



ISSN: 0976-3376

Available Online at <http://www.journalajst.com>

ASIAN JOURNAL OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Asian Journal of Science and Technology
Vol. 10, Issue, 08, pp.9969-9977, August, 2019

RESEARCH ARTICLE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES FEUILLES DE *MELIA AZEDARACH* (L.) (MELIACEAE): EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIPLASMODIALE

^{1,*}Kady Diatta Badji, ¹William Diatta, ¹Alioune Dior Fall, ¹SerigneIbra Mbacké Dieng, ¹Amadou Ibrahima Mbaye, ²Aida S Badiane, ²Jessica Layousse and ¹Emmanuel Bassène

¹Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique, FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal

²Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Aristide LEDANTEC, Dakar, Sénégal

ARTICLE INFO

Article History:

Received 29th May, 2019
Received in revised form
14th June, 2019
Accepted 27th July, 2019
Published online 31st August, 2019

Key words:

Melia azedarach (L.),
Malaria,
Anti-plasmodial activity,
IC₅₀; Leaves

ABSTRACT

Melia azedarach (L.) is a tropical plant. It is used for therapeutic purposes around the world, especially in India. Studies have been led on its biological activities. However, they are few in number. Nowadays, there are more studies of its insecticide activity or its antifungal activity than on its anti-plasmodial activity. In our study, the plant material (leaves) was harvested from the experimental garden of useful plants at the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology at the Cheikh Anta Diop University in Dakar and dried in the laboratory away from the sun. Three extracts were made (ethanolic, hexanic and dichloromethane). These three extracts were used to lead biological research. Anti-plasmodial activity has been well observed in our extracts in dissimilar proportions. First ethanolic extract has a IC₅₀ of 3.478 mg/ml on clinical strains, 2.038 mg/ml on the laboratory strain "3D7" and a IC₅₀ of 0.4174 mg/ml on the laboratory strain "DD2". Next, hexanic extract has a IC₅₀ of 2.758 mg/ml on clinical strains, a IC₅₀ of 2.304 mg/ml on the "3D7" strain, and a IC₅₀ of 1.761 mg/ml on the "DD2" strain. Finally, dichloromethane extract has a IC₅₀ of 2.335 mg/ml on clinical strains, 2.522 mg/ml on the "3D7" strain and a IC₅₀ of 0.1620 mg/ml on the "DD2" strain. However, this activity is much less powerful than that of pure molecules known to fight malaria. Indeed, the IC₅₀s of our three extracts are included in an order of magnitude of 10⁻³ g/ml against an order of magnitude of 10⁻¹⁰ g/ml for chloroquine and artemisinin.

Citation: Kady Diatta Badji, William Diatta, Alioune Dior Fall, SerigneIbraMbacké Dieng, et al. 2019. "Contribution a l'étude des feuilles de melia azedarach (L.) (Meliaceae): Evaluation de l'activité antiplasmodiale", *Asian Journal of Science and Technology*, 10, (08), 9969-9977.

Copyright © 2019, Kady Diatta Badji et al. 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.

INTRODUCTION

A travers le monde les pharmacopées traditionnelles jouent et continuent de jouer un rôle très important dans la découverte de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique et particulièrement dans la lutte contre le paludisme. Ce dernier constitue 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 (MANZO, 2012). Face à l'apparition de résistance du parasite responsable, *Plasmodium falciparum*, aux médicaments de synthèse classiques, les ressources végétales constituent une grande opportunité. La médecine traditionnelle offre une masse considérable d'informations sur les plantes médicinales qui sont non seulement à bon marché et abondantes, mais aussi une partie intégrante de la réalité socioculturelle et selon le programme « faire reculer le paludisme en 1998 » plus de 60% des enfants souffrant de forte fièvre, sont traités à domicile à l'aide de médicaments à base de plantes (SANOGO, 2011).

Et aujourd'hui la meilleure option de traitement est la thérapie combinée à base d'artémisinine (ACT), qui est un principe actif extrait d'une plante chinoise appelée *Artemisia annua* que l'OMS préconise d'utiliser à la place de la chloroquine. 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. Le Sénégal 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 thérapies antipaludiques. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la recherche de l'activité antiplasmodiale du *Melia azedarach* (L.). Le *Melia azedarach* (L.), de la famille des Méliacées est retrouvé dans plusieurs parties du sous-continent indien et en Afrique. Plusieurs études ont prouvé que le *Melia azedarach* (L.) possède des activités antimicrobiennes (Vishnukanta, 2008), anti-inflammatoire (Sharma et al., 2013) anticancéreuse, antiseptique (Khan et al., 2001), antioxydante (Hertog et al., 1993) et de nombreuses autres activités.

*Corresponding author: Kady Diatta Badji,

Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique, FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal

Au Sénégal, cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme, d'où l'intérêt de notre étude sur la recherche de son activité antiplasmodiale.

MATERIELS ET METHODES

Matériels: Le matériel végétal a été récolté au jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (SENEGAL) en Juillet 2015 et les feuilles ont été identifiées et séchées à l'abri de soleil au Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie de Dakar. Centrifugeuse à plaques, Réfrigérateur, Congélateur, Rotavapor, Source de mélanges gazeux, Etuve, Microscope optique, Hotte à flux laminaire, Aspirateur, Agitateur, Deepwell, pHmètre, Fluoroskan ; Plaques, Micropipettes, Sang parasité, Milieu RPMI, HEPES, Hypoxanthine, Solution de gentamycine et de bicarbonate de sodium ; Sérum humain inactivé, Albumax II, Antipaludiques, Ethanol 90° et Eau distillée

Extraction: L'extraction a été réalisée par décoction de 100 g de poudre de drogue, porté à ébullition sous reflux dans 500 ml d'éthanol pendant 30 minutes. Après filtration, l'extrait éthanolique ainsi obtenu a été évaporé au Rotavapor pour obtenir un résidu sec. Pour l'extrait d'hexane, nous avons mis en contact 50 g de poudre avec 500 ml d'hexane dans une fiole de 1 litre. Le tout est porté à ébullition sous reflux. Cependant, cette opération n'a pas été répétée. En effet, ce sont des solvants très volatils. Le tout est ensuite évaporé. De la pierre ponce est ajoutée pour stabiliser l'ébullition. Après filtration, l'extrait hexanique est obtenu, et évaporé au rotavapor pour donner un résidu sec. Pour l'extrait dichlorométhane, 50g de poudre de drogue sont portés à ébullition sous reflux dans 500 ml de dichlorométhane ou acétate pendant 30 minutes. De la pierre ponce est ajoutée pour stabiliser l'ébullition. Après filtration, l'extrait dichlorométhane ainsi obtenu est évaporé au rotavapor pour donner un résidu sec.

Méthodes

Critères d'inclusions

Les critères d'inclusion sont

- Patient âgé entre 2 et 17 ans,
- Patient avec un poids supérieur à 8kg, et une glycémie supérieure à 0,4g/l,
- Patient capable de recevoir un traitement par voie orale,
- Infestation à *Plasmodium falciparum* uniquement, confirmée par une goutte épaisse et un frottis mince,
- Densité parasitaire comprise entre 1999 et 200 000 formes asexuées/ μ l,
- Température axillaire supérieure ou égale à 37,5°C,
- Absence d'antécédent de réaction d'hypersensibilité aux médicaments évalués,

Consentement éclairé de chaque participant ou des parents (tuteurs) pour les mineurs,

Patient vivant dans un rayon de 15 km.

Critères de non inclusions

Les critères de non inclusion sont

- Absence de consentement du malade ou de ses parents ou tuteurs pour les mineurs,
- Paludisme grave,
- Présence de parasites autres que *Plasmodium falciparum*,
- Grossesse,
- Critères d'exclusion propres à certains médicaments,
- Accès difficile au centre de santé.

Préparation à la culture: On met en culture plusieurs concentrations de nos extraits avec du sang parasité récolté à Thiès, et avec des souches de laboratoire.

Préparation et conservation des solutions mères: Afin d'éviter toute contamination et de créer une atmosphère stérile, les manipulations sont effectuées sous une hotte à flux laminaire. Nous avons pesé pour chacun des extraits 250 mg. Nous effectuons ensuite une dilution pour chacun des extraits. Pour cela, nous utilisons comme solvant du DMSO (DiMéthylSulfOxide). Nous avons choisi ce dernier car les extraits ont été réalisés avec des solvants non aqueux. Dans un tube à essai contenant 250 mg de l'extrait, nous ajoutons 10 ml de DMSO et 40 ml d'eau. Nous agitons bien le tout à l'aide d'un agitateur. L'extrait contenant de l'éthanol a bien été dissout. Nous répétons cette opération pour les deux autres extraits. Cependant, les deux autres extraits à savoir celui à base d'hexane et celui à base de dichlorométhane n'ont pu être bien dissout. Nous filtrons ensuite la solution mère. Cette solution obtenue a une concentration de 5mg/ml pour chacun des trois extraits. Avant leur utilisation, elles sont conservées dans un congélateur à - 20°C.

Préparation du milieu de lecture RPMI: Pour la préparation de la solution de RPMI:

- Nous prélevons 1000 ml d'eau distillée,
- Nous ajoutons 10,44 g de RPMI en poudre,
- Nous ajoutons 5,94 g d'HEPES,
- Nous ajoutons 0,05 g d'hypoxanthine qu'on met dans 1ml de NaOH à 1N car il ne se dissout pas facilement dans de l'eau distillée, 50 microlitre de gentamycine pour inhiber la prolifération bactérienne.

Nous mesurons le pH à l'aide d'un pH mètre. Il doit être de 6,75. Pour l'étalonner, nous le trempions dans des solutions tampons ayant des pH de 10, 7 et 14. Pour amener le pH à cette valeur, nous ajoutons soit de l'acide chlorhydrique pour le faire baisser, soit de la soude à 1 N pour l'augmenter. Nous filtrons enfin la solution de RPMI incomplet. Le milieu RPMI supplémenté est employé pour la culture des isolats cliniques et les isolats de laboratoire. La supplémentation est faite par addition d'albumax II à 5 % (25 ml) et de bicarbonate de sodium (28 ml) à 3,6 % au milieu RPMI préparé précédemment. Et enfin on ajoute 25 ml de sérum humain inactivé.

Préparation des séries de dilution: Nous utilisons un deepwell. Il contient 8 lignes de A à H et 12 colonnes de 1 à

12. Dans chaque puits utilisé, nous injectons 500 µL du milieu RPMI à partir de la troisième colonne sur les lignes B, D et E. Dans la deuxième colonne, nous injectons 1000 µL de l'extrait concentré à 5mg/ml. Donc nous avons mis en 2B l'extrait à base d'éthanol, en 2D l'extrait base d'acétate et en 2F l'extrait à base d'hexane. Puis, à l'aide d'une pipette, nous prenons 500 µL de la deuxième colonne que nous injectons dans la 3ème colonne. Cette colonne contient donc 500 µL de l'extrait et 500 µL de RPMI. De cette 3ème colonne, nous prélevons 500 µL que nous mettons dans la 4ème colonne. De cette 4ème colonne, nous prélevons 500 µL que nous mettons dans la 5ème colonne. Nous répétons cette action jusqu'à la 10ème colonne. Et arrivé à la 10ème colonne, nous prélevons 500 µL du tout que nous jetons. L'Artémisinine et la Chloroquine sont préparées en prélevant en 2F (provenant des plaques de mes promotionnaires) 2ml d'artémisinine composés de 375 µl d'artémisinine et de 1625 µL de RPMI. On prélève 500 µL que l'on injecte en 3F. Ce puits contenait déjà du milieu RPMI. Et nous effectuons la dilution de la même façon que nos extraits. La solution de chloroquine notée CQ et concentrée à 750 nmol / L soit $3,869 \times 10^{-4}$ mg / ml.

La solution d'artémisinine notée ART et concentrée à 150 nmol / L soit $4,235 \times 10^{-5}$ mg / ml.

Préparation des isolats: Les échantillons des patients sélectionnés sont centrifugés à 2500 tours / min durant 10 minutes. On obtient une séparation du sérum et du culot globulaire. Le sérum est aliquoté et est conservé à -20°C en attendant son utilisation. Le culot globulaire restant est lavé : nous ajoutons 10 ml de RPMI non supplémenté et nous procédons à une nouvelle centrifugation à 2500 tours / min durant 5 minutes. A la fin de la centrifugation, le surnageant est rejeté (lavage du culot). Cette étape est répétée encore une fois, permettant ainsi le lavage de l'échantillon par élimination des composants de l'immunité qu'il peut comporter (les leucocytes par exemple sont éliminés par ce lavage). Il est important de préciser que dans le cadre du protocole du SYBR Green, nous devons disposer d'isolats ayant:

- un hémocrite de 4 %
- une parasitémie de 0,5 %

Une évaluation de la parasitémie est réalisée sur le sang total issu des prélèvements par le biais d'un frottis sanguin. Si la parasitémie est inférieure à 0,5 %, on rejette l'échantillon, si elle est égale ou supérieure, l'échantillon est utilisé. Ensuite vient l'étape du réajustement de la parasitémie et de l'hématocrite: Nous cherchons à obtenir 60 ml de sang contenant du RPMI, du sang O+, et du sang parasité. Ces 60 ml permettent de cultiver toutes nos différentes plaques de culture. Nous voulons absolument avoir un hémocrite de 4 % et une parasitémie de 0,5 %. Notre échantillon 1 contenait 2,4 ml de sang parasité pour une parasitémie de 1,31 %. Donc pour avoir une parasitémie de 0,5 %, Nous prélevons donc 0,916 ml de sang parasité. L'hématocrite doit être de 4 %, et le Volume total est de 60 ml. Donc le Volume globulaire (Vgr) en est déduit. Ce Vgr correspond au volume de sang parasité et au volume de sang O+ nécessaire pour un hémocrite de 4 %, soit 2,4 ml. Nous prélevons ainsi toujours ce Vgr. Nous voulons un hémocrite de 4 % donc on prélève 2,4 ml-0,916 ml soit 1,484 ml de sang O+. Le volume de RPMI se déduit en faisant une soustraction à savoir 60-2,4 ml soit 57,6 ml. Pour calculer le volume de sang parasité et O + nous utilisons la formule de l'hématocrite:

$$\text{Hématocrite} = \frac{\text{Volume Globulaire}}{\text{Volume Total}}$$

Pour tous les autres échantillons de 2 à 10, nous avons choisi de prélever 70 ml de volume total. Soit pour un hémocrite de 4 %, le Vgr est de 2,8 ml. Une fois ce mélange préparé, on prélève 90 µL que l'on met dans chaque puits. Nous mélangeons ensuite le tout du moins concentré au plus concentré.

Conservation: Une fois les plaques de cultures faites, on les conserve à -20°C dans un congélateur, jusqu'à avoir cultivé toutes les plaques prévues. Cela permet d'effectuer la lecture de toutes les plaques en même temps.

Lecture

Préparation du SYBR GREEN: Nous dégelons les plaques en les laissant sur la paillasse à l'air libre. Nous préparons pendant ce temps la solution de lecture pour appliquer la méthode de SYBR GREEN.

Préparation de la solution tampon: Pour un litre de solution tampon à préparer nous avons besoin de:

- 40 ml de Tris-HCl 0,5 M,
- 10 ml d'EDTA 0,5 M,
- 4 ml de Saponine 1 %,
- 0,8 ml de Triton X-100,
- 945,2 ml de PBS 1X.

Après mélange de tous ces composants, nous obtenons un volume de 1000 ml de solution tampon conservable à 4°C. Le pH de la solution tampon doit être de 7,5. S'il n'est pas à cette valeur, on effectue l'ajustement du pH par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou de soude (NaOH).

Préparation de la solution tampon-SYBR GREEN: Le tampon – SYBR GREEN correspond à une solution tampon (pH = 7,5) additionnée de SYBR GREEN. On rajoute donc 0,2 µl de SYBR GREEN par ml de solution tampon obtenue précédemment. Ainsi, pour la préparation de 1000 ml de solution tampon – SYBR GREEN il est nécessaire d'ajouter 200 µl de SYBR GREEN à 1000 ml de solution tampon.

Préparation des plaques pour la lecture et lecture: Nous injectons 100 microlitres de solution tampon-SYBR GREEN dans chaque puit et on mélange le tout soigneusement. Nous laissons reposer pendant une heure dans une pièce sombre. Nous lisons ensuite l'absorbance à 485 et 530nm à l'aide du luoroskan®. Cet appareil détecte l'ADN du parasite *Plasmodium falciparum*. La lecture des plaques après traitement se fait à l'aide d'un dispositif automatique comportant le Fluoroskan®, couplé à un ordinateur muni des logiciels suivants : AscentFluorescan et PrismGraph 7.

Les souches de laboratoire: Nous travaillons avec la souche 3D7 et DD2. Ces deux souches sont prises comme référence. Nous connaissons entièrement leur génotype. Leurs résultats sont plus fiables. Il y a moins d'inconnues que pour les souches de terrains.

Types de souches: Nous travaillons avec deux types de souches:

3D7 et DD2. Leur génotype est connu. La souche 3D7 présente une sensibilité à la Chloroquine. La souche DD2 n'en présente pas.

La synchronisation: La synchronisation se fait à l'aide du sorbitol. Celui-ci stoppera leur développement au stade d'anneaux ou « ring stages ». Il tuera les trophozoïtes et les schizontes. Nous incubons ensuite pendant 12 heures. Nous prélevons 10ml. Ces 10ml sont placés dans la centrifugeuse. Nous la programmons à 5000 tours/min pendant 5 minutes. Nous jetons le surnageant et nous ajoutons au culot 5ml de sorbitol à 5%. Nous incubons le tout à 37°C pendant 10 minutes. Nous remettons le tout dans la centrifugeuse à 5000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé une fois avec le milieu media incomplet à 5000 tours/min pendant 5 minutes. Nous jetons le surnageant et nous y ajoutons du media et nous ensemençons dans une nouvelle boîte de pétrie.

La culture des souches de laboratoire en contact avec le parasite et la plante: Cette culture se fait de la même façon que pour les souches de terrains. On veut toujours une parasitémie à 0,5 %. Et on prépare toujours pour un volume total de 70 ml. Cette fois-ci, le mélange se fait du puit le moins concentré en parasites au puit le plus concentré en parasites.

La lecture: La lecture se fait grâce au Fluoroskan®. Cet appareil va détecter les ADN du parasite *Plasmodium falciparum*. La lecture se fait à 485 et 530 nm. Le Fluoroskan® est couplé à un ordinateur muni des logiciels suivants: AscentFluorescan et PrismGraph 7.

Analyses statistiques: Le logiciel AscentFluorescan est utilisé pour la lecture des plaques tandis que le logiciel GraphPadPrism (version 7) a été utilisé pour les calculs des CI_{50} .

RESULTATS

Résultats des souches de terrains et de laboratoire

CI_{50} des extraits avec les souches cliniques et les souches de laboratoire: Le tableau I récapitule les valeurs de la CI_{50} .

Répartition des patients selon le sexe: Notre population d'étude est constituée de trois patients de sexe féminin et sept patients de sexe masculin. Soit un pourcentage de 30% pour les femmes et 70% pour les hommes. Voici ci-dessous en figure 8 un diagramme représentant la répartition des patients en fonction du sexe.

Répartition des patients selon l'âge: Dans notre étude nous avons 10 patients âgés de 7 à 17 ans. Cela nous fait une moyenne d'âge de 12,2 ans.

P-value des trois extraits, de la Chloroquine et de l'Artémisine sur les souches cliniques: Le tableau III compare la P-value entre nos deux molécules et nos extraits sur les souches cliniques. Si $p < 0,05$ alors la P-value est significative. Si $p > 0,05$ alors elle est non significative. Le tableau IV compare la P-value entre nos trois extraits sur les souches cliniques

Répartition des patients selon la densité parasitaire: Les 10 patients recrutés ont une parasitémie comprise entre 0,77% et 4,12%. On a obtenu une moyenne de 1,835%.

Cette densité parasitaire est répartie en 4 classes:

- [0%-1%[avec 3 patients soit 30%
- [1%-2%[avec 4 patients soit 40%
- [2%-3%[avec 0 patient soit 0%
- [3%-4%[avec 2 patients soit 20%
- [4%-5%[avec 1 patient soit 10%

DISCUSSION

Nous avons étudié au laboratoire de l'Hôpital Aristide Le Dantec l'activité antiplasmodiale du *Melia azedarach* (L.). Les différentes CI_{50} obtenues sont comprises dans l'intervalle de série de dilutions. Cela signifie que le *Melia azedarach* (L.) présente une activité anti plasmodiale. Nous avons calculé, à l'aide d'un logiciel, les moyennes des CI_{50} des différents extraits et ainsi que les moyennes des CI_{50} de la chloroquine et de l'artémisinine qui ont été en contact avec les souches cliniques. Pour les souches de laboratoire, n'ayant testé qu'une seule fois ces souches, nous avons pris les valeurs de la CI_{50} obtenues par le logiciel.

Nous avons constaté plusieurs points: La moyenne des CI_{50} des extraits à base d'éthanol mis en contact avec les souches cliniques est de 3,478 mg/ml. La CI_{50} de l'extrait à base d'éthanol mis en contact avec la souche « 3D7 » est de 2,038 mg/ml. Cela montre que l'extrait à base d'éthanol est plus actif sur la souche de laboratoire que sur les souches cliniques. Cela peut être dû aux nombreuses inconnues que les souches cliniques possèdent. (Manzo L ,2012) a réalisé un extrait à base de méthanol et non d'éthanol. Il a obtenu sur la souche 3D7 une CI_{50} de $55,13 \times 10^{-3}$ mg/ml avec un intervalle de confiance de 10,67. L'extrait à base de méthanol semble plus actif que celui à base d'éthanol. La CI_{50} de l'extrait à base d'éthanol mis en contact avec la souche « DD2 » est de 0,4174 mg/ml. Cette CI_{50} est aussi inférieure à la moyenne des CI_{50} des souches cliniques. L'extrait éthanolique est aussi plus efficace sur la souche « DD2 » que sur les souches de terrains. Il a été beaucoup plus efficace que sur toutes les autres souches.

La moyenne des CI_{50} des extraits dichlorométhaniques mis en contact avec les souches cliniques est de 2,335 mg/ml. La CI_{50} de l'extrait à base de dichlorométhane mis en contact avec la souche de laboratoire « 3D7 » est de 2,304 mg/ml. L'extrait dichlorométhanique est donc légèrement plus actif sur la souche de laboratoire « 3D7 ». (Manzo L ,2012) a obtenu pour son extrait dichlorométhanique une CI_{50} de $19,14 \times 10^{-3}$ mg/ml avec une marge de 10,15. Nous avons obtenu des valeurs voisines. La CI_{50} obtenue avec la souche de laboratoire « DD2 » est de 1,761 mg/ml. Cet extrait est donc lui aussi beaucoup plus efficace sur la souche de laboratoire « DD2 ».

- La moyenne des CI_{50} des extraits à base d'hexane mis en contact avec les souches cliniques est de 2,758 mg/ml. La CI_{50} obtenue avec la souche de laboratoire « 3D7 » est de 2,304 mg/ml. Cet extrait est donc plus actif sur la souche de laboratoire « 3D7 » que sur les souches cliniques. Il a quand même une activité anti plasmodiale sur les souches cliniques. La CI_{50} obtenue avec la souche de laboratoire « DD2 » est de 0,1620 mg/ml. On constate donc que l'extrait à base d'éthanol est beaucoup plus efficace sur la souche de laboratoire « DD2 » que sur les souches cliniques. Cependant, il faut noter qu'il a une activité antiplasmodiale sur les souches cliniques

Tableau 1. Valeurs des CI₅₀ obtenues selon l'extrait

ID PATIENT	ETHANOL	Dichlm	HEXANE	CQ	ART
1	2,461	2,126	2,491	1,97E-5	Not converged
2	9,975	2,504	Not converged	4,731E-5	~ 4,838E-6
3	2,505	2,764	Not converged	3,61E-5	3,125E-7
4	1,236	3,799	0,4261	2,416E-5	3,61E-6
5	5,18	11315	7,791	0,0001593	5,25E-8
6	6,607E+8	6,607E+8	6,607E+8	7,356E-7	9,473E-8
7	14,53	0,02719	0,3192	3,48E-5	2,87E-6
8	0,07871	1,02E+11	5,15E-13	9,869E-7	Not converged
9	764,2	607,4	2,763	2,782E-6	6,20E-6
10	2,909	2,791	Not converged	0,0001351	5,266E-6
3D7	2,038	2,304	2,522	7,648E-7	2,36E-6
DD2	0,4174	1,761	0,1620	4,427E-5	2,21E-6

Not converged = non défini ; Dichlm : Dichlorométhane Les valeurs sont exprimées en mg/ml.

Tableau 2. Paramètres statistiques

ID/paramètres	Moyenne	Intervalle de confiance	Marge
Souches cliniques éthanol	3,478	0,4574 à 6,498	0,07871 à 9,975
Souches cliniques CH ₂ CL ₂	2,335	1,013 à 3,657	0,02719 à 3,799
Souches cliniques hexane	2,758	1,007 à 6,524	0,3192 à 7,791
Souches cliniques chloroquine	0,0000461	6,117E-6 à 8,608E-5	7,356E-7 à 0,0001593
Souches cliniques artémisine	2,63E-6	2,669E-7 à 4,992E-6	5,25E-8 à 6,2E-6

L'unité des moyennes est le mg/ml.

Tableau 3. Valeurs de la P-value entre la chloroquine et l'artémisine d'une part et nos trois extraits sur les souches cliniques

	CQ/ART	CQ/Ethanol	CQ/Hexane	CQ/DichlM	Art/Ethanol	Art/Hexane	Art/DichlM
P-value	Sign p=0,0418	Sign p<0,001	Sign P=0,0136	Sign p<0,001	Sign P=0,0001	Sign P=0,0262	Sign P=0,0001

Avec CQ= Chloroquin ; Art= Artémisine Sign= significative

Tableau IV . Valeurs de la P-value de nos trois extraits sur les souches cliniques

	Ethanol/Hexane	Ethanol/Dichlorométhane	Dichlorométhane/Hexane
P-Value	N S P> 0,05	N S P> 0,05	N S P> 0,05

NS : Non Significatif

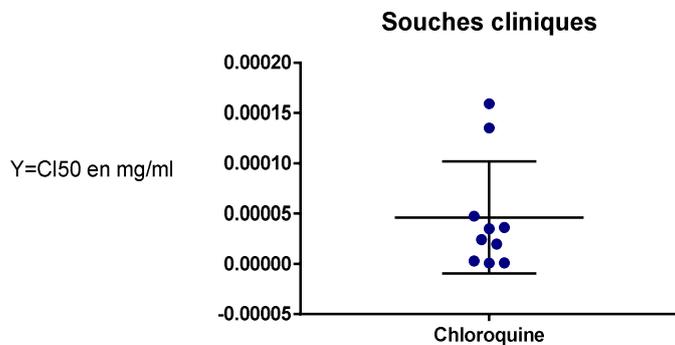


Figure 1. Graphique des CI₅₀ de la chloroquine sur les souches cliniques

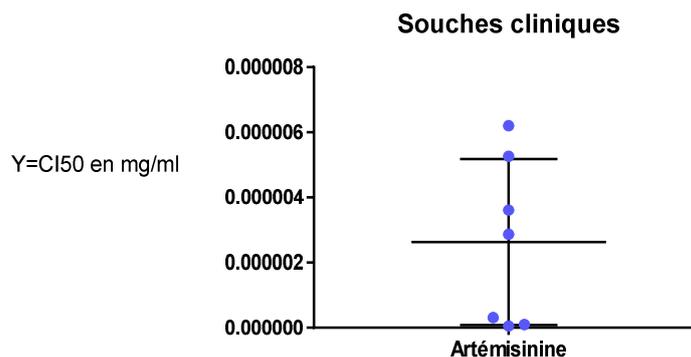


Figure 2. Graphique des CI₅₀ de l'artémisine sur les souches cliniques

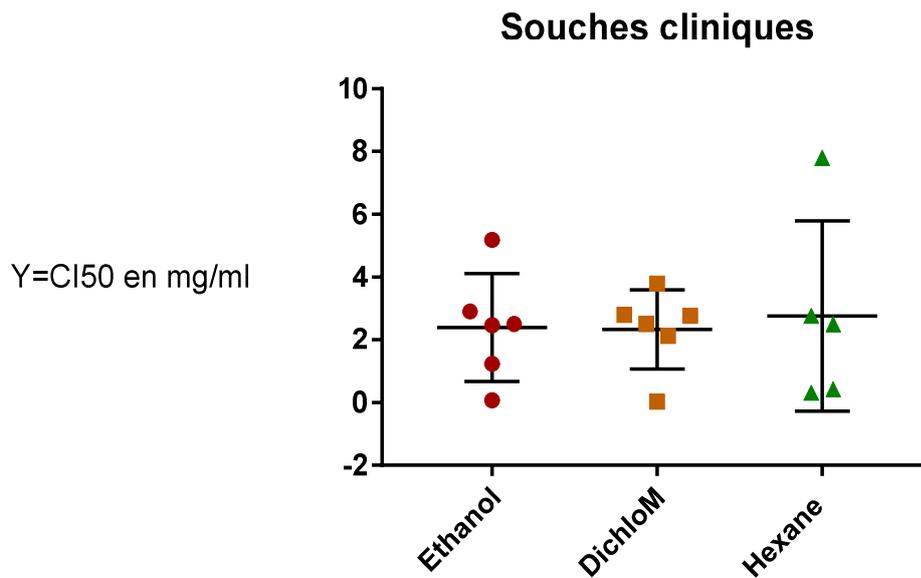


Figure 3. Graphique comparant les CI₅₀ des différents extraits sur les souches cliniques

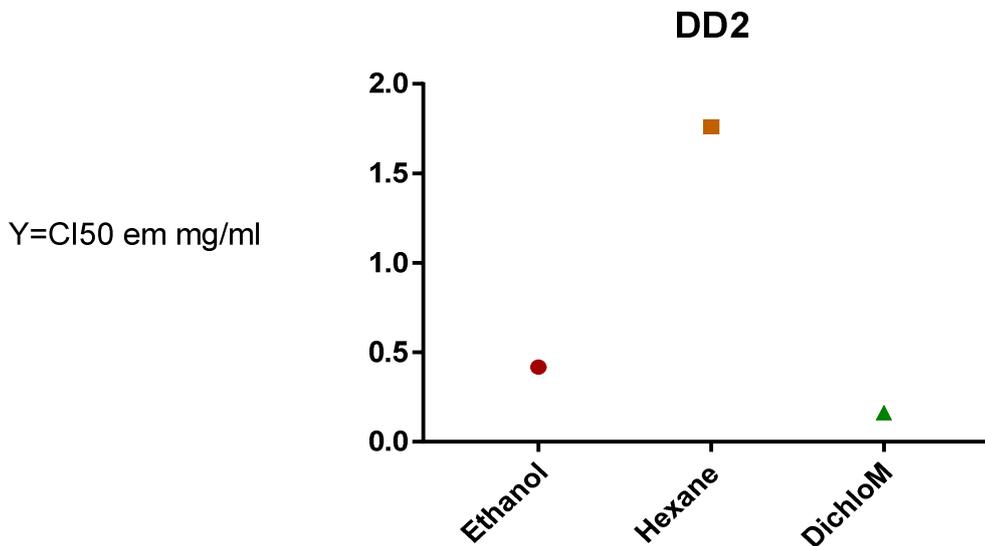


Figure 4. Graphique comparant les CI₅₀ des différents extraits avec la souche de laboratoire DD2

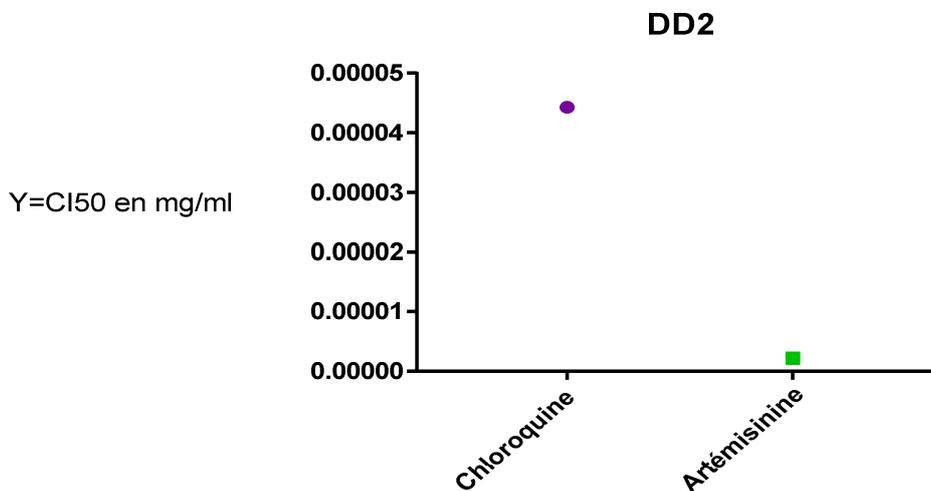


Figure 5. Graphiques comparant les CI₅₀ de la chloroquine et de l'artémisinine avec la souche de laboratoire DD2

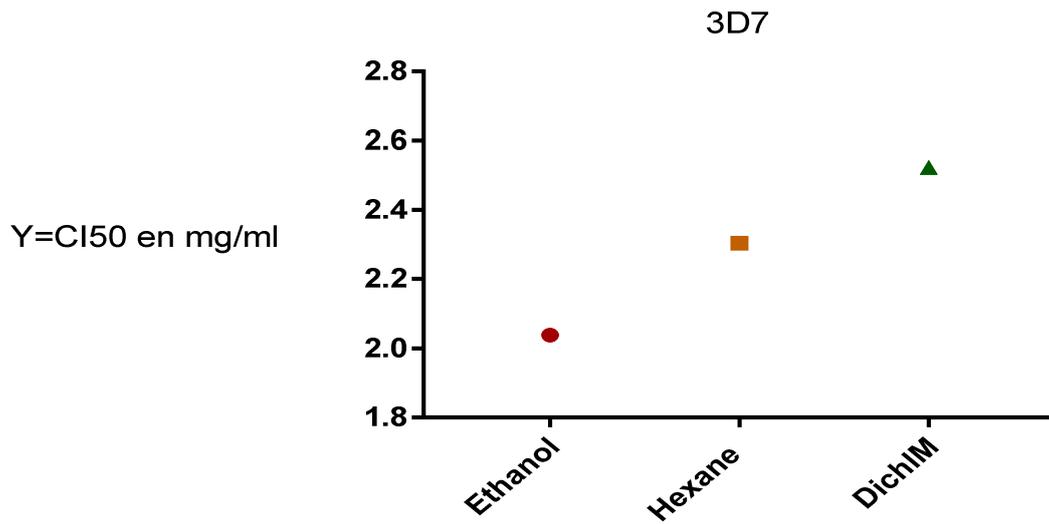


Figure 6. Graphique comparant les CI₅₀ des différents extraits avec la souche de laboratoire 3D7

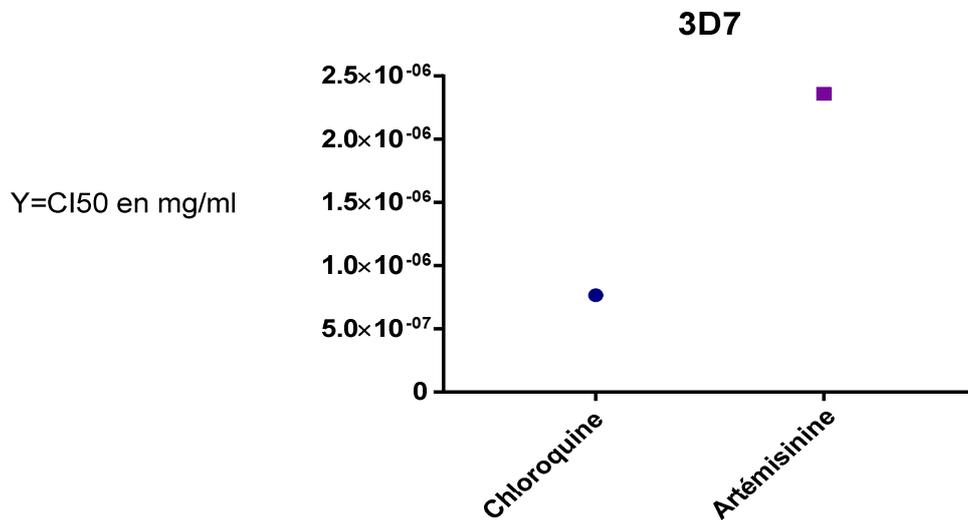


Figure 7. Graphiques comparant les CI₅₀ de la chloroquine et de l'artémisinine avec la souche de laboratoire 3D7

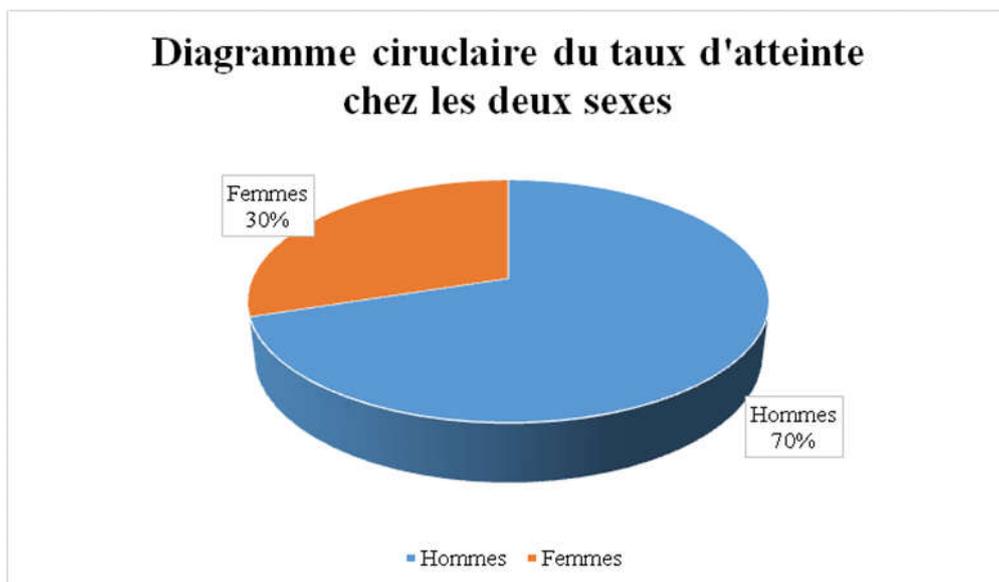


Figure 8. Répartition des échantillons en fonction du sexe du patient

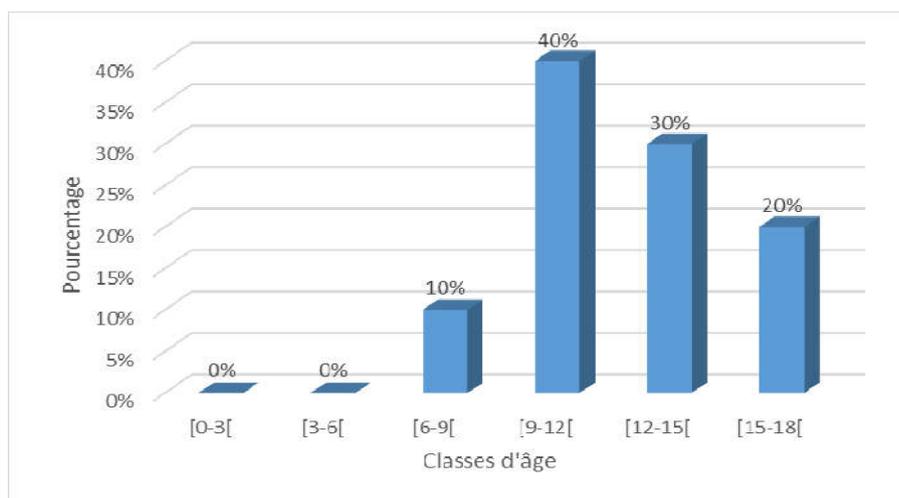


Figure 9. Répartition selon l'âge des patients

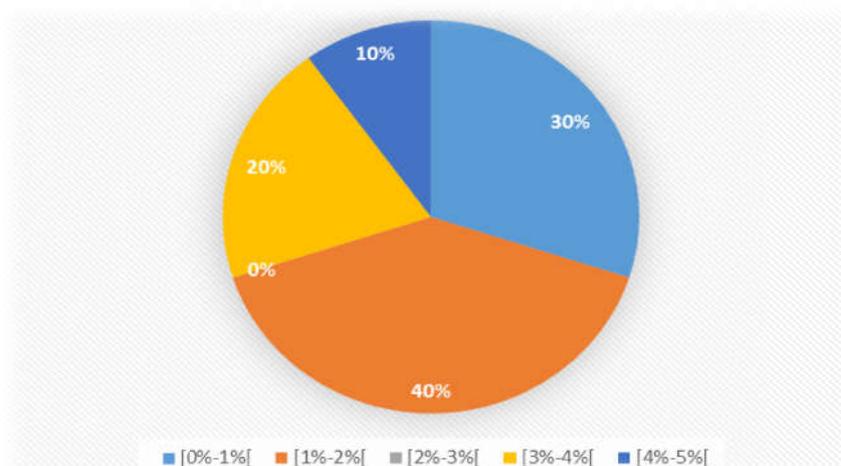


Figure 10. Répartition des échantillons selon la densité parasitaire

même si elle est moins efficace que sur les souches de laboratoire. La moyenne des CI_{50} obtenues avec la Chloroquine mis en contact avec les souches cliniques est de $4,61.10^{-5}$ mg/ml. La CI_{50} obtenue avec la souche de laboratoire « 3D7 » est de $7,648.10^{-7}$ mg/ml. La Chloroquine est donc plus efficace sur la souche « 3D7 ». Il faut toutes fois rappeler que la souche « 3D7 » est sensible à la Chloroquine. La CI_{50} obtenue avec la souche de laboratoire « DD2 » est de $4,42.10^{-5}$ mg/ml. La Chloroquine est donc légèrement plus efficace sur la souche de laboratoire « DD2 » que sur les souches cliniques. Elle a malgré cela une activité antiplasmodiale sur les souches cliniques. Plusieurs travaux s'accordent sur le fait que la CI_{50} de la Chloroquine est de 80 nM soit $2,559.10^{-5}$ mg/ml, on le note dans l'article scientifique (Al et al., (2000). Nous avons ici le même ordre de grandeur.

La moyenne des CI_{50} de l'Artémisinine mis en contact avec les souches cliniques est de $2,63.10^{-6}$ mg/ml. La CI_{50} de l'Artémisinine obtenue avec la souche de laboratoire « 3D7 » est de $2,36.10^{-6}$ mg/ml. L'Artémisinine a donc une activité légèrement plus efficace sur la souche de laboratoire « 3D7 ». La CI_{50} de l'Artémisinine obtenue avec la souche de laboratoire « DD2 » est de $2,21.10^{-6}$ mg/ml. L'Artémisinine a donc une activité légèrement plus efficace sur la souche de laboratoire que sur les souches cliniques.

Cependant elle a bien une activité sur les souches cliniques. En effet, plusieurs travaux s'accordent sur le fait que la CI_{50} de l'Artémisinine est de 10nM soit $2,823.10^{-6}$ mg/ml. L'article dénommé Resistance to artemisin Emerging Infectious Diseases (2006) appuie nos valeurs. Nos valeurs obtenues sont inférieures. Elle a donc bien une activité. (Yazback, 2016) a obtenu pour son extrait aqueux une CI_{50} de 1,541 mg/ml sur la souche « 3D7 », et son extrait hydro alcoolique une CI_{50} de 1,578 mg/ml. Nos valeurs des CI_{50} pour nos trois extraits sont inférieures aux siennes. Sa plante a été plus efficace que la nôtre. Cependant, c'est l'inverse pour la souche « DD2 ». En effet, pour son extrait aqueux il a eu une CI_{50} de 1,224 mg/ml, et pour son extrait hydro alcoolique une CI_{50} de 0,7759 mg/ml. Notre extrait éthanolique a obtenu une CI_{50} de 0,4174 mg/ml, notre extrait dichlorométhane une CI_{50} de 0,1620 mg/ml. Notre extrait hexanique lui, a obtenu une CI_{50} de 1,761 mg/ml. Notre plante est plus active sur cette souche de laboratoire. Nous avons aussi calculé, toujours à l'aide du même logiciel la P-value entre nos différents paramètres. Nous avons ainsi constaté que la P-value n'est pas inférieure à 0,05 entre nos extraits à base d'éthanol, de dichlorométhane et d'hexane. Il n'y a donc pas de différence significative entre eux. Néanmoins, nous avons constaté que la P-value entre la Chloroquine mis en contact avec les souches cliniques à base d'éthanol est inférieure à 0,001 et donc aussi inférieure à 0,05.

Il y a alors une différence significative entre la Chloroquine et l'extrait à base d'éthanol. Il en est de même pour la P-Value entre la Chloroquine et l'extrait à base de dichlorométhane. La P-value est inférieure à 0,001 ; elle est donc inférieure à 0,05. Il y a donc une différence significative. On retrouve la même situation pour la P-value entre l'extrait à base d'hexane et la Chloroquine. La P-Value obtenue est de 0,00136. Elle est inférieure à 0,005. Il y a donc une différence significative. Ces trois différences significatives sont normales. En effet, une molécule pure est beaucoup plus efficace qu'un extrait d'une plante qui contient plusieurs molécules et pas forcément celle dont on aurait besoin. Nous avons aussi constaté que, la P-value entre l'Artémisinine mis en contact avec les souches cliniques et l'extrait à base d'éthanol est de 0,001.

Elle est inférieure à 0,005. Il y'a alors une différence significative. La P-value entre l'Artémisinine mis en contact avec les souches cliniques et l'extrait à base de dichlorométhane mis en contact avec les souches cliniques est de 0,001. Elle est inférieure à 0,005 il y a donc une différence significative. La P-value obtenue entre l'Artémisinine mis en contact avec les souches cliniques et l'extrait à base d'hexane mis en contact avec les souches cliniques est de 0,00262. Elle est inférieure à 0,005. Il y'a donc une différence significative. Cette différence significative s'explique aussi de la même façon que pour la Chloroquine. En effet une molécule pure qui a une activité anti plasmodiale sera toujours beaucoup plus efficace qu'un extrait de plante contenant plusieurs molécules. La P-Value entre la Chloroquine et l'Artémisinine est significative. L'Artémisinine est plus efficace que la chloroquine. Un autre point à souligner est la prédominance de la maladie chez les hommes que les femmes. En effet, dans notre expérience, il y a 70% d'hommes contre 30% de femmes. Il semble que le paludisme atteint beaucoup plus les hommes que les femmes. (Diop 2013) appuie cette information. En effet il a recensé 421 hommes atteints du paludisme contre 299 femmes atteintes du paludisme. Soit un pourcentage de 58,47% pour les hommes contre 41,53% pour les femmes. Enfin un dernier point à débattre est le fait que les jeunes enfants, les adolescents sont beaucoup plus susceptibles de contracter le paludisme que les adultes. (Diop 2013) apporte une preuve de plus. En effet, il a trouvé que 83,89% des malades atteints du paludisme ont moins de 15 ans et que 16,11% sont des adultes.

Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que les feuilles de *Melia azedarach* (L) possèdent un pouvoir antiplasmodiale vérifié. Ceci est même confirmé par son utilisation des populations pour soigner le paludisme. Les résultats confirment que nos trois extraits peuvent être utilisés comme sources thérapeutiques supplémentaires pour venir à bout du paludisme. En outre, avec la cherté des médicaments d'origine synthétiques, l'utilisation des feuilles plus accessible pourrait être une alternative pour les populations démunies.

Enfin les études en perspectives pourraient guider à isoler et à identifier les molécules responsables de l'activité par la méthode bio guidée mais aussi de déterminer la toxicité aiguë et subaiguë des feuilles et de mettre sur pied des médicaments traditionnels améliorés (MTA) que nous pourrions intégrer dans les pharmacopées locales et dans le système des soins de santé primaires accessibles à toute la population.

Contributions Des Auteurs

La récolte et l'identification des parties de plantes utilisées ont été effectuées par JL, KDB et, WD ; SIMD, ADF, AIM ont participé à l'extraction et au criblage phytochimique. Les tests d'activité antiplasmodiale ont été réalisés par ASB, et JL. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement par ASB et JL. Enfin, la supervision des travaux et la rédaction de l'article ont été faites par EB et KDB.

Conflit D'intérêts: Nous déclarons qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts relatif à ce travail.

Remerciements: Nous remercions tout le personnel du laboratoire de Pharmacognosie et botanique et du laboratoire de Parasitologie de l'Hôpital Aristide LeDantec ainsi que D' Aminata Mbaye pour ses conseils et sa patience.

REFERENCES

- Al, R., Randrianariveolosia, M., Randriamanantena, A., La, R. Jaureguiberry, S., Ma,R., Rakotomalala, E., Ariey, F. 2000. Sensibilité de *Plasmodium falciparum* dans l'île de Sainte Marie, côte Est de Madagascar : études in vivo et in vitro. ArchInst Pasteur Madagascar, 2000, vol.66, n°1 et 2, p.26-31.
- Diop, A-K. 2013. Evaluation des paramètres biologiques (hématologique et biochimique) au cours du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* au Sénégal. Thèse d'exercice de médecine. Dakar : Université Cheikh Anta Diop, 2013, n°87.
- Hertog, M.G.L., Feskeens, E.J.M., Hollman,C.H., Katan,M.B., Kromhout,D. 1993. Dietary Antioxidant flavanoid and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly. Lancet.UK, 1993; 342:1007-11.
- Khan, M.R., Kihara, M., Omoloso, A.D. 2001. Antimicrobial activity of *Horsfieldiahelwigii* and *Melia azedarach*. Fitoterapia, 2001, vol. 72, p.423-427.
- LusakibanzaManzo, M. 2012. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle congolaise. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Kinshasa : université de kinshasa, 2011-2012. n° 156.
- Resistance to artemisin Emerging Infectious Diseases. Novembre 2006, vol.12, n°11, p.1798-1799 Disponible sur <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/11/pdfs/06-0903.pdf>
- Sanogo R. 2011. Médicaments à base de plantes : réglementation et intégration dans le système de santé en Afrique, Ethnopharmacologie appliquée de la plantes au médicament 14^{ème} Formation du 5 au 15 septembre 2011 à Metz. 31p.
- Sharma, D., Yash, P. 2013. Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach* L.: An Overview. Journal of Applied Pharmaceutical Science, December 2013, Vol. 3, n°12, p. 133-138.
- VishnukantaAcr 2008. Screening of phytochemical and antimicrobial activity of *Meliaazedarach* Phcog Rev: plant Rev, 2008, 2 (3), 173-179.
- Yazback, M 2016. Contribution à l'étude de *AzadirachtaIndica* A. Juss. (Meliaceae): screening chimique et recherche de l'activité antiplasmodiale. Thèse d'exercice de pharmacie. Dakar: UniversitéCheikh Anta Diop, 2016, n°104.