotavapor. Le produit a ensuite été lyophilisé et conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

• **Extrait au dichlorométhane**

A 100 g de poudre, on ajoute 500 mL de dichlorométhane, et on agite pendant 24 heures. Filtré sur coton hydrophile et sur papier filtre Wattman, l'extrait a été ensuite concentré par évaporation grâce au rotavapor, puis lyophilisé et conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

• **Décocté aqueux**

100 g de poudre du matériel végétal dans 500 mL d'eau distillée ont été porté à ébullition pendant 30 minutes. Le décocté a été filtré, puis placé dans l'étuve à 45° C jusqu'à obtention d'un extrait concentré, qui a été lyophilisé et conservé au réfrigérateur.

2.3.2.2 TEST DE TOXICITÉ AIGUË PAR VOIE ORALE

La toxicité générale aiguë par voie orale des différents extraits a été évaluée selon la méthode proposée par OCDE [12]. Cette méthode ne vise pas le calcul d'une valeur précise de la DL50, et comme la mort d'une partie des animaux reste le principal effet a observé, elle consiste donc à déterminer la dose de l'extrait qui provoque la mortalité cumulée de 50% des animaux soumis à l'expérimentation pendant 72 heures. Conformément à cette méthode, un lot de trois souris a été constitué. Ces animaux ont été mis à jeun pendant 3 heures. Après la période de jeun, les animaux ont été pesés et chacun a reçu une dose de 2000 mg/kg de substance

(extrait). Après l'administration de la substance, les animaux ont été à nouveau privés de nourriture, pendant deux (2) heures. Les paramètres suivants sont observés: Manque d'appétit, vomissement, mortalité.

2.3.2.3 TESTS DE MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE

Le plasmodium berghei NK 65 a été obtenu au laboratoire de biochimie et nutrition de « Nigerian Institute of Medical Research (NIMR) » de Yaba, Lagos, - Nigeria.

Pour transporter le parasite, des souris ont été inoculées au Plasmodium berghei Nk 65 puis transportées jusqu'au laboratoire de Substance naturelle du département de Chimie de l'Université Abdou Moumouni de Niamey. Les souris sont infectées par injection intra péritonéale pour conserver le plasmodium jusqu'au jour du test. Le jour du test c'est-à-dire quatre jours après infestation des souris donneuses, un test de goutte épaisse a été fait pour confirmer la maladie. Le facteur physiologique (Élévation de la température, léthargie, perte d'appétit) de la maladie a été suivi.

2.3.2.4 PRÉLÈVEMENT DE SANG INFESTÉ

Une fois la confirmation faite, les souris sont placées dans un bocal qui contient du coton imbibé avec de l'éther. L'animal endormi, est placé sur une table en position de dissection. On ouvre son ventre avec deux paires de ciseaux, puis on verse de l'EDTA et avec une seringue on prélève le sang au niveau du cœur. Le sang est ensuite conservé dans une éprouvette. C'est ce sang infesté de *Plasmodium berghei* NK 65 qui est utilisé pour infecter les autres souris pour la suite de l'expérimentation.

2.3.2.5 INFESTATION ET TRAITEMENT DES SOURIS

Avant d'être infecté, les souris ont été pesées pour former des lots et leur température a été relevée. Pour l'infestation, les animaux (lots tests et contrôle) vont recevoir chacun 200 µl de sang parasité par voie intra péritonéale, soit environ 10⁷ globules rouges parasités par souris. Le test de Peters [13] a été utilisé à cet effet.

Toutes les souris recevront le *P. berghei* par injection intra péritonéale. Deux heures après l'injection, chaque souris recevra une dose de l'extrait à administrer par voie orale.

Les souris sont réparties en 11 lots de 5 souris, et chaque lot recevra des doses d'une plante à tester. Chaque groupe de souris aura une dose de l'extrait à tester et les lots témoins, la solution utilisée pour diluer l'extrait c'est-à-dire de l'eau distillée pour les témoins négatifs et de l'arthémether pour les témoins positifs. Ainsi 3 doses par extrait (100; 250; 500 mg/kg de poids corporel des souris) sont utilisées pour le test par plante.

Groupe 1: Souris infectées traitées par de l'eau distillée (Témoins négatifs)

Groupe 2: Souris infectées traitées par de l'arthémether

Groupe 3: Souris infectées traitées par 500 mg/kg de *Securidaca longipedunculata*

Groupe 4: Souris infectées traitées par 250 mg/kg de *Securidaca longipedunculata*

Groupe 5: Souris infectées traitées par 100 mg/kg de *Securidaca longipedunculata*

Groupe 6: Souris infectées traitées par 500 mg/kg de *Alisicarpus ovalifolius*

Groupe 7: Souris infectées traitées par 250 mg/kg de *Alisicarpus ovalifolius*

Groupe 8: Souris infectées traitées par 100 mg/kg de *Alisicarpus ovalifolius*

Groupe 9: Souris infectées traitées par 500 mg/kg de *Artemisia annua*

Groupe 10: Souris infectées traitées par 250 mg/kg de *Artemisia annua*

Groupe 11: Souris infectées traitées par 100 mg/kg de *Artemisia annua*

Du premier jour (J0) jusqu'au quatrième jour (J3) la dose est administrée une fois par jour.

Les paramètres suivants ont été déterminés (avant et après le traitement):

- Le poids de chaque souris;
- La température rectale;
- La mortalité.

Pour les différentes plantes, le macéré de *Alysicarpus ovalifolius* et l'extrait éthanolique de *Securidaca longipedunculata* ont été utilisés pour le test in vivo pour des raisons économiques.

2.3.2.6 GOUTTE ÉPAISSE ET FROTTIS SANGUIN

Le bout de la queue de la souris est coupé, et on exerce une pression le long de la queue pour recueillir le sang. Ce sang est déposé sur la lame.

Pour le frottis sanguin: appliqué sur la goutte de sang le bord d'une autre lame et pousser en avant avec un geste rapide et régulier vers l'autre extrémité de la lame pour obtenir un film de sang. La lame est séchée à l'abri de la poussière et des insectes, puis numérotée. La lame sera fixée pendant 30 secondes par immersion dans de le méthanol. Après séchage, la lame est ensuite plongée dans la solution de May grunwald et Giemsa pendant 15 à 20 mn. La lame est rincée avec l'eau de robinet puis séchée à nouveau. Avec un microscope, lire et compter les globules rouges parasités, puis calculer la densité parasitaire et calculer la réduction de la parasitémie.

2.3.3 CALCULS ET ANALYSES STATISTIQUES

- **Calcul du rendement**

Le rendement a été calculé selon la formule suivante:

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

- **Densité parasitaire**

La densité parasitaire a été calculée par la formule suivante utilisée par [14].

$$DP = \frac{A \times 8.10^6}{B \times 527}$$

A = Nombre de globules rouges parasités comptés; B = Nombre de champs lus (3 ou 5)

8.10⁶ = Nombre moyen de GR/mm³ de sang chez la souris

527 Nombre de globules rouges par champs microscopiques considérés

- **Pourcentage de réduction de la parasitémie**

Le pourcentage de réduction de la parasitémie est calculé avec la formule suivante:

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

Les résultats des différents tests ont été analysés par le test-t de Student pour les comparaisons simples, et l'analyse de variance à un seul facteur suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les valeurs de p inférieure à 0.05 (p<0.05) sont considérées comme statistiquement significatives. À cet effet les logiciels Excel et Mini Tab ont été utilisés.

3 RESULTATS

L'analyse du tableau 1 montre que pour le rendement des extraits, le plus élevé a été obtenu avec le macéré éthanolique de *Securidaca longipedunculata* qui a donné 21,7 % et le plus faible était l'extrait du macéré aqueux de *Alysicarpus ovalifolius* avec 6,29 %. Pour *Alysicarpus ovalifolius* le meilleur rendement a été obtenu avec le décocté d'eau distillée. L'extrait aqueux par décoction a donné le rendement le plus élevé par rapport aux autres extraits (macéré aqueux et décocté éthanolique) au niveau de *Artemisia annua* et *Alysicarpus ovalifolius* (Tableau 1).

Tableau 1. Masses, rendements et couleurs des extraits

| Extraits | | Masses des extraits (g) | Rendements des extractions (%) | Couleurs des extraits |
|------------------------------------|---------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| <i>Artemisia annua</i> | Ethanol | 11,32 | 11,32 | Verdâtre |
| | Eau distillée | 12,63 | 12,63 | Verdâtre |
| | Macéré | 9,03 | 9,03 | Verdâtre |
| <i>Securidaca longipedunculata</i> | Ethanol | 21,7 | 21,7 | Jaunâtre |
| | Eau distillée | 8,39 | 8,39 | Jaunâtre |
| | Macéré | 11,01 | 11,01 | Jaunâtre |
| <i>Alysicarpus ovalifolius</i> | Ethanol | 8,7 | 8,7 | Verdâtre |
| | Eau distillée | 11,47 | 11,47 | Verdâtre |
| | Macéré | 6,29 | 6,29 | Verdâtre |

En ce concerne le criblage phytochimique effectué sur ces plantes, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2. L'analyse du tableau 2 a révélé la présence de certains constituants dans les extraits analysés. Les plus abondants dans les plantes sont: les Alcaloïdes, saponosides, les quinones, les anthocyanes, les tanins, les stérols et tri terpènes. On note la présence des tanins dans tous les échantillons. La présence des alcaloïdes et des flavonoïdes en grande quantité a été révélée dans l'extrait de *Alysicarpus ovalifolius* (Tableau 2), cependant on note l'absence des coumarines et des anthocyanes. Le criblage phytochimique de la poudre des racines de *Securidaca longipedunculata* a montré la présence des groupes chimiques suivants: Alcaloïdes, flavonoïdes, quinones et des saponosides.

Tableau 2. Résultat des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans le matériel végétal

| Composés recherchés | <i>A. annua</i> | <i>S. longipedunculata</i> | <i>A. ovalifolius</i> |
|---------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------|
| Alcaloïdes (Mayer) | ++ | ++ | +++ |
| Alcaloïdes (Wagner) | + | + | +++ |
| Alcaloïdes (Drangendorff) | ++ | ++ | +++ |
| Coumarines | - | - | - |
| Flavonoïdes | ++ | + | +++ |
| Quinones | + | ++ | ++ |
| Saponosides | - | +++ | + |
| Phénols et terpènes | + | ++ | + |
| Anthocyanes | + | - | - |
| Tanins Ga | ++ | - | + |
| Tanins C | - | - | - |

+++ : Très abondants; ++ : abondants; + : présents; - : absents.

L'administration par voie orale des extraits de *Alysicarpus ovalifolius* et *Artemisia annua* à la dose de 2000 mg/kg de poids corporel respectivement aux différents groupes de souris, n'a pas changé les comportements de ces animaux et il n'y a pas eu de mort durant les 72 heures d'observation. Par contre pour *Securidaca longipedunculata* trois morts sur six ont été enregistré (Tableau 3).

Tableau 3. Taux de mortalité pour le test de toxicité

| Extraits | Doses administrées | Lots de souris | Nombre de mort | Taux de mortalité |
|----------------------------|--------------------|----------------|----------------|-------------------|
| <i>A. annua</i> | 2000 mg/kg | A (3 souris) | 0 | 0 |
| | | B (3 souris) | 0 | 0 |
| <i>A. ovalifolius</i> | 2000 mg/kg | C (3 souris) | 0 | 0 |
| | | D (3 souris) | 0 | 0 |
| <i>S. longipedunculata</i> | 2000 mg/kg | E (3 souris) | 2 | 66,66 |
| | | F (3 souris) | 1 | 33,33 |
| | 300 mg/kg | G (3 souris) | 0 | 0 |
| | | H (3 souris) | 1 | 33,33 |

Les résultats des tests biologiques montrent que les extraits ont une action positive sur le *plasmodium berghei*. *Artemisia annua* produite au Niger a donnée de très bons résultats avec des réductions de la parasitémie supérieures à 85 % à toutes les doses (Tableau 4). *Alysicarpus Ovalifolius* aux doses de 100, 250 et 500mg/kg/j sont des doses ayant enregistré une réduction de la parasitemie supérieur à 50 %. Le décocté de *Securidaca longipedunculata* à toutes les doses (100, 250 et 500 mg/kg/j) n'a pas pu réduire la parasitémie de 50% (Tableau 4).

Tableau 4. Résultat de l'activité antipaludique des extraits contre *Plasmodium berghei*

| Extraits | Doses | Parasitémie | PR (%) |
|---|---------------|-------------|--------|
| Témoin positif | Arthemether | 0 | 100 |
| Témoin négatif | Eau distillée | 18975,33 | 0 |
| <i>Securidaca longipedunculata</i> (Extrait éthanologique) | 100 mg | 12144,21 | 36 |
| | 250 mg | 14421,25 | 24 |
| | 500 mg | 15180,27 | 20 |
| <i>Alysicarpus ovalifolius</i> (Macéré) | 100 mg | 3795,07 | 61,60 |
| | 250 mg | 5313,09 | 71,20 |
| | 500 mg | 7590,13 | 80,80 |
| <i>Artemisia annua</i> | 100 mg | 2428,84 | 87,2 |
| | 250 mg | 607,21 | 96,8 |
| | 500 mg | 759,01 | 96 |

Les différentes analyses statistiques comparatives entre les traitements donnent des résultats divers comme le montre le tableau 5.

Tableau 5. Résultats récapitulatif des analyses des comparaisons entre les différents traitements

| Traitements | P |
|-------------|-------|
| SL*T0 | 0,031 |
| SL*T1 | 0,004 |
| SL*AA | 0,013 |
| AO*T0 | 0,007 |
| AO*T1 | 0,037 |
| AO*AA | 0,022 |
| AA*T0 | 0,001 |
| AA*T1 | 0,162 |

P (< 0.05) = significatif; P (< 0.01) = très significatif (< 0.01); P (< 0.001) = hautement significatif; T0= Témoin négatif; T1 = Témoin positif; SL= *Securidaca longipedunculata*; AO= *Alysicarpus ovalifolius*; AA = *Artemisia annua*.

4 DISCUSSION

Le rendement des extraits des différents échantillons de plantes révèle que ce sont en général les décoctions aqueuses qui donnent les meilleurs rendements. Ceci peut expliquer la présence de plusieurs constituants dans le décocté de *Alysicarpus ovalifolius* par rapport aux autres extraits de plantes. Selon Basséne [15], cette différence en rendement du décocté aqueux par rapport au décocté éthanologique et au macéré aqueux serait due à la présence des oses et des composés polaires polyphénols et autres constituants tels que les tanins réputés comme composés ayant des importants de principes actifs.

L'analyse des résultats du criblage phytochimique révèle la présence des alcaloïdes, des quinones et des flavonoïdes en grande quantité dans le macéré de la plante entière de *Alysicarpus ovalifolius* et dans l'extrait éthanologique de *Securidaca longipedunculata*. Cependant on note l'absence des coumarines et des anthocyanes dans le macéré de *Alysicarpus ovalifolius*. Selon Kingsley [16], la présence ou l'absence de certains composés phytochimique dans une plante serait peut-être due au solvant ou au moment (Matin, soir, nuit) de la récolte. Ceci est confirmé avec les tests des alcaloïdes, où selon le réactif utilisé on observe leur présence peu abondante, abondante ou très abondante.

La caractérisation phytochimique des échantillons des différentes espèces dans cette étude montre que ces extraits contiennent des alcaloïdes, des saponines et des tanins. Or pour plusieurs auteurs ([17]; [18] et [19]), les principaux agents antipaludiques sont les alcaloïdes; tannins, saponines et les stéroïdes. La plupart de ces composés sont présents dans les extraits des plantes de cette étude, ils

seraient donc responsable de l'effet antipaludique. Les terpènes (tri terpènes), les flavonoïdes, stérols (phyto stérols), phénoliques et les alcaloïdes sont considérés comme agents antipaludiques [20]. Ainsi tous ces composés cités ci-dessus sont présents dans les extraits testés au cours de cette étude, donc ils peuvent être à la base de l'élimination des parasites (*Plasmodium berghei*). Et nous pouvons dire que les effets antipaludiques des espèces de l'étude seraient dus à ces composés. En plus O'Neill [21] ont démontré l'activité inhibitrice in vivo sur *Plasmodium berghei* par voie orale de quatre quassinoides (terpènes) extraites du fruit de *Brucea javanica*. Ceci vient confirmer que les terpènes présents dans les échantillons pourraient aussi être à la base de l'élimination du parasite (*Plasmodium berghei*). D'après [22] et [23] plusieurs classes de métabolites secondaires sont responsables des activités antipaludiques, mais le plus important et puissant effet a été observé dans les alcaloïdes, quassinoides et sesquiterpènes. A ajouter que l'un des plus importants traitements du paludisme se fait avec de la quinine, qui n'est rien d'autre qu'un dérivé des alcaloïdes. Ainsi l'activité antipaludique des plantes pourrait aussi être liée à la présence des alcaloïdes et quassinoides (terpènes) qui ont été détectés dans les plantes utilisées au cours de cette étude.

La toxicité générale aiguë par voie orale des différents extraits a révélé que *Alysicarpus ovalifolius*, *Artemisia annua* ne sont pas toxiques à la dose de 2000 mg/kg et sont classées dans la catégorie 5 ou non classées du système de classification globalement harmonisé (SCGH) de [12]. Avec un taux nul de mortalité à la dose de 2000 mg/kg, la dose létale (DL50) limite est supérieure à 5000 mg/kg de poids corporel selon l'échelle de toxicité adoptée par la méthode [12], ligne directrice 423. Par contre, *Securidaca longepedunculata*, avec trois morts peut être classée dans la catégorie 4 du même système de l'OCDE. C'est-à-dire qu'avec ces trois morts au cours du test de toxicité, la DL50 est de 1000 mg/kg. Le fait que la plante ne cause pas trop de mort malgré son utilisation contre plusieurs maladies par la population locale, serait certainement due à sa combinaison avec d'autres plantes pour les différents traitements. Certaines de ces plantes peuvent jouer un rôle d'atténuation sur la toxicité de *Securidaca longepedunculata*.

La comparaison des activités antipaludiques montre que *Artemisia annua* cultivée et récoltée au Niger a donné les meilleurs résultats que les deux autres plantes spontanées (*Alysicarpus ovalifolius* et *Securidaca longepedunculata*) du Niger. Parmi ces deux plantes spontanées c'est *Alysicarpus ovalifolius* qui a donné le meilleur résultat.

Les activités antipaludiques in vivo peuvent être classées comme modérée, bonne et très bonne si les extraits ont atteint un pourcentage de suppression de la parasitémie supérieure ou égale à 50%, à une dose de 500 mg, 250 mg et 100 mg/kg par jour respectivement [24]. Sur la base de cette classification, le macéré de *Alysicarpus ovalifolius* est un très bon antipaludéen, car toutes les trois doses testées ont donné des résultats supérieurs à 50%. Cependant le décocté de *Securidaca longepedunculata* n'est pas un très bon antipaludéen du fait que les résultats du test in vivo n'ont pas atteint les 50% pour toutes les trois doses testées. Aussi, [25] ont établi une échelle d'appréciation de l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes, afin de statuer sur l'efficacité parasitologique des extraits. Ainsi, pour un extrait testé à une dose de 250 mg/kg/j et en fonction des pourcentages de réduction de la parasitémie obtenus, l'extrait sera considéré:

- Activité très bonne à bonne, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 100 et 90 %;
- Bonne à modéré, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 90 et 50 %;
- Modéré à faible, si le pourcentage de réduction de la parasitémie est compris entre 50 et 10 %;
- Inactif si le pourcentage de réduction de la parasitémie est 0%.

Par rapport à cette échelle les différents extraits peuvent être considérés comme suit:

Artemisia annua cultivée et récoltée au Niger donne une réduction de la parasitémie de 96,8% à la dose de 250 mg/kg/j, peut être considéré comme ayant une activité antiplasmodiale très bonne. *Alysicarpus ovalifolius* à la dose de 250 mg/kg/j avec un pourcentage de réduction de la parasitémie de 72 % est considéré comme ayant une activité antiplasmodiale bonne. *Securidaca longepedunculata* avec un pourcentage de réduction de la parasitémie de 24 % à la dose de 250 mg/kg/j est considéré comme ayant une activité antiplasmodiale faible.

L'analyse des résultats statistiques a montré que les différentes doses d'*Alysicarpus ovalifolius* comparées au témoin négatif (Souris ayant reçu de l'eau distillée comme traitement) et au témoin positif (Souris ayant reçu de l'arthémether comme traitement) ont donné une différence hautement significative et significative respectivement. Ceci veut dire que cette plante peut être utilisée comme un antipaludéen. Ces résultats d'*Alysicarpus ovalifolius* avec 60, 72 et 80% aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg/j respectivement sont supérieurs à ceux de *Securidaca longepedunculata* qui ont eu comme pourcentage de réduction de la parasitémie 36, 24 et 20 % aux doses de 100, 250 et 500 mg/kg/j respectivement. Ces mêmes résultats de *A. ovalifolius* sont cependant inférieurs à ceux de *Artemisia annua* produite au Niger aux mêmes doses. Toujours les résultats d'*Alysicarpus ovalifolius* sont meilleurs que ceux de [26] qui ont enregistré 23,1, 43,1 et 20 % aux doses 200, 400 et 800 mg/kg/j respectivement avec un test antipaludique in vivo de *Alostonia boonei* sur des souris infectées de *Plasmodium berghei* NK 65 au Nigeria.

L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative en comparant le pourcentage de réduction de la parasitémie de *Artemisia annua* cultivée et récoltée au Niger et le témoin positif. On note une différence significative entre les autres extraits et le témoin positif. La différence est significative entre les différents traitements et le témoin négatif.

Les résultats du test *in vivo* pour *Alysicarpus ovalifolius* sont similaires à ceux de [27] pour son test des extraits de *Croton macrostachyus* où il a enregistré 70 et 80% de réduction de parasitémie pour F 400 et F 600 respectivement en ce qui concerne les extraits de fruits, mais aussi 75 et 80 % pour R 400 et R 600 respectivement pour les extraits de racines de la même plante.

5 CONCLUSION

L'étude a révélé que le décocté des racines de *Securidaca longipedunculata* avec 21,7 % a enregistré le rendement le plus élevé et c'est l'extrait du macéré aqueux de *Alysicarpus ovalifolius* (6,29 %) qui donne le plus faible rendement. Les extraits de *Alysicarpus ovalifolius* et *Artemisia annua* cultivée et récoltée au Niger sont classés comme non toxique et faiblement toxique pour les racines de *Securidaca longipedunculata* selon l'échelle de toxicité de 12'OCDE (2001). Ainsi, les différentes drogues peuvent être consommées par la population sans risque de toxicité.

Les feuilles de *Artemisia annua* cultivée et récoltée au Niger ont donnée de très bons résultats avec un taux de réduction de la parasitémie de plus de 80 %. La plante *Alysicarpus ovalifolius* utilisée comme antipaludéen au Niger sous forme de macéré a donné le meilleur résultat que *Securidaca longipedunculata* pour le test *in vivo* sur les souris infectées avec le *Plasmodium berghei* NK 65. Ainsi ces résultats ont montré une activité antiplasmodiale active pour *Alysicarpus ovalifolius* et faible pour *Securidaca longipedunculata*. Sur la base de ces résultats, les vertus antipaludiques de ces espèces spontanées se confirment d'où leur utilisation contre le paludisme par la population locale.

REFERENCES

- [1] Rodrigues E., 2007. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology* 111, 295–302.
- [2] Bouhadjera K., 2005. Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* r.br. et *Aristida pungens* L. Thèse de Doctorat d'état. Université Abou Bekr Belkaid Algerie. 143 p.
- [3] Yapo E. A., 1998. Les stratégies de valorisation de la médecine et de la pharmacopée traditionnelles africaines. Pharm. MM. Trad. Afr. Vol. 10. pp.95-99.
- [4] Hamburger M. & Hostettmann K., 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.* 30: 3864-3874.
- [5] Diarra M. N., 2003. Étude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali: *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae). Thèse de doctorat. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Université de Bamako. 78 p.
- [6] Harkati B., 2011. Valorisation et identification structurale de principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera Undulata*. Université Mentouri-constantine. Faculté des Sciences. Département de chimie. République Algérienne Démocratique et Populaire.
- [7] Portet B., 2007. Recherche bio guidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III. Paul Sabatier.
- [8] Mahamane A., Saadou M., Danjimo MMB, Saley K, Bakasso Yacoubou B, Diouf A, Morou B, Maaroufi M ITanimoune A 2009, Biodiversité Végétale au Niger: Etat des connaissances actuelles. Ann. Univ. Lomé (Togo), série Sciences, Tome XVIII: 81-93.
- [9] Kallo M. S., Adamou, R., Sawadogo, J., Mahamane, A. A., Maarouhi, I. M., & Ikhirri, K. (2018). Enquête ethnobotanique et criblage phytochimique de quelques plantes tinctoriales du Niger en vue d'une valorisation en énergie solaire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12 (2), 867-883.
- [10] Bekro Y-A, Mamyrbekova J, Boua B B, Bi F T, Ehile E E, 2007. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4 (2): 217-225.
- [11] Koffi A, Bla K, Yapi H, Bidie A, Djaman A. 2015. Phytochemical Screening of Some Medicinal Plants in Côte D'ivoire and Evaluation of their Extraction Efficiency. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7 (3): 563-569.
- [12] OCDE. (2001). Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques. Essai n° 423: toxicité orale aiguë - méthode de la dose prédéterminée.
- [13] Peter.W, Portus.H, Robinson.L (1975). The four-day suppressive *in vivo* antimalarial test. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69: 155–171.
- [14] Ousmane. M. A., 2005. Etude phytochimique et de l'activité antipaludique *in vivo* et *in vitro* de *Momordica balsamina* Linn. (Cucurbitaceae). Thèse de pharmacie, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-stomatologie Université du Mali, 129 p.
- [15] Bassène E., 2012. Initiation à la Recherche sur les Substances Naturelles; Extraction, Analyse, Essais Biologiques. *Presses Universitaires de Dakar: Dakar*.
- [16] Kingsley O., Oseni Lateef A., Olga Q., Stephen A., Mavis T., 2012. A comparative evaluation of *in vivo* antiplasmodial activity of aqueous leaf extracts of *Carica papaya*, *Azadirachta indica*, *Magnifera indica* and the combination thereof using plasmodium infected balb/c mice. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 3 (3): 372-378.
- [17] Watt M, Breyer-Brandwijk G., 1981. Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, E.and S. Livingstone Ltd, Edinburgh, London, 2nd Ed. p. 931–932.

- [18] Switch S, Jarilla S. 2004. Herbal medicine of the American Southwest. Tucson Clin. Bot. Med; 6 (1): 196.
- [19] Oigiangbe O. N., Igbiosa I. B., Tamo M., (2010). Insecticidal properties of an alkaloid from *Alstonia boonei* De Wild. *J. Biopesticides*. 3 (1): 265-270.
- [20] Milliken W., (1997). Malaria and Antimalarial Plants in Roraima. Brazil. *Trop. Doct*, 27, 20 - 24.
- [21] O'Neill M. J., Bray D. H., Boardman P, Wright C. W., Phillipson J.D., Warhurst D.C., Gupta M. P., Correya M., Solis P., 1988. Plants as sources of antimalarial drugs, part 6: Activity of *Simarouba amara* fruits. *J. Ethnopharmacology*, 183-190.
- [22] Saxena S., N. Pant, D.C. Jain and R.S. Bhakuni, 2003. Antimalarial Agents from Plant Sources. *Current Science*, 85 (9): 1314-1329.
- [23] Ramazani, A., S. Zakeri, S. Sardari, N. Khodakarim N. Djadid, 2010. In vitro and In Vivo Antimalarial Activity of *Boerhavia elegans* and *Solanum surattense*. *Malaria Journal*, 124.
- [24] Munoz V., Sauvain M., Bourdy G., 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the anti-malarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *J Ethnopharmacol*. 69: 127-137.
- [25] Rasoanaivo P., Deharo E., Rasitmamanga-Urverg, Frappier F., 2004. Guidelines for the nonclinical evaluation of the efficacy of traditional antimalarials: in *Traditional Medicinal plants and malaria*, 255-270.
- [26] Onifade O. F., Maganda V., 2015. In Vivo Activity of Ethanolic Extract of *Alstonia Boonei* Leaves against *Plasmodium berghei* in Mice. *JWHSD*, 1 (4), 60-68.
- [27] Mekonnen L. B., 2015. In vivo antimalarial activity of the crude root and fruit extracts of *Croton macrostachyus* (Euphorbiaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 5: 168 -173.