

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE
SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-
inflammatoire *in vitro* des fractions
granulométriques de la poudre d'écorce de
*Lepidobotrys staudtii***

Mémoire soumis comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en
Biochimie

Option : Biotechnologie et Développement

Par :

SINGABE BEYALEM

Matricule : 19B2039

Licencié ès-Sciences



Sous la direction de :

KOUOH ELOMBO Ferdinand, Ph.D.
(Chargé de cours, UY1)

Année académique : 2024-2025

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE
SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-
inflammatoire *in vitro* des fractions
granulométriques de la poudre d'écorce de
*Lepidobotrys staudtii***

Mémoire soumis comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en
Biochimie

Option : Biotechnologie et Développement

Par :

SINGABE BEYALEM

Matricule : 19B2039

Licencié ès-Sciences

Sous la direction de :

KOUOH ELOMBO Ferdinand, Ph.D.
(Chargé de cours, UY1)

Année académique : 2024-2025

DEDICACE

À

La famille **BEYALEM**.

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu de m'avoir donné la santé, la force et la volonté d'entamer et de terminer ce modeste travail. Aussi, je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont rendu possible ce travail. Il s'agit :

- Du Docteur **KOUOH ELOMBO Ferdinand**, mon directeur de mémoire. Je vous témoigne ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Votre expertise et votre rigueur scientifique m'ont toujours été d'un grand apport dans l'accomplissement de ce mémoire ;
- Du professeur **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie (LPT) de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I pour m'avoir accueilli et permis la réalisation de ce travail au LPT;
- De tous les **Enseignants** du Département de Biochimie pour la formation académique reçue ;
- De **M. KEUMEDJIO Paulin**, qui était disponible pour la récolte de la plante. Votre aide a été cruciale afin que je puisse mener à bien ma recherche et atteindre mes objectifs ;
- De mes aînés du laboratoire, en particulier **M. ENANG II EDIE Brice Junior**, **M. NJINGOU Ibrahim**, **M. NGOHOBBA Vigny Sayal**, **M. AGOUACK SAMBA Roche Carel** et **M. CHURUPOUO Lesli-Loïc** pour votre assistance sans faille, votre disponibilité et vos conseils ;
- De mes camarades de promotion, particulièrement **TCHUENKAM BOUGUE Suzy Princesse** et **NOUMECHI SOUOP Darel Kimberly** pour votre assistance lors de la réalisation de ce travail qui en quelque sorte est aussi le vôtre ;
- De toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie et celle du Laboratoire de Phytobiochimie et d'Étude de Plantes Médicinales (Unité des Agents Antimicrobiens et de Biocontrôle) de l'Université de Yaoundé I ;
- De mes chers parents **BEYALEM NDADJIBA** et **LARLEM Thamar** pour le soutien inconditionnel dans l'accomplissement de ce travail ;
- De mon cousin Docteur **Dagoto Christian** pour le soutien multiforme apporté durant la réalisation de ce travail ;
- De mes frères, mes sœurs, mes cousins et cousines pour leurs encouragements et précieux conseils ;
- De la **famille NEHOUDOU**, pour leur accueil et soutien durant mon séjour à Yaoundé ;
- De toutes mes connaissances qui m'ont aidé de près ou de loin de diverses façons pour la réalisation de ce modeste travail et dont les noms auraient involontairement été omis. Je leur exprime mes sincères reconnaissances.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-------------|
| DEDICACE..... | i |
| REMERCIEMENTS..... | ii |
| LISTE DES FIGURES..... | v |
| LISTES DES TABLEAUX..... | vi |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES..... | vii |
| RESUME..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE..... | 3 |
| I.1. Généralités sur le paludisme..... | 3 |
| I.1.1. Définition étymologique du paludisme..... | 3 |
| I.1.2. Répartition mondiale du paludisme..... | 3 |
| I.1.3. Agents pathogènes et vecteur..... | 4 |
| I.1.4. Mode de transmission..... | 5 |
| I.1.5. Cycle de vie du plasmodium..... | 6 |
| I.1.6. Physiopathologie du paludisme..... | 7 |
| I.1.7. Traitement du paludisme..... | 9 |
| I.1.8. Chimiorésistance du <i>Plasmodium</i> | 10 |
| I.2. Stress oxydatif..... | 10 |
| I.2.1. Généralités sur le stress oxydatif..... | 10 |
| I.2.2. Conséquences du stress oxydatif..... | 11 |
| I.2.3. Lien entre le stress oxydatif et le paludisme..... | 12 |
| I.2.4. Systèmes antioxydants..... | 13 |
| I.3. Inflammation..... | 15 |
| I.3.1. Généralités sur l'inflammation..... | 15 |
| I.3.2. Typologie de l'inflammation..... | 16 |
| I.4. Généralités et travaux antérieurs sur le <i>Lepidobotrys staudtii</i>..... | 24 |
| CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES..... | 26 |
| II.1. Matériel..... | 26 |
| II.1.1. Matériel biologique, préparation des fractions et d'extraits..... | 26 |
| II.1.2. Préparation des fractions..... | 27 |
| II.1.3. Préparation des extraits..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| II.2. Méthodes | 27 |
| II.2.1. Criblage phytochimique et dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux..... | 27 |
| II.2.2. Évaluation de l'activité antioxydante de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 31 |
| II.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 34 |
| II.2.4. Méthode de sélection de meilleurs extraits de fractions antioxydant et anti-inflammatoire | 38 |
| II.2.5. Étude de l'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 39 |
| II.2.6. Analyse statistique | 42 |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION | 43 |
| III.1. Résultats | 43 |
| III.1.1. Rendements d'extraction..... | 43 |
| III.1.2. Profil phytochimique et taux des composés phénoliques totaux et flavonoïdes .. | 43 |
| III.1.3. Activité antioxydante des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 44 |
| III.1.4. Activité anti-inflammatoire des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> ... | 47 |
| III.1.5. Meilleurs extraits de fractions antioxydant et anti-inflammatoire | 49 |
| III.1.6. Activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 50 |
| III.2. Discussion | 51 |
| CONCLUSION | 55 |
| PERSPECTIVES | 55 |
| REFERENCES | 56 |
| ANNEXES | a |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Répartition mondiale du paludisme | 3 |
| Figure 2: Un Anophèles albimanus se nourrissant de sang sur un bras humain | 5 |
| Figure 3 : Cycle de développement du <i>Plasmodium</i> | 6 |
| Figure 4 : Représentation de la cytoadhérence et formation de rosettes dans le système vasculaire post-capillaire | 9 |
| Figure 5 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants..... | 11 |
| Figure 6 : conséquences pathogènes du stress oxydant..... | 12 |
| Figure 7 : Sources de stress oxydatif dans le paludisme | 13 |
| Figure 8 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes | 15 |
| Figure 9 : Processus de l'inflammation aigue | 17 |
| Figure 10 : Réponse immunitaire innée à l'infection par <i>Plasmodium</i> au stade sanguin dans la rate | 21 |
| Figure 11 : Régulation de l'expression génique par les glucocorticoïdes..... | 22 |
| Figure 12 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens..... | 23 |
| Figure 13 : Photographie de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 25 |
| Figure 14 : Hématimètre de Malassez | 35 |
| Figure 15 : Taux des composés phénoliques totaux et flavonoïdes des extraits de fractions de la plante..... | 44 |
| Figure 16 : Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 47 |
| Figure 17 : Cytotoxicité au MTT des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> sur une culture primaire de macrophage..... | 48 |

LISTES DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Famille des <i>Culicidae</i> | 5 |
| Tableau 2 : Cellules de l'inflammation | 18 |
| Tableau 3 : Sources et actions des principaux médiateurs inflammatoires | 19 |
| Tableau 4: Classification taxonomique de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 25 |
| Tableau 5 : Étalonnage des polyphénols | 30 |
| Tableau 6 : Étalonnage des flavonoïdes | 30 |
| Tableau 7 : Rendements d'extraction | 43 |
| Tableau 8 : Résultats du criblage phytochimique | 43 |
| Tableau 9 : CI ₅₀ de l'activité de piégeage du radical DPPH par les fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 45 |
| Tableau 10 : CE ₅₀ de l'activité réductrice du fer des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 45 |
| Tableau 11 : CI ₅₀ de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> | 46 |
| Tableau 12 : CI ₅₀ de l'activité inhibitrice des extraits de fractions de la plante sur la production du NO | 48 |
| Tableau 13 : CI ₅₀ de l'activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase par les extraits de fractions de la plante | 49 |
| Tableau 14 : Calcul de scores | 49 |
| Tableau 15 : CI ₅₀ des extraits de fractions de <i>Lepidobotrys staudtii</i> sur <i>Pf3D7</i> et <i>PfDd2</i> | 50 |
| Tableau 16 : Critères de classification de l'activité antiplasmodiale des extraits de fractions | 50 |

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

| | |
|-----------------------------|--|
| AA : | Acide Ascorbique |
| AINS : | Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens |
| AIS : | Anti-inflammatoires Stéroïdiens |
| ATB : | Acide Thio Barbiturique |
| ATC : | Acide Trichloracétique |
| CAT | Capacité antioxydante totale |
| DMSO : | Diméthylsulfoxyde |
| DPPH : | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl |
| ERNs | Espèces réactives de l'azotes |
| EORs : | Espèces Oxygénées Réactives |
| FRAP : | Pouvoir Réducteur du Fer d'un Agent |
| IC₅₀ : | Concentration Inhibitrice 50 |
| LTB₄ : | Leucotriène B ₄ |
| MDA : | Malondialdéhyde |
| mgEqAA/g d'extrait : | Milligramme Équivalent d'Acide Ascorbique par gramme d'extrait |
| MTT : | 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium |
| NO : | <i>Nitrique Oxide</i> |
| PBS : | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PG_s : | Prostaglandines |
| RPMI : | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SC : | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| TLR-4 : | <i>Toll Like Receptor 4</i> |

RESUME

Le paludisme est un problème majeur de santé publique avec un taux élevé de morbidité et mortalité puis une résistance croissante de *P. falciparum* aux antipaludiques disponibles. Il devient donc urgent de rechercher de nouvelles solutions thérapeutiques face à cette situation. De ce fait, nous avons entrepris d'explorer des alternatives, notamment à travers les savoirs traditionnels. Dans ce contexte, notre étude s'intéresse à *Lepidobotrys staudtii*, une plante utilisée par les pygmées Baka du Cameroun contre le paludisme. L'objectif de notre travail vise à évaluer les potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro* des fractions granulométriques de *L. staudtii*. Ces fractions granulométriques ont été obtenues par tamisage et nous ont permis de préparer les extraits aqueux par décoction suivie d'un criblage phytochimique. Le potentiel antioxydant a été évalué par les tests : piégeage du DPPH°, FRAP, CAT et l'inhibition de la peroxydation lipidique. Le potentiel anti-inflammatoire a été déterminé par rapport à l'inhibition de la production de l'oxyde nitrique (NO) et l'activité de la 5-lipoxygénase (5-LOX) sur une culture de macrophages activés. Les extraits de fractions les plus actifs ont été retenus pour l'évaluation du potentiel antiplasmodial sur les souches de *P. falciparum* chloroquino-sensible (*Pf3D7*) et multi-résistante (*PfDd2*). Les résultats ont révélé que l'extrait de la fraction <100µm (D) présente la meilleure activité antioxydante (CI₅₀=2,96±0,04µg/ml pour le piégeage de DPPH° ; CE₅₀=15,55±0,04µg/ml pour le FRAP et CI₅₀=24,68±1,15µg/ml pour l'inhibition de la peroxydation lipidique) comparativement à l'acide ascorbique. De plus, l'extrait de la fraction <100µm (D) a montré une teneur élevée en CAT (1773±37,91 mgEqAA/g d'extrait). Pour l'activité anti-inflammatoire, l'extrait de la fraction >300µm (A) a montré une forte teneur en flavonoïdes (8,42±0,09 mgEqQ/g d'extrait), une forte inhibition de la production du NO (CI₅₀=0,12±0,01µg/ml) et de l'activité de la 5-LOX (CI₅₀=0,21±0,01µg/ml) comparativement au baicalin. Pour ce qui est du test antiplasmodial, l'extrait de la fraction >300µm (A) a présenté une activité modérée (CI₅₀=19,42±1,21µg/ml et CI₅₀=21,88±1,69µg/ml) sur *PfDd2* et *Pf3D7* respectivement. Cependant, l'extrait de la fraction <100µm (D) a montré une activité modérée (CI₅₀=19,88±2,00µg/ml) uniquement sur *Pf3D7*. Le combiné (Z) (50:50) de A et D a montré une activité prometteuse (CI₅₀=8,8±1,08µg/ml) sur *Pf3D7* et une activité modérée (CI₅₀=29,85±3,65µg/ml) sur *PfDd2*.

En conclusion, A et Z sont de potentiels candidats phytomédicaments.

Mots clés : *Lepidobotrys staudtii* ; antiplasmodial ; antioxydant ; anti-inflammatoire.

ABSTRACT

Malaria is a major public health problem with high morbidity and mortality rates and growing resistance of *P. falciparum* to available antimalarial drugs. It is therefore urgent to seek new therapeutic solutions to this situation. We have therefore undertaken to explore alternatives, particularly through traditional knowledge. In this context, our study focuses on *Lepidobotrys staudtii*, a plant used by the Baka pygmies of Cameroon to treat malaria. The aim of our work is to evaluate the antiplasmodial, antioxidant and anti-inflammatory potential *in vitro* of the granulometric fractions of *L. staudtii*. These granulometric fractions were obtained by sieving and enabled us to prepare aqueous extracts by decoction followed by phytochemical screening. Antioxidant potential was evaluated using the following tests: DPPH° scavenging, FRAP, CAT, and lipid peroxidation inhibition. The anti-inflammatory potential was determined in relation to the inhibition of nitric oxide (NO) production and 5-lipoxygenase (5-LOX) activity on a culture of activated macrophages. The most active fraction extracts were selected for evaluation of antiplasmodial potential on chloroquine-sensitive (*Pf3D7*) and multi-resistant (*PfDd2*) strains of *P. falciparum*. The results revealed that the extract from the <100µm fraction (D) exhibited the best antioxidant activity ($IC_{50}=2.96\pm 0.04\mu\text{g/ml}$ for DPPH° scavenging; $EC_{50}=15.55\pm 0.04\mu\text{g/ml}$ for FRAP and $EC_{50}=24.68\pm 1.15\mu\text{g/ml}$ for lipid peroxidation inhibition) compared to ascorbic acid. In addition, the extract from the <100µm fraction (D) showed a high CAT content ($1773\pm 37.91\text{ mgEqAA/g extract}$). For anti-inflammatory activity, the extract from the >300µm fraction (A) showed a high flavonoid content ($8.42\pm 0.09\text{ mgEqQ/g extract}$), strong inhibition of NO production ($IC_{50}=0.12\pm 0.01\mu\text{g/ml}$) and 5-LOX activity ($IC_{50}=0.21\pm 0.01\mu\text{g/ml}$) compared to baicalin. In the antiplasmodial test, the extract of the >300µm fraction (A) showed moderate activity ($IC_{50}=19.42\pm 1.21\mu\text{g/ml}$ and $IC_{50}=21.88\pm 1.69\mu\text{g/ml}$) on *PfDd2* and *Pf3D7*, respectively. However, the extract from the fraction <100µm (D) showed moderate activity ($IC_{50}=19.88\pm 2.00\mu\text{g/ml}$) only on *Pf3D7*. The combination (Z) (50:50) of A and D showed promising activity ($IC_{50}=8.8\pm 1.08\mu\text{g/ml}$) on *Pf3D7* and moderate activity ($IC_{50}=29.85\pm 3.65\mu\text{g/ml}$) on *PfDd2*. In conclusion, A and Z are potential phytomedicine candidates.

Keywords: *Lepidobotrys staudtii*; antiplasmodial; antioxidant; anti-inflammatory.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie infectieuse causée par un parasite du genre *Plasmodium* et transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique Anophèle femelle infecté **(PSNLP, 2019)**. Cette affection demeure un problème majeur de santé publique. En 2023, on a estimé à 263 millions le nombre de cas et à 597 000 le nombre de décès dus au paludisme dans le monde **(OMS, 2024)**. L'Afrique concentre environ 94% des cas et 95% des décès, principalement dus à *Plasmodium falciparum*. Cette affection touche le plus les enfants de moins de 5 ans (76% des décès liés au paludisme) et les femmes enceintes **(OMS, 2024 ; PNLN, 2022)**. Le Cameroun se classe onzième en terme de mortalité liée au paludisme en Afrique avec 26,1% de décès en 2022 et environ 7,3 millions de cas et 11 600 décès estimés en 2023) **(WHO, 2024)**.

La prise en charge du paludisme repose essentiellement sur l'utilisation de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT). Cependant, l'émergence de souches de *Plasmodium falciparum* avec une résistance retardée à l'artémisinine, composant clé de ces traitements, constitue un défi majeur et compromet les efforts de lutte contre cette maladie. Cette situation justifie la nécessité d'intensifier la recherche de nouvelles molécules antipaludiques **(Koffi et al., 2020)**.

Sur le plan physiopathologique, le paludisme se caractérise par une forte activation inflammatoire et oxydative. Si la production des radicaux libres par les phagocytes de l'hôte contribue à l'élimination du *Plasmodium*, leur excès peut provoquer des lésions cellulaires, amplifier la réponse inflammatoire et aggraver la pathologie. Les espèces réactives de l'oxygène activent la transcription de gènes pro-oxydants via le facteur NF- κ B entraînant l'activation de l'inflammasome et une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-6 etc.) **(Vasquez et al., 2021)**. Ainsi, il est donc essentiel de développer des agents thérapeutiques présentant à la fois des propriétés antiplasmodiale, antioxydante et anti-inflammatoire **(Abdel Azizi et al., 2023)**.

Dans ce contexte, les plantes *médicinales* constituent une alternative thérapeutique prometteuse. En effet, plusieurs antipaludiques efficaces, tels que l'artémisinine et la quinine, sont issues de plantes : *Artemisia annua L.* et *Cinchona spp.*, respectivement **(Njomnang, 2007)**.

Lepidobotrys staudtii, plante appartenant à la famille de Lepidobotryaceae, est traditionnellement utilisée par les pygmées Baka du Sud-Est du Cameroun sous forme de décoction contre le paludisme **(Tane et al., 1996)**. Des travaux antérieurs ont permis d'isoler plusieurs composés bioactifs de cette espèce, notamment trois triterpènes dihydroxy-3-

friedélanone (Tane *et al.*, 1996) et trois gallotanins présentant une activité inhibitrice du VIH (Bokesch *et al.*, 1996). De plus, une étude a révélé la présence de métabolites secondaires tels que les phénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, saponines, glycosides et protéines responsable de son potentiel pharmacologique, notamment antioxydant et antiplasmodial avec les extraits bruts (décocté) et des fractions à base de solvants organiques (Pekam *et al.*, 2025). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué les potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* d'où nous avons entrepris d'étudier ces potentiels des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* afin de ressortir la meilleure fraction granulométrique pour le développement de phytomédicament antipaludique.

Hypothèse de travail:

Les fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* possèdent des potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire.

Objectif général :

Évaluer *in vitro* les potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii*.

Objectifs spécifiques :

- Déterminer le potentiel antioxydant des extraits des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* ;
- Déterminer le potentiel anti-inflammatoire des extraits des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* ;
- Déterminer le potentiel antiplasmodial des extraits des fractions granulométriques les plus actifs.

CHAPITRE I :
REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur le paludisme

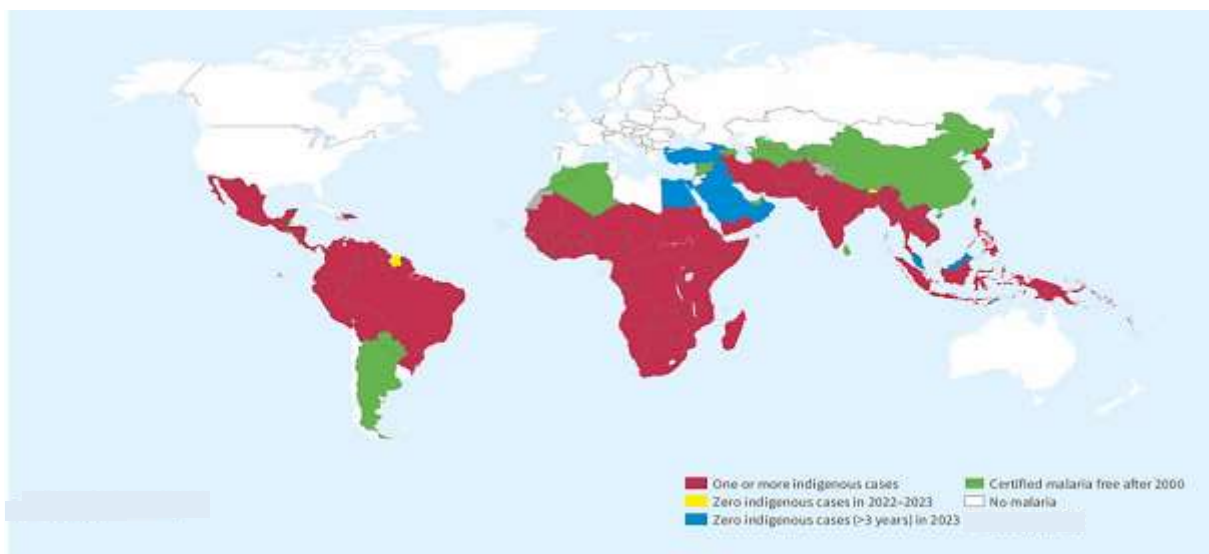
I.1.1. Définition étymologique du paludisme

Dérivé du français « palud », lui-même dérivé du latin « palus » signifie « marécage ou marais », le paludisme était qualifié de maladie des marais. Bien qu'il soit un facteur de propagation du paludisme, le mauvais air émanant des marécages était tenu (à tort) responsable de la propagation de cette maladie. Ce qui lui valut aussi l'appellation de malaria (mauvais air) (Ambroise-Thomas, 2007). C'est en 1897 que le médecin anglais Ronald Ross prouva le rôle des moustiques femelles, l'anophèle dans la transmission de cette maladie (CDC, 2015).

Le paludisme (malaria en anglais), est une maladie parasitaire causé par un parasite du genre *Plasmodium* et transmise à par la piqûre d'un moustique femelle, du genre anophèle (PSNLP, 2019).

I.1.2. Répartition mondiale du paludisme

On a dénombré 263 millions de cas de paludisme en 2023 à travers le monde, contre 252 millions en 2022 soit 11 millions de cas de plus en 2023 par rapport en 2022. Le nombre total de décès dû au paludisme a atteint 597 000 en 2023 contre 600 000 en 2022 (OMS, 2024). Bien que le nombre de décès ait diminué entre 2022 et 2023, le paludisme demeure toujours inquiétant. La région Afrique de l'OMS continue de payer le plus lourd tribut au paludisme, cumulant à elle seule 94% du nombre total des cas de paludisme et 95% des décès associé au niveau mondial en 2023. Les enfants de moins de cinq étant les couches les plus vulnérables (OMS, 2024).



Le Cameroun fait partie des 11 pays africains qui, à eux seuls supportent plus de 70% de l'incidence mondiale du paludisme et plus de 73% de la mortalité palustre de toutes la planète (WHO, 2024). Sur le plan national, le nombre des cas enregistrés dans les formations sanitaires du pays représente 29,1% des motifs de consultation et 17,2% des décès survenus dans les formations sanitaires. Les femmes enceintes et les enfants de moins de 05 ans sont les plus touchés par la maladie (PNLP, 2022).

I.1.3. Agents pathogènes et vecteur

I.1.3.1. Agents pathogènes

Le paludisme est causé par un parasite hématophage protozoaire du genre *Plasmodium*. Il y a plus de 120 espèces de *Plasmodium* infectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles, seules cinq sont connues pour infecter les humains (Ashley *et al.*, 2018).

- *Plasmodium falciparum* : cette espèce est la plus dangereuse car elle occasionne un paludisme entraînant en général une mortalité importante et développe aujourd'hui une résistance contre la chloroquine dans de nombreux pays. Il est essentiellement retrouvé en Afrique tropicale, en Amérique Centrale et du Sud, en Asie du Sud Est (Pradine *et al.*, 2010).
- *Plasmodium vivax* : elle est la deuxième espèce la plus fréquente des parasites du paludisme humain avec un pouvoir infestant estimé à 75 millions de personnes chaque année. Elle est très rare en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale, en raison de la forte prévalence du phénotype Duffy négatif dans cette population (Culleton *et al.*, 2011). Il est à l'origine de la plupart des infections paludique dans les Amériques (75%) et environ 53% des cas détectés en Asie du Sud-Est. De plus, *P. vivax* présente certains défis par rapport à *P. falciparum*, notamment le manque de diagnostic précis et sa capacité à rester dormant dans le foie d'une personne (Turkson *et al.*, 2021).
- *Plasmodium ovale* : il est principalement rencontré en Afrique tropicale et dans quelque îles du Pacifique Sud. Cette espèce cause des accès de « fièvre tierce » (toutes les 48 heures), il cause une forme bénigne de l'infection mais pouvant survenir sous forme de rechutes 4 à 5 ans après la primo-infection (Garcia, 2010). *P. ovale* se compose de deux sous-espèces : *P. curtisi* et *P. wallikeri*. Il peut infecter les personnes dont le groupe sanguin est négatif pour Duffy (Turkson *et al.*, 2021).
- *Plasmodium malariae* : Présent dans les zones tempérées et subtropicales, *Plasmodium malariae* est responsable de la « fièvre quarte » survenant toute les 72 heures, avec des rechutes possibles sur plusieurs années (>50 ans) après l'infection (Garcia, 2010).

- ***Plasmodium knowlesi*** : est une infection principalement zoonotique rencontrée en Asie du Sud-Est qui peut provoquer un paludisme grave (Ashley *et al.*, 2018). Le diagnostic de l'infection *P. knowlesi* est complexe, car il ressemble beaucoup à d'autres espèces qui infectent l'homme (Turkson *et al.*, 2021).

I.1.3.2. Vecteur

Le paludisme est transmis par les piqûres d'un moustique de la famille *Culicidea*, du genre Anophèles. Il existe environ 500 espèces d'anophèles dont une cinquantaine sont capables de transmettre le paludisme à l'homme. Elles préfèrent utiliser le sang humain (anthropophiles) pour compléter leur cycle gonotrophique, piquent principalement à l'intérieur (endophages) et se reposent à l'intérieur (endophiles).

L'anophèle femelle pique dès la tombée de la nuit jusqu'au lever du jour. Leur vol est silencieux et leur piqûre est indolore (Pages *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Famille des *Culicidae* (Danis *et al.*, 1991).

| Ordre | Famille | Sous-Famille | Genres |
|-----------------|-------------------------|---|---|
| | | <i>Anophelinae</i> 3 genres | <i>Anopheles</i> , <i>Chagasia</i> , <i>Bironella</i> |
| Dipteria | <i>Culicidae</i> | <i>Culicinae</i> 33 genres | <i>Aedes</i> , <i>Culex</i> , <i>Mansonia</i> , <i>Coquillettidia</i> , <i>Culiseta</i> , <i>Haemagogus</i> , <i>Psorophora</i> , <i>Sabethes</i> , <i>Eretmapodites</i> , <i>Opifex</i> , <i>Wyeomyia</i> , etc. |
| | | <i>Toxorhynchitinae</i> 1 genre | <i>Toxorhynchites</i> |



Figure 2: Un Anophèles albimanus se nourrissant de sang sur un bras humain (CDC).

I.1.4. Mode de transmission

Le paludisme se propage à l'être humain principalement par la piqûre de moustiques anophèles femelles infectées. Il peut également se transmettre par la transfusion sanguine, la

transplantation d'organes, l'utilisation partagée d'aiguilles contaminées et la transmission transplacentaire de la mère à l'enfant (Wai *et al.*, 2016 ; WHO, 2024).

I.1.5. Cycle de vie du plasmodium

Deux hôtes sont essentiels dans le cycle de vie du *Plasmodium* : l'hôte définitif où a lieu le développement sexué (anophèle femelle) et l'hôte intermédiaire (l'homme) où se produit la multiplication asexuée (Figure 2).

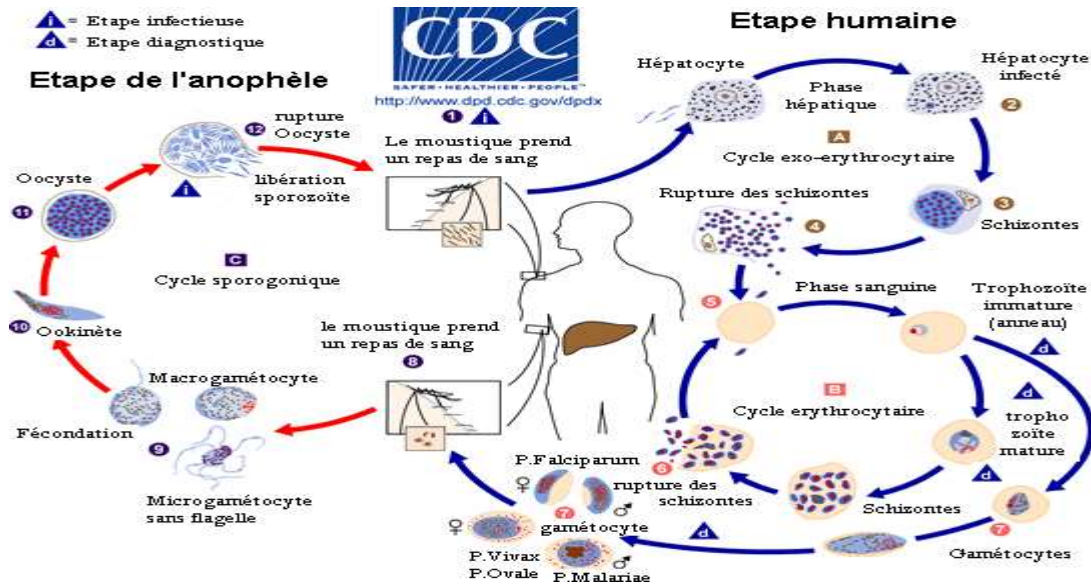


Figure 3 : Cycle de développement du *Plasmodium* (web site : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

I.1.5.1. Cycle chez l'anophèle femelle (sporogonie)

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes appelés microgamétocytes ou gamètes mâles et les macrogamétocytes ou gamétocytes femelles. Ces derniers débutent ainsi le cycle sporogonique en migrant vers l'estomac du moustique et s'y transforment en ookinètes. Les ookinètes s'implantent par la suite sous la paroi stomacale du moustique où ils se développent en oocystes. Après une division méiotique suivie par plusieurs mitoses des cellules parasitaires à l'intérieur des oocystes, ceux-ci grandissent, se rompent et libèrent les sporozoïtes qui vont par la suite migrer vers les glandes salivaires du moustique en attendant l'inoculation lors du prochain repas sanguin (Garcia, 2010 ; White *et al.*, 2014).

La durée du développement sporogonique du *Plasmodium* varie en fonction des conditions climatiques et se déroule entre 10 et 40 jours, suivant les espèces en cause. Pour *P. falciparum*, il dure entre 9 et 20 jours (respectivement entre 30°C et 20°C) (Robert et Boudin, 2003).

I.1.5.2. Cycle chez l'homme (schizogonie)

Chez l'homme, le *Plasmodium* passe par deux phases principales : la phase hépatique et la phase érythrocytaire. L'homme est contaminé lors du repas sanguin d'un anophèle femelle inoculant à partir de ses glandes salivaires des millions de sporozoïtes mobiles et infectants. Les sporozoïtes sont injectés au site de la piqûre et restent quelques minutes dans le derme avant de gagner la circulation lymphatique ou sanguine. Pendant ce temps, beaucoup sont détruits par les macrophages mais certains parviennent à gagner les hépatocytes où se développe la phase hépatique (Argy et Houzé, 2018).

- La phase hépatique ou schizogonie pré-érythrocytaire : une fois dans les hépatocytes, les sporozoïtes subissent plusieurs divisions nucléaires pendant 2 à 7 jours (selon l'espèce du *Plasmodium*), se différencient en schizontes hépatiques, puis à maturation, ces schizontes s'éclatent et libèrent des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Un sporozoïte accédant au foie peut produire 10000 à 30000 mérozoïtes dans un hépatocyte en 5 ou 6 jours. *P. vivax* et *P. ovale* peuvent demeurer dormants dans le foie sous forme d'hypnozoïtes pendant des mois et même des années avant de poursuivre leurs cycles pour libérer des mérozoïtes dans la circulation sanguine (Phillips *et al.*, 2017).
- La phase érythrocytaire ou schizogonie érythrocytaire : les mérozoïtes infectent ensuite les globules rouges par formation de vacuole parasitophore. Chaque mérozoïte se multiplie par plusieurs divisions nucléaires successives pour former dans un schizonte érythrocytaire d'environ 30 mérozoïtes en 48h pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72h pour *P. malariae* et 24h pour *P. knowlesi* (White *et al.*, 2014). À maturation, ces schizontes entraînent la rupture de l'érythrocyte et la dissémination des mérozoïtes, ce qui va occasionner l'invasion, l'infection et la lyse d'érythrocytes additionnels entraînant une nouvelle libération de mérozoïtes et le cycle reprend. À ce stade apparaissent les symptômes du paludisme. À l'intérieur des vacuoles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en forme sexuée : les gamétocytes mâles et femelle, qui peuvent être ingérés par un autre anophèle lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté pour continuer le cycle.

I.1.6. Physiopathologie du paludisme

La physiopathologie du paludisme est encore imparfaitement connue, néanmoins les répercussions de l'infection palustre sur certains organes ont été bien décrites. Pour toutes les espèces plasmodiales, le cycle hépatique est strictement asymptomatique et les seules manifestations cliniques s'observent au cours de la multiplication endo-érythrocytaire (Danis *et*

al., 1991). Ces manifestations physiopathologiques sont causées par l'infection des hématies par les formes asexuées du *Plasmodium*. Nous avons deux grandes catégories de paludisme, le paludisme simple qui peut progresser vers un paludisme grave en absence de traitement rapide.

➤ Le paludisme simple

La fièvre est déclenchée par l'hémolyse des globules rouges infectés par le *Plasmodium* et la libération des déchets du métabolisme plasmodial (pigments et débris cellulaires du globule rouge, ou hémotoxine), ces substances pyrogènes perturbent le fonctionnement de l'hypothalamus (production de cytokine comme le TNF α) et déclenche des crises fébriles (**Wai et al., 2016 ; Phillips et al., 2017**). À cela s'ajoute d'autres symptômes non spécifiques et non compliqués tels que les vertiges, les sueurs, les maux de têtes, les courbatures, les nausées, les vomissements, la jaunisse, un malaise et une sensation de froid décrits pour les accès palustres simples (**Bartoloni & Zammarchi, 2012**). Ces symptômes peuvent être facilement confondus avec d'autres infections et donc rendent le diagnostic clinique difficile.

L'anémie résulte de la destruction des érythrocytes parasités, de la survie raccourcie des érythrocytes non parasités et d'un degré variable de dysérythropoïèse de la moelle osseuse (**Price et al., 2015**).

L'hépatomégalie et surtout la splénomégalie sont les conséquences de l'hyperactivité du système monocyte-macrophage chargé de débarrasser l'organisme du pigment malarique ainsi que des débris érythrocytaires (**Danis et al., 1991**).

➤ L'accès palustre grave

Le paludisme grave ou sévère résultant d'un processus multifactoriel complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes liés à l'hôte et le parasite. Le *Plasmodium falciparum* est le parasite responsable de cette forme de la maladie. Les symptômes cliniques les plus courants de ce type de paludisme sont : une forte fièvre, une anémie progressive, des convulsions, une confusion, un coma et un décès (**Chen et al., 2000 ; Wai et al., 2016**).

La séquestration parasitaire est l'un des principaux mécanismes physiopathologiques de l'accès palustre grave à l'origine de l'atteinte cérébrale et du paludisme gestationnel. Elle est le résultat du phénomène de la cytoadhérence, qui repose sur l'adhésion des globules rouges parasités à la surface des cellules endothéliales vasculaires de l'hôte, à la capacité du globule rouge parasité à s'agglutiner avec des globules rouges non parasités (rositification) et l'agglutination des globules rouges parasités facilités par les plaquettes. Cette cytoadhérence entraîne une obstruction microvasculaire, perturbant la perfusion tissulaire et contribuant à des complications comme le paludisme cérébral et gestationnel, l'anémie sévère et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (**Chen et al., 2000 ; Argy et Houzé, 2018**).

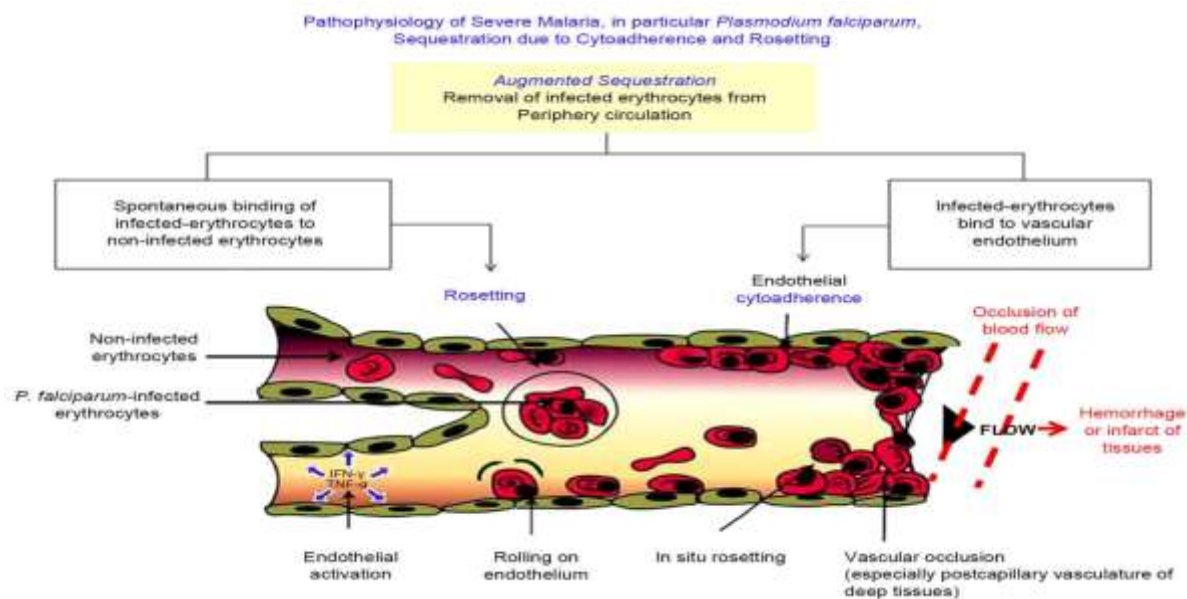


Figure 4 : Représentation de la cytoadhérence et formation de rosettes dans le système vasculaire post-capillaire (Wai *et al.*, 2016).

I.1.7. Traitement du paludisme

Les antipaludiques sont les médicaments utilisés dans le traitement curatif ou préventif du paludisme. Ils sont également appelés anti malariques ou antipaludéens.

Les antipaludiques sont classés en fonction de leurs structures chimiques et/ou de leur mécanisme d'action en trois (3) grandes catégories : les dérivés de la quinoléine, les antifolates et les dérivés de l'artémisinine (Ashenafi & Fikadu, 2023).

- Les dérivés de la quinoléine : ce groupe comprend la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, la quinidine, la méfloquine, la primaquine, la luméfantine et l'halofantrine tous actifs contre le stade érythrocytaire (schizonticides érythrocytaires) du parasite hormis la primaquine qui est active contre le stade hépatique (schizonticides tissulaires) du parasite et les gamétocytes. Le mécanisme d'action des quinoléines consiste à inhiber la formation d'hémozoine (Ashenafi & Fikadu, 2023 ; N'guessan *et al.*, 2023).
- Les antifolates antipaludiques, peuvent être classés en deux classes (I et II) selon leur mode d'action. Les antifolates de classe I inhibent la production d'acide dihydrofolique par inhibition de l'enzyme dihydroptéroate synthase (DHPS) et donc la synthèse d'acide nucléique. Ceux de classe II bloquent la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate en inhibant l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) chez le parasite. Ainsi, les antifolates interfèrent avec le métabolisme des folates, une voie essentielle à la survie du

parasite du paludisme. Leur activité s'exerce à tous les stades de croissance du cycle érythrocytaire asexué et sur les jeunes gamétocytes (Saifi *et al.*, 2013).

- L'artémisinine et ses dérivés comme l'artésunate, l'artéméther, l'artéether et la dihydro-artémisinine sont d'origine naturelle. Le mécanisme d'action de ces composés est de produire les radicaux libres toxiques pour le parasite. Ils ont une action gamétocytocide (Ashenafi & Fikadu, 2023 ; N'guessan *et al.*, 2023).

I.1.8. Chimiorésistance du *Plasmodium*

La résistance aux antipaludiques se définit comme la capacité d'une souche parasitaire à survivre et/ou à se multiplier malgré l'administration et l'absorption de médicaments à des doses égales ou supérieures à celles habituellement recommandées. Ces doses doivent être dans les limites de la tolérance du sujet et l'exposition du médicament au site d'action doit être adéquate. Elle résulte de la sélection de parasites présentant des mutations génétiques ou des amplifications géniques conférant une sensibilité réduites (Shebeshi *et al.*, 2020).

Plusieurs facteurs favorisent l'émergence d'une résistance aux antipaludiques existants. On peut citer entre autres, le taux de mutation parasitaire, la charge parasitaire globale, la concentration du médicament sélectionné, l'observance du traitement, le manque d'adhésion aux recommandations thérapeutiques, un dosage inapproprié, de mauvaises propriétés pharmacocinétique et l'utilisation de faux médicaments entraînent une exposition insuffisante des parasites (Shebeshi *et al.*, 2020).

Ainsi, l'élimination de cet agent pathogène de l'organisme passe par l'implication de divers mécanismes dont le stress oxydatif et l'inflammatoire.

I.2. Stress oxydatif

I.2.1. Généralités sur le stress oxydatif

I.2.1.1. Radicaux libres et stress oxydant

Les molécules possédant au moins un électron non apparié et conférant ainsi une réactivité à la molécule sont appelées les radicaux libres (Al-dalaen & Al-qtaitat, 2014). En biologie, la plupart des radicaux libres résultent de la perte d'un proton ou d'un électron par des molécules ; les espèces réactives de l'oxygène sont produites par la réduction de l'oxygène moléculaire, donnant naissance à des espèces instables qui réagissent facilement avec des biomolécules (Sorg & Kaya, 2007).

L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs). Les facteurs de risque de génération de radicaux libres sont les agents pro-oxydants. Ils sont issus de deux sources : endogène et exogène (Voronkova *et al.*, 2018).

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production et la dégradation des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote. La production de EROs dans le corps humain en petite quantité est cruciale car de nombreux processus comme l'activateur de facteurs transcriptionnels, l'immunité, la phosphorylation des protéines, etc., en dépendent (Batool *et al.*, 2021). Néanmoins, à des concentrations élevées, les EROs produisent des modifications affectées aux composants cellulaires, tels que les lipides, les protéines et l'ADN (Birben *et al.*, 2012).

Le stress oxydatif peut émaner d'une production endogène massive de radicaux par activation de macrophages, de polynucléaires, des cellules endothéliales ou de la mitochondrie et une exposition à des générateurs environnementaux (soleil, pollution atmosphérique, radioactivité, tabac, alcool, ...). Il est également impliqué dans de maintes maladies comme le diabète, les maladies neurodégénératives, les rhumatismes, le cancer, les maladies cardiovasculaires (Favier, 2006).

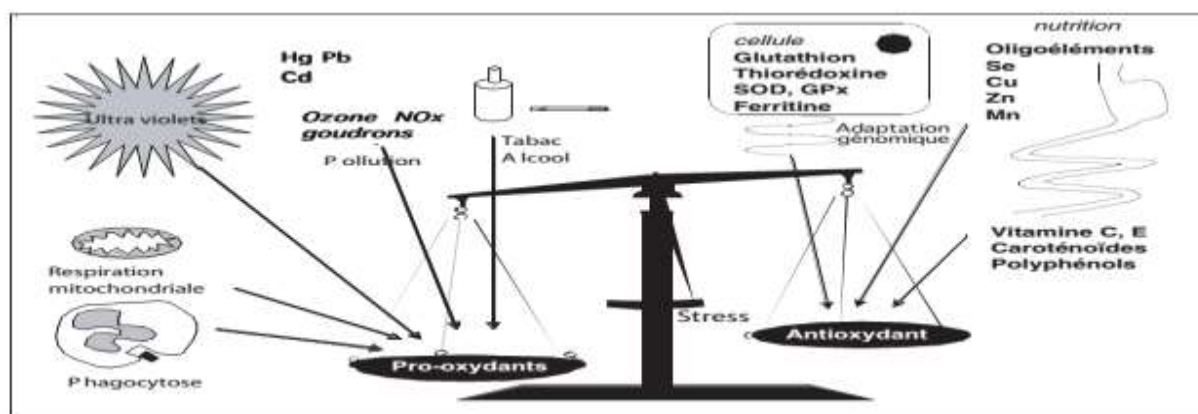


Figure 5 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006)

I.2.2. Conséquences du stress oxydatif

La surproduction des espèces réactives de l'oxygène entraîne des dommages graves sur les biomolécules principalement l'ADN, les lipides, les protéines, ainsi que sur les composants des membranes cytoplasmiques des cellules (Voronkova *et al.*, 2018).

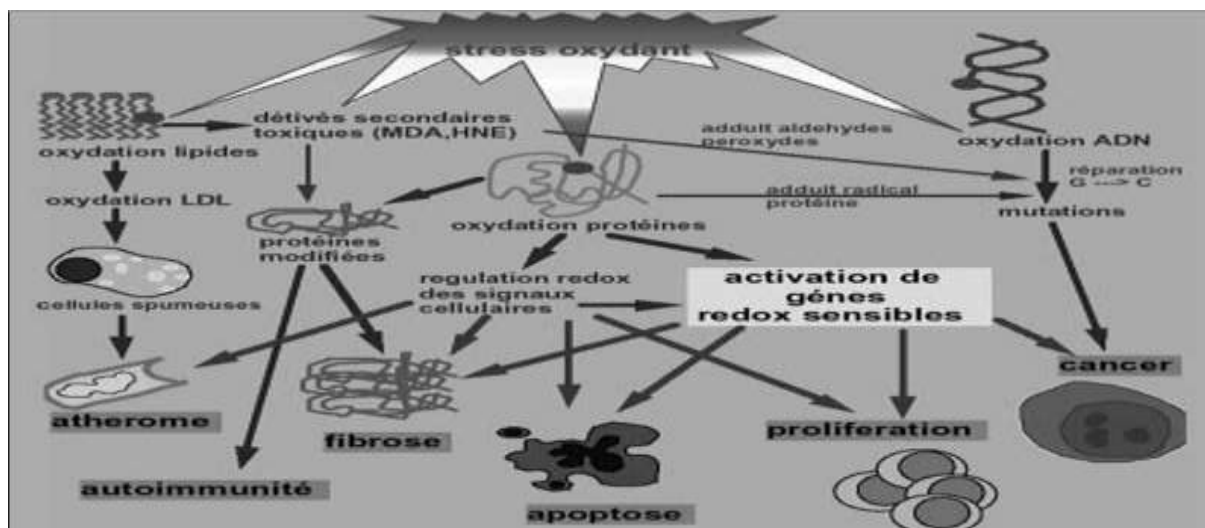


Figure 6 : conséquences pathogènes du stress oxydant (Favier, 2006).

I.2.3. Lien entre le stress oxydatif et le paludisme

L'infection palustre déclenche un stress oxydatif, qui se traduit par un déséquilibre redox chez l'hôte dû à une production importante d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROs/ERNs), au détriment de ses défenses antioxydantes endogènes. Ces composants oxydants dérivent de différentes sources notamment l'hème issu de la dégradation de l'hémoglobine des érythrocytes infectés, la réponse inflammatoire de l'hôte déclenchée par le parasite, le *Plasmodium* qui produit directement les EROs/ERNs, le syndrome d'ischémie et reperfusion causé par la cytoadhérence dans la microvascularisation et l'anémie pendant l'infection, ainsi que l'utilisation des médicaments antipaludiques (figure 7) (Gomes *et al.*, 2022).

- L'hème : est une source de stress oxydatif qui affecte à la fois l'hôte et le parasite lors du paludisme. Les parasites digèrent l'hémoglobine présente dans les érythrocytes infectés pour satisfaire leur besoin en acides aminés. Cette dégradation de l'hémoglobine libère l'hème, capable de produire des EROs via son atome de fer, par la réaction de Fenton où le radical hydroxyl est produit (Vasquez *et al.*, 2021).
- Le *Plasmodium* : le parasite lui-même est capable de produire des radicaux libres, qui interfèrent à leur tour avec la biochimie des globules rouges (Gomes *et al.*, 2022).
- L'explosion oxydative phagocytaire : la production des EROs est un élément crucial de la réponse de l'hôte à divers agents infectieux, y compris le *Plasmodium*. Pour éliminer les pathogènes envahisseurs, l'immunité innée utilise l'explosion oxydative. Cette dernière est déclenchée dans les cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les macrophages après la phagocytose des pathogènes microbiens. Les cellules activent la

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) oxydase pour produire des concentrations élevées des EROs dans le phagosome qui entraînent la mort du microbe (Vasquez *et al.*, 2021).

- Les médicaments antipaludiques : sont des sources pro-oxydantes car ils génèrent un stress oxydant lors du paludisme (Gomes *et al.*, 2022).

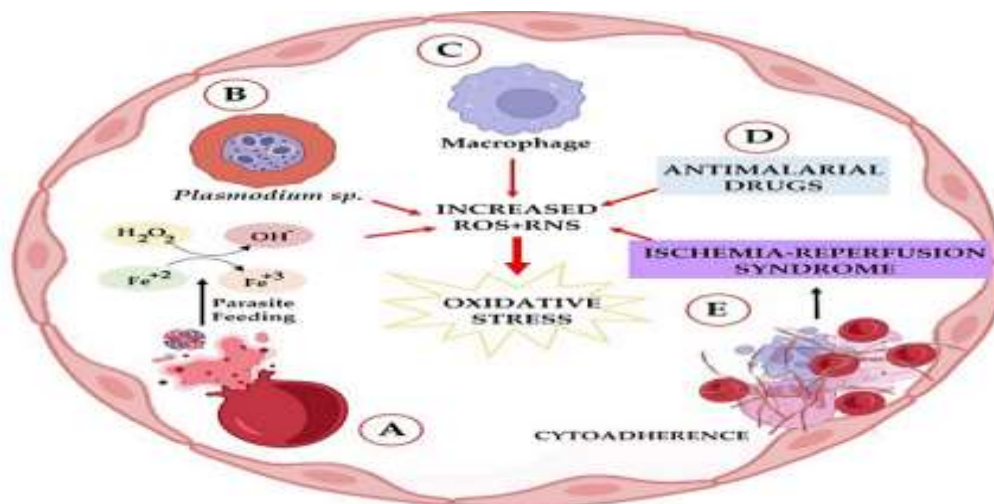


Figure 7 : Sources de stress oxydatif dans le paludisme (Gomes *et al.*, 2022).

Ainsi, le stress oxydatif du paludisme intervient à différents stades de l'infection et selon le stade de la maladie, peut être à la fois nocif et bénéfique lors d'une infection plasmodiale. Il peut infliger des dommages cellulaires importants, principalement la peroxydation lipidique, la modification des protéines et les dommages à l'ADN, exacerbant les conditions pathologiques associées au paludisme (Kotepui *et al.*, 2024).

I.2.4. Systèmes antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, à faible concentration par rapport à un substrat oxydable (tout type de molécule présente *in vivo*), retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat (Voronkova *et al.*, 2018).

Les antioxydants sont divisés en deux catégories : enzymatique et non enzymatique.

I.2.4.1. Systèmes enzymatiques

Les principaux antioxydants enzymatiques sont entre autres : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

- La superoxyde dismutase (SOD) : est l'une des enzymes les plus antioxydantes qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**Zheng et al., 2023**).



- La catalase (CAT), une enzyme omniprésente qui prévient les dommages oxydatifs cellulaires en dégradant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène avec une grande efficacité (**Alfonso-prieto et al., 2009**).



- La glutathion peroxydase (GPx) : est l'enzyme antioxydante qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène en présence du glutathion réduit pour donner de l'eau et le glutathion oxydé. Elle élimine les hydroxydes formés lors de l'oxydation des lipides (**Guija-guerra & Guija-poma, 2023**).



I.2.4.2. Systèmes non enzymatiques

Ces antioxydants sont principalement divisés en deux groupes : endogènes (via la biosynthèse) et exogènes (issu de l'alimentation).

- Antioxydants endogènes
 - Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl glycine) ubiquitaire, il intervient dans de nombreuses réactions intracellulaires dont la détoxification des EROs notamment le H_2O_2 , la détoxification des xénobiotiques électrophiles, le maintien de l'équilibre redox cellulaire impliqué dans la régulation de différentes voies métaboliques. Il permet aussi la régénération de différents antioxydants comme les vitamines C et E (**Lu, 2013**).

- Acide urique

Il est le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, un puissant piègeur de radicaux hydroxyle, peroxyde lipidique, peroxydinitrite (OH° , ROO° , NOO°) (**Haleng et al., 2007**).

- Antioxydants exogènes
 - Vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant (**Glucin, 2012**). Elle est un excellent piègeur des EROs (HO° ou $\text{O}_2^{\circ-}$), inhibe aussi la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (**Haleng et al., 2007**).

- Vitamine E

La vitamine E (α -tocophérol) est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Elle joue un rôle protecteur en réagissant avec des radicaux peroxydes (ROO°) pour former un radical tocophéryle, inhibant ainsi la peroxydation lipidique (Haleng *et al.*, 2007).

- Polyphénols

Ce groupe compte plus de 8000 composés dont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes ou les lignanes (Valko *et al.*, 2006). Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux et généralement, ce sont d'excellents piègeurs de EROs et de très bon chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng *et al.*, 2007).

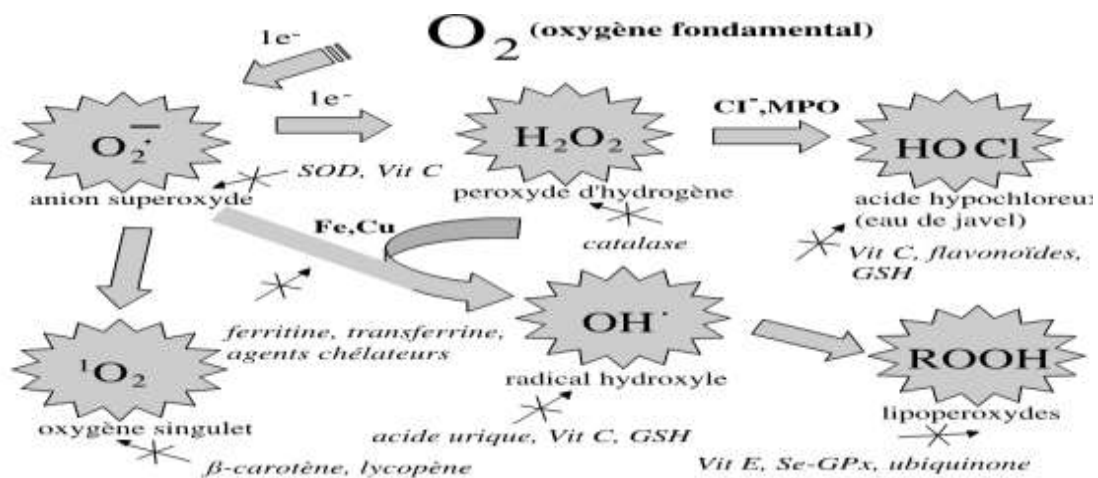


Figure 8 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007).

L'un des mécanismes majeurs impliqué dans l'élimination de l'agent pathogène du paludisme est l'inflammation.

I.3. Inflammation

I.3.1. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation est une réaction tissulaire à une agression, qu'elle soit d'origine infectieuse (parasites, bactéries, virus, champignons), physique (traumatisme, brûlure), chimique (toxines, médicaments), immunologique (réaction allergique, auto-immunité) ou liée à des agents physiques (radiation, chaleur). Elle est généralement considérée comme une réponse non spécifique, car elle se produit de la même manière quels que soient le stimulus et le nombre d'exposition à celui-ci, et ne se produit que dans les tissus vascularisés (Elgazzar & Elmonayeri, 2015).

L'inflammation se caractérise par cinq (05) signes fondamentaux :

- Rougeur : due à la vasodilatation locale ;
- Chaleur : résultant de l'augmentation du flux sanguin ;
- Douleur : liée à la libération des médiateurs chimiques activant les nocicepteurs ;
- Tuméfaction : causé par l'accumulation de liquide interstitiel ;
- Altération de la fonction : pouvant résulter de la douleur ou de la tuméfaction limitant les mouvements (**Signore, 2013**).

I.3.2. Typologie de l'inflammation

I.3.2.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue représente la réponse précoce de l'organisme et est de courte durée. Elle disparaît rapidement et est généralement suivie d'une guérison (**Patel et al., 2012**). Elle se déroule en trois phases.

I.3.2.1.1. Phase de l'inflammation aigue

➤ Phase vasculaire

Début par l'activation des macrophages des tissus locaux, qui exercent leur action phagocytaire et des mastocytes qui libèrent des cytokines et des substances vasoactives. Un certain nombre de substances vasoactives médient une vasoconstriction locale initiale visant à restreindre la cause de la lésion tissulaire. Cette vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation plus large et d'une perméabilité accrue de la paroi vasculaire. Ces derniers événements permettent aux cellules inflammatoires et aux macromolécules d'atteindre le foyer inflammatoire. De nombreuses substances vasoactives comme l'histamine, la bradykinine, les prostaglandines, les leucotriènes et l'oxyde nitrique participent à ces actions (**Kokkas, 2010**).

➤ Phase cellulaire

Elle correspond à l'afflux extravasculaire des leucocytes. Commence avec les polynucléaires neutrophiles, suivis dans un second temps par les cellules mononuclées, principalement les macrophages. La phagocytose et la libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires permettent la destruction de l'agent pathogène. Les macrophages nettoient le foyer inflammatoire et éliminent les débris cellulaires et tissulaires (**Kerrou, 2021**).

➤ Phase de résolution

Cette phase est caractérisée par la résolution de la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire. L'arrêt de l'inflammation est dirigé par la régulation négative des médiateurs pro-inflammatoires et la reconstitution d'une perméabilité microvasculaire normale, ce qui contribue à l'arrêt des chimioattractants locaux, à la synthèse des médiateurs anti-

inflammatoires et à l'apoptose (Eming *et al.*, 2007). Néanmoins, la réparation tissulaire fait intervenir les macrophages, les fibroblastes (collagènes) et les cellules endothéliales (néoangiogènes) (Noack *et al.*, 2018).

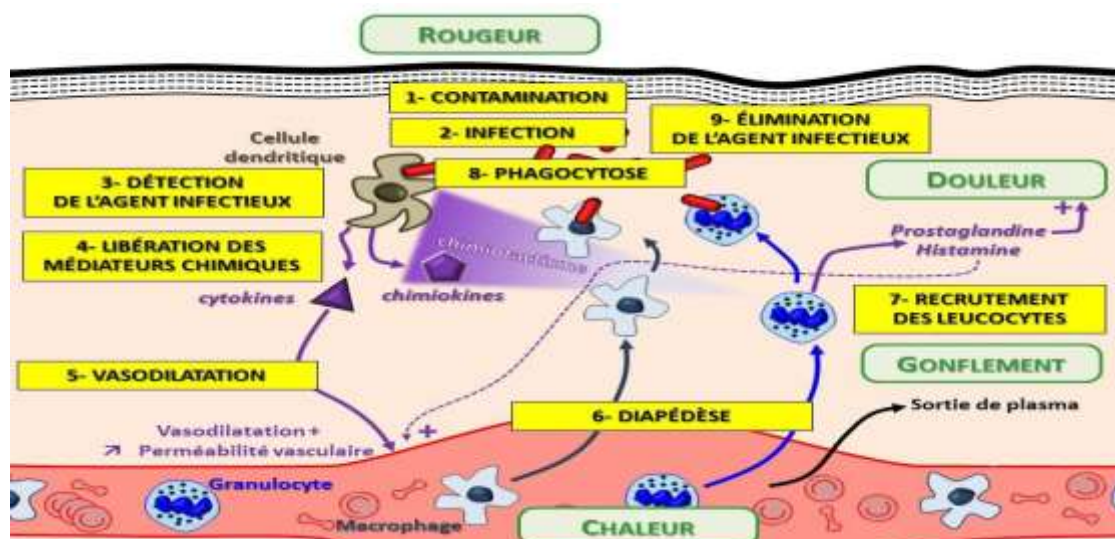


Figure 9 : Processus de l'inflammation aiguë (web site : <http://www.qcm-svt.fr/>)

I.3.2.2. Inflammation chronique

Est une réponse inflammatoire prolongée qui entraîne une modification progressive du type de cellules présentes au site de l'inflammation et se caractérise par la destruction et la cicatrisation simultanées des tissus suite au processus inflammatoire (Anosike *et al.*, 2012). Elle correspond donc à un échec de l'inflammation aiguë et induit de nombreuses pathologies (Noack *et al.*, 2018).

L'inflammation chronique diffère de l'inflammation aiguë par :

- La coexistence des phénomènes vasculaires et cellulaires le long de son évolution ;
- La persistance de l'agent pathogène initial dans les tissus ou la récurrence répétée de l'inflammation aiguë dans le même organe ;
- Des destructions tissulaires importantes (kerrou, 2021).

I.3.2.3. Les cellules de l'inflammation

Tableau 2 : Cellules de l'inflammation (Roetyneck *et al.*, 2006) ; (Shio *et al.*, 2009) ; (Popa & Popa, 2021).

| Cellules | Rôle principal | Médiateurs clés |
|----------------------------------|---|--|
| Macrophages | Phagocytose des globules rouges infectés, production de cytokines, activation de l'inflammasome NLRP3 | TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, ROS, NO |
| Monocytes | Recrutement vers les tissus, différenciation en macrophages ou C.D, production de cytokines | TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL10 |
| Neutrophiles | Phagocytose, formation de NETs, production de ROS et cytokines | TNF- α , IL-8, ROS et NETs |
| Cellules dendritiques | Présentation antigénique, activation des LT, production de cytokines | IL-2, IL-6, TNF- α , IL-10 |
| Cellules T γ δ | Production de cytokines, cytotoxicité, régulation de la réponse immunitaire | IFN- γ , TNF- α et granules cytotoxiques |
| Cellules T CD4+ | Activation de la réponse Th1, régulation de la réponse immunitaire adaptative | IFN- γ , IL-2, IL-10 |
| Cellules tueuses naturelles (NK) | Production précoce de IFN- γ , cytotoxicité | IFN- γ , perforine, granzyme |
| Cellules B | Production d'anticorps, activation polyclonale. | Anticorps, IgM, IgG |

TNF- α (Facteur de nécrose tumorale alpha), *IFN- γ* (Interferon gamma), *IL* (Interleukine), *CCL* ou *CXCL* (Chimiokine ligand), *NLRP3* (Récepteur de type NOD, domaine pyrine contenant 3), *NETs* (Pièges extracellulaires des neutrophiles), *ROS* (Espèces réactives de l'oxygène), *Ig* (Immunoglobuline).

I.3.2.4. Médiateurs de l'inflammation

Le déclenchement et la poursuite de l'inflammation, sa diffusion à partir du foyer initial font appel à des facteurs qui sont synthétisés localement ou qui sont à l'état de précurseurs inactifs dans la circulation. Il existe plusieurs médiateurs et ont pour rôle d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes. Le Tableau 3 résume l'origine et les effets des principaux médiateurs de l'inflammation.

Tableau 3 : Sources et actions des principaux médiateurs inflammatoires (Yakoubi, 2022 ; Obeagu, 2024).

| Médiateurs | Sources | Actions |
|---|---|---|
| Histamine | Mastocytes, Basophiles, éosinophiles et plaquettes. | Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. |
| Sérotonine | Mastocytes et plaquettes | Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses. |
| Bradykinine | Présente dans le plasma sous forme de kininogènes. | Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscle lisses. |
| Leucotriènes | Essentiellement par les leucocytes | Augmente la perméabilité des micro-vaisseaux |
| Prostaglandine E2 | Essentiellement par les leucocytes | Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur. |
| Cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6) | Macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et cellules NK. | Active les cellules immunitaires, favorise l'inflammation, active les macrophages et améliore la présentation des antigènes. |
| Facteur activateur des plaquettes (PAF) | Plaquettes, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales | Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, induit la production des ERO et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages. |
| Facteur de Hageman (XII) | Présent dans le plasma et est activé par l'adhésion des plaquettes. | Impliqué dans la cascade de coagulation. |
| Thrombine | Présent dans le plasma | Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquettes. |
| Fibrine | Présent dans le plasma, formé à partir du fibrinogène | Intervient dans la formation du caillot sanguin |
| Kalicroïne | Présent dans le plasma | Transforme et active le système des kinines. |
| C3a | Fraction C3 du complément inactif | Provoque la dégranulation des mastocytes. |
| C5a | Fraction C5 du complément inactif | Provoque la dégranulation des mastocytes et neutrophiles, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse. |

I.3.2.5. Lien entre l'inflammation et le paludisme

Le paludisme est une maladie hautement inflammatoire. En effet, l'infection plasmodiale déclenche une interaction complexe entre le parasite et le système immunitaire de son hôte. L'inflammation est un élément fondamental de la réponse immunitaire, joue un double rôle dans le paludisme car elle contribue au contrôle et à l'élimination de l'infection tout en étant également un facteur majeur dans la pathogénèse de la maladie (**Mavondo et al., 2019 ; Obeagu, 2024**).

Lors de l'infection par *Plasmodium*, le système immunitaire innée détecte des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) tels que les métabolites parasitaires comme les ancras glycosylphosphatidylinositol (GPI), l'hémozoïne, l'ADN parasitaire ainsi que les motifs moléculaires associés aux dangers (DAMPs) de l'hôte (l'hème, les acides nucléiques, les EROs). Ces PAMPs et DAMPs sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs), notamment les récepteurs de types Toll (TLR) présents sur les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Cette reconnaissance déclenche une cascade de signaux intracellulaires aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires (figure 9) (**Dunst et al., 2017**).

- Le parasite : lors de la phase érythrocytaire du paludisme, la rupture excessive des érythrocytes avec la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine entraîne une parasitémie élevée. Les molécules du parasites et les globules rouges rompus déclenchent des réponses inflammatoires de l'hôte (**Mavondo et al., 2019**).
- Les ancras GPI : ce sont des glycolipides qui lient plusieurs protéines à la surface de la membrane plasmique des mérozoïtes, ils sont nécessaires à l'invasion des érythrocytes. Les GPI sont donc essentiels à la survie du parasite. Le GPI a été le premier composant identifié comme PAMP du paludisme. Ces composants sont abondamment exprimés à la surface du parasite et induisent une réponse inflammatoire avec une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et d'oxyde nitrique (**Dobbs et al., 2021**).
- L'hémozoïne : est un pigment cristallin formé dans la vacuole alimentaire du parasite lors de l'infection au stade sanguin. Lorsque le parasite digère l'hémoglobine, source de nutriments essentiels, il génère l'hème hautement toxique. Le parasite survit en polymérisant l'hème en cristaux d'hémozoïne. Ce dernier induit la production d'IL-1 β par les cellules immunitaires telles que les monocytes et macrophages une fois libérés dans la circulation pendant la lyse des globules rouges parasités (**Mavondo et al., 2019**).

- L'ADN plasmodial, stimule les cellules immunitaires innées grâce à sa reconnaissance par le TLR9 dans les phagolysosomes et par des capteurs d'ADN dans le cytosol. Il pénètre dans les phagolysosomes des cellules immunitaires innées après l'absorption de mérozoïtes et d'érythrocytes infectés, et déclenche la réponse inflammatoire (Dobbs *et al.*, 2021).
- Les EROs favorisent l'inflammation dans le paludisme, entraînant l'activation des macrophages et la libération de cytokines pro-inflammatoires (Vasquez *et al.*, 2021).

Par conséquent, l'inflammation aux stades initiaux de l'infection palustre contribue à l'élimination parasitaire en activant les cellules immunitaires comme les macrophages pour phagocyter les globules rouges infectés et en améliorant la destruction des parasites. Néanmoins, une inflammation excessive peut entraîner le paludisme grave (Obeagu, 2024).

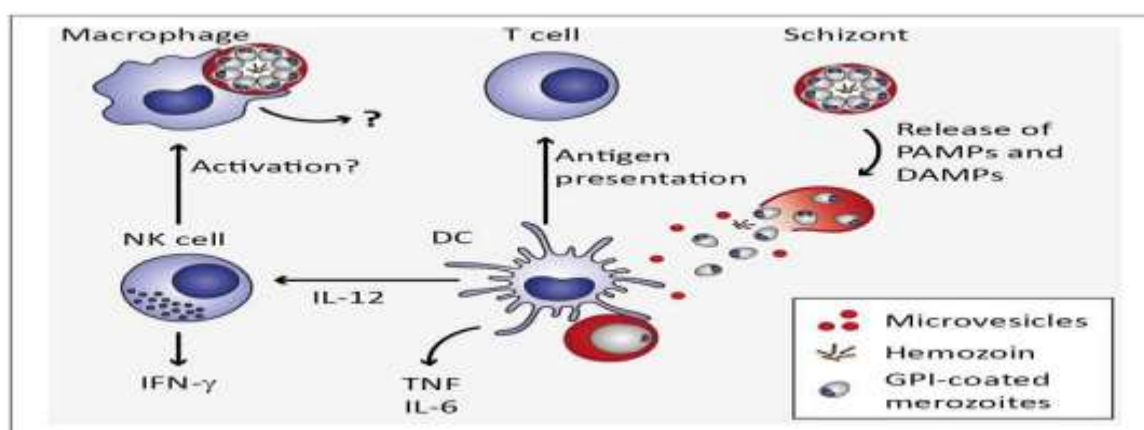


Figure 10 : Réponse immunitaire innée à l'infection par *Plasmodium* au stade sanguin dans la rate (Dunst *et al.*, 2017).

I.3.2.6. Traitement du dérèglement du processus inflammatoire

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui peuvent agir contre l'inflammation (douleur, rougeur, chaleur). Ils agissent en inhibant la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation. Les médicaments anti-inflammatoires permettent de suspendre ou de ralentir le processus d'inflammation, d'effacer ou d'atténuer les manifestations cliniques, parfois même de guérir les lésions mais non de traiter la cause (Yakoubi, 2022).

I.3.2.6.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) également appelés glucocorticoïdes, corticostéroïdes ou stéroïdes sont des anti-inflammatoires les plus efficaces disponibles pour le traitement de nombreuses maladies inflammatoires et immunitaires chroniques (Barnes, 2011).

Ce sont une classe d'hormones stéroïdes produites dans le cortex surrénalien des vertébrés et ayant des activités anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (Calhelha *et al.*, 2023).

Les mécanismes d'actions des glucocorticoïdes sont complexes et encore partiellement mal connus (Scheen, 2022). Les glucocorticoïdes régulent l'expression génique de plusieurs façons. En effet, ils pénètrent dans la cellule pour se lier aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR) dans le cytoplasme et se déplacent vers le noyau. Les homodimères de GR se lient aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) dans la région promotrice des gènes sensibles aux stéroïdes, qui peuvent coder pour des protéines anti-inflammatoires. Moins fréquemment, les homodimères de GR interagissent avec les GRE négatifs pour supprimer les gènes. Les GR nucléaires interagissent également avec des molécules co-activatrices telles que la protéine de liaison CREB (CBP), qui est activé par des facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que le facteur nucléaire-kB (NF-kB), désactivant ainsi les gènes inflammatoires activés par ces facteurs de transcription (figure 10) (Barnes, 2011).

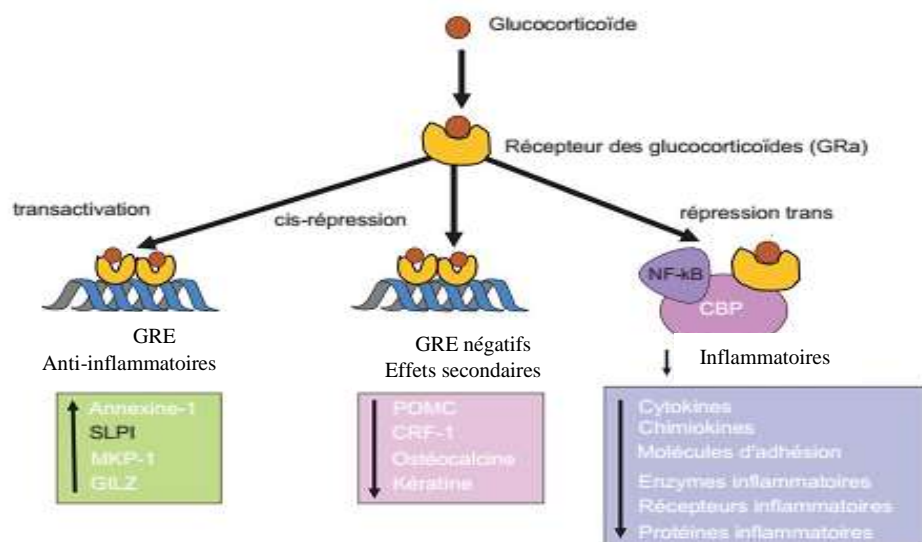


Figure 11 : Régulation de l'expression génique par les glucocorticoïdes (Barnes, 2011).

I.3.2.6.2. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques, qui n'agissent pas sur la cause de l'inflammation (Boulanger, 2017). Ces médicaments sont les plus utilisés en raison de leurs puissants effets analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques (Gunaydin et Bilge, 2018).

Le mécanisme d'action des AINS repose principalement sur l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (COX). La cyclooxygénase assure la conversion de l'acide arachidonique en thromboxanes, prostaglandines et prostacyclines. Les thromboxanes jouent un rôle dans

l'adhésion plaquettaire, les prostaglandines provoquent une vasodilatation et augmentent la température de consigne dans l'hypothalamus. La cyclooxygénase possède deux isoformes distinctes : l'isoforme constitutive, COX-1 (fonctions physiologiques) et l'isoforme inducible, COX-2 (fonctions pathologiques). Cette dernière est attractive et son inhibition par les AINS entraîne des effets thérapeutiques tandis que l'inhibition de la COX-1 produit des effets indésirables (Vane et Botting, 1998 ; Ghlichloo et Gerriets, 2023).

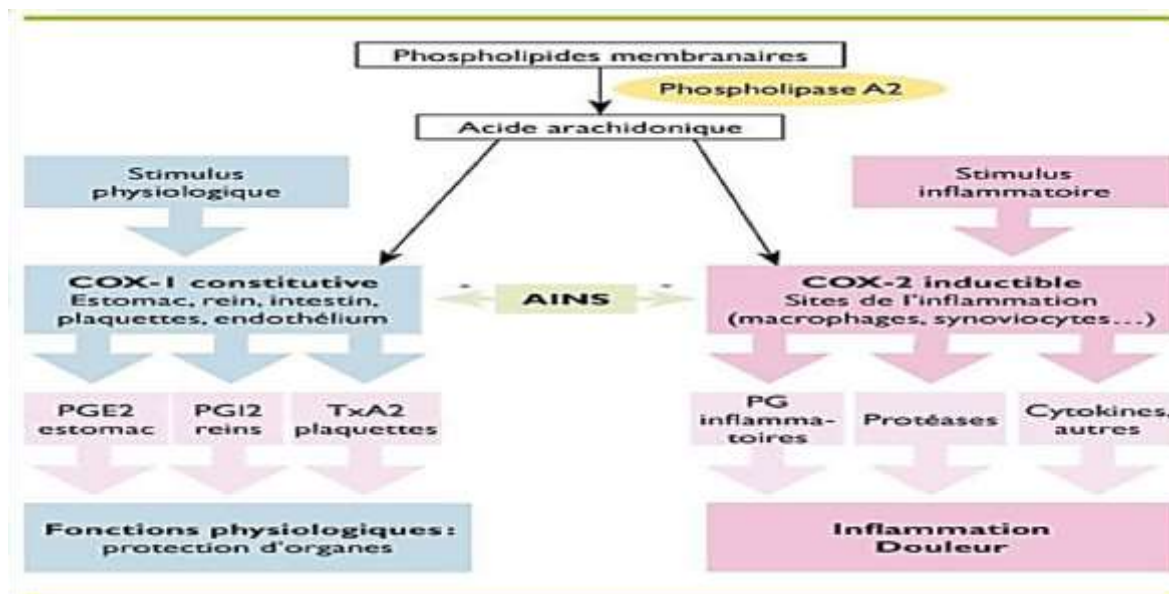


Figure 12 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Brandstatter *et al.*, 2010).

I.3.2.6.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Malgré l'efficacité des anti-inflammatoires synthétiques dans la gestion de l'inflammation, l'utilisation à long terme peut entraîner de graves complications. Les effets indésirables associés aux AINS se manifestent principalement au niveau gastro-intestinal, cardiovasculaire et rénal (Kasturi *et al.*, 2019) et les manifestations indésirables associées aux AIS sont : l'apparition ou le déséquilibre d'un diabète sucré, l'ostéoporose, etc. (Scheen, 2022).

En raison des effets indésirables des antipaludiques, la résistance croissante du *Plasmodium* à ces derniers, etc., les composés naturels comme les plantes médicinales, utilisées depuis des siècles pour traiter diverses pathologies suscitent un intérêt grandissant car elles offrent moins d'effets secondaires et peuvent faire face au paludisme et ses conséquences.

I.4. Généralités et travaux antérieurs sur le *Lepidobotrys staudtii*

Lepidobotrys staudtii est une plante à fleur appartenant à la famille des Lepidobotryacées. C'est un grand arbre pouvant atteindre 30 mètres de hauts et ayant des feuilles couvertes de petites écailles qui lui confère un aspect distinctif (**Botanico Hub, 2025**).

Lepidobotrys staudtii est une espèce originaire des forêts tropicales humides de plaines du Cameroun, du Gabon, de la République Centrafricaine, du Nigéria, de la République Démocratique du Congo et du Congo-Brazzaville (**Bouquet, 1969 ; Botanico Hub, 2025**).

Il est connu sous divers noms locaux selon les pays ou les régions :

- Cameroun : « Masakwa seko » par les Baka (**Tane et al., 1996**)
- Centrafrique : « Mongindanginda » par les Lissongo (**Sillians, 1951**)
- Congo-Brazzaville : « Kinfafa » ou « Kibanga nzeke » par les Beembe et « Isombe » par les Bondjo (**Bouquet, 1969**).

Dans la médecine traditionnelle, *Lepidobotrys staudtii* est utilisé pour traiter les affections comme les conjonctives douloureuses et certaines tribus l'utilisent pour ses propriétés diurétiques, antidiarrhéiques et aphrodisiaques (**Sillians, 1951 ; Bouquet, 1969**).

Au Cameroun (région de l'Est et du Sud), la décoction de l'écorce des tiges de *Lepidobotrys staudtii* est fréquemment utilisée pour soigner le paludisme et les brûlures (**Tane et al., 1996**).

Lepidobotrys staudtii est pourvu de composés chimiques, dont trois gallotanins (acide 1,3,4,5-tétra-O-galloylquinique ; acide 3,4,5-tri-O-galloylquinique et le méthyl 3,4,5-tri-O-galloylquininate) ont été isolés de l'écorce de la tige ayant montré une activité inhibitrice du VIH (**Bokesch et al., 1996**) ainsi que trois triterpènes dihydroxy-3-friedélanone (2 α ,29-dihydroxy-3-friedélanone ; 2 β ,21 α -dihydroxy-3-friedélanone et 6 β ,21 α -dihydroxy-3-friedélanone) ont été isolés des feuilles et de l'écorce de cette plante médicinale (**Tane et al., 1996**). Une étude a également révélé ses métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, saponines, glycosides, glucides et protéines) responsable de son potentiel antiplasmodial *in vitro* avec les extraits bruts et fractions (**Pekam et al., 2025**).

Tableau 4: Classification taxonomique de *Lepidobotrys staudtii* (IUCN, 2025).

| | |
|---------|-----------------------|
| Royaume | Plantes |
| Phylum | Trachéophytes |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordre | Celastrales |
| Famille | Lepidobotryacées |
| Genre | Lepidobotrys |
| Espèce | Lepidobotrys staudtii |



Figure 13 : Photographie de *Lepidobotrys staudtii* (web site : <http://www.inaturalist.org/photos/35458567>).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique, préparation des fractions et d'extraits

II.1.1.1 Matériel végétal

L'écorce fraîche de la tige de *Lepidobotrys staudtii* a été récoltée dans la localité d'Assok au Sud Cameroun en Août 2024. Le spécimen a été identifié sous le numéro 65847 à l'Herbier National du Cameroun (HNC). L'écorce a été nettoyée et séchée à température ambiante à l'abri du soleil. La matière sèche a été broyée afin d'avoir une poudre fine conservée pour la préparation des fractions granulométriques et extraits.

II.1.1.2. Matériel animal

Pour la réalisation de ce travail, deux (02) rats de type Wistar albinos de l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie nous ont servi de source pour l'isolement des macrophages primaires et pour le prélèvement du foie (Référence Clairance Éthique N° : BTC-JIRB2024-155) (Annexe 5).

II.1.1.3. Souches de *Plasmodium falciparum*

Les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-sensible (*Pf3D7*) et multi-résistante (*PfDd2*) (à la chloroquine, pyriméthamine, méfloquine et sulphadoxine) ; offertes par Bei-Ressource (<https://www.beiressources.org/>) ; ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits de fractions de *L. staudtii*.

II.1.1.4. Cellules érythrocytaires saines

Les érythrocytes de groupe sanguin O⁺ prélevé d'un donneur sain ont été utilisés pour la culture continue des souches de *P. falciparum* et la réalisation du test antiplasmodial en raison de leur large distribution dans la population et la disponibilité des donneurs. La culture *in vitro* des souches intra-érythrocytaires de *P. falciparum* et le don de sang volontaire pour les érythrocytes humains a été approuvé par le comité de revue institutionnel conjoint pour la bioéthique animale et humaine (JIRB) de l'Université de Yaoundé I (Référence Clairance Éthique N° : BTC-JIRB2024-155) (Annexe 5).

II.1.2. Préparation des fractions

Le fractionnement de la poudre s'est fait par tamisage. En effet, nous avons fait passer la poudre de l'écorce de *L. staudtii* à travers les tamis de mailles décroissantes (300-100 µm) afin d'obtenir les fractions de poudre de tailles différentes. Ainsi, nous avons obtenu quatre (04) fractions: la fraction 1, celle supérieure à 300 µm (poudre grossière); la fraction 2, celle inférieure à 300 µm (poudre moyennement fine); la fraction 3 est celle supérieure à 100 µm (poudre fine) et la fraction 4, celle inférieure à 100 µm (poudre très fine).

II.1.3. Préparation des extraits

L'extrait aqueux a été préparé par la décoction. En effet, nous avons porté à ébullition 100g de chaque fraction de poudre dans 1L d'eau distillée pendant 30 min et refroidit ensuite à température ambiante. Le mélange obtenu a été filtré au coton puis au papier Whatman N°1. Cette opération a été répétée jusqu'à épuisement (2 fois). Le filtrat obtenu a été séché à l'étuve à 50°C.

Pour cette préparation le rendement d'extraction a été calculé selon la formule:

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de la poudre initiale}} \times 100$$

II.2. Méthodes

II.2.1. Criblage phytochimique et dosage des composés phénoliques et flavonoïdes totaux

II.2.1.1. Criblage phytochimique

En vue de la détection des groupes de métabolites secondaires présents dans nos extraits de fractions de la plante, des tests colorimétriques qualitatifs et spécifiques ont été effectués. Pour chacun de ces tests les extraits ont été préparés à 1mg/ml.

II.2.1.1.1. Test des phénols : réaction au FeCl₃ 1% (Prabhavathi *et al.*, 2016)

➤ Principe :

Les phénols forment avec le chlorure ferrique, un complexe bleu caractéristique indiquant leur présence.

➤ Mode opératoire

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 2 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ 5 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration bleue indiquait la présence des phénols.

II.2.1.1.2. Test des flavonoïdes : réaction au NaOH 20% en milieu acide (Prabhavathi *et al.*, 2016)

➤ Principe :

Les flavonoïdes forment des sels phénolates colorés (jaune) en milieu alcalin, dont la décoloration en milieu acide confirme leur présence.

➤ Mode opératoire :

Trois gouttes d'une solution aqueuse de NaOH 20 % ont été mélangées à 2 ml d'extrait. Après agitation, la formation d'une coloration jaune intense qui disparaissait par ajout de 3 gouttes d'une solution aqueuse de HCl 70 % indiquait la présence des flavonoïdes.

II.2.1.1.3. Test des coumarines : réaction au NaOH 10% (Savithramma *et al.*, 2011)

➤ Principe :

En milieu alcalin, les coumarines forment des sels colorés (jaune) dus à l'ouverture du cycle lactonique, révélant leur présence.

➤ Mode opératoire :

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 3 ml d'une solution aqueuse de NaOH 10 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration jaune indiquait la présence des coumarines.

II.2.1.1.4. Test des tanins : réaction au FeCl₃ 10% (Prabhavathi *et al.*, 2016)

➤ Principe :

Les tanins forment avec le FeCl₃, des complexes ferriques de couleur noire, révélant la présence de groupements phénoliques polyhydroxylés.

➤ Mode opératoire :

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 1 ml d'une solution alcoolique de FeCl₃ 10 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration noire indiquait la présence des tanins.

II.2.1.1.5. Test des glycosides : réaction au NaOH 20% en milieu aqueux (Trease et Evans, 1989)

➤ Principe :

En milieu alcalin, les glycosides libèrent des aglycones phénoliques responsables d'une coloration jaune caractéristique.

➤ Mode opératoire :

Trois gouttes d'une solution aqueuse de NaOH 20 % ont été ajoutées à 1 ml d'extrait. Après agitation, l'apparition d'une coloration jaune indiquait la présence des glycosides.

II.2.1.1.6. Test des saponines : réaction à l'eau distillée (Savithramma *et al.*, 2011)

➤ Principe :

Les saponines, grâce à leur nature tensioactive, produisent une mousse persistante en milieu aqueux, indiquant leur présence.

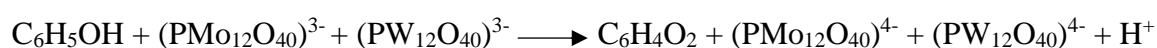
➤ Mode opératoire :

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 6 ml d'eau distillée. Après agitation vigoureuse, la formation d'une mousse persistante indiquait la présence des saponines.

II.2.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux (Dhar *et al.*, 2012)

➤ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène qui absorbe à 700 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel.



➤ Mode opératoire

Dans chaque tube, nous avons introduit 2000 µL d'eau distillé, 100 µL d'extrait à 1000 µg/ml et 200 µl de la solution de Folin-ciocalteu (2N). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été faite à concentration fixée à 100 µg/ml à différents volumes (0, 20, 40, 60, 80, 100 µL) et en complétant les volumes avec : 100 µL de méthanol pur puis ajout de 200 µL de Folin-ciocalteu.

Le mélange est mis au repos pendant 3 min, puis nous avons ajouté 1000 µl de carbonate de sodium 20%. Le mélange est incubé 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. La densité optique a été lue à 700 nm.

Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mgEqAG/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage (Annexe 3). Le mode opératoire est résumé dans le tableau 5 suivant.

Tableau 5 : Étalonage des polyphénols

| N° de Tubes | Blanc | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
| Acide gallique (100 µg/ml) (µL) | / | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Méthanol (µL) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | / |
| Eau distillée (µL) | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 |
| Folin-Ciocalteu 2N (µL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Agiter et laisser 3 minutes à température ambiante. Ajouter : | | | | | | |
| NaHCO₃ 20% (m/v) (µL) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Agiter puis laisser à température ambiante à l'obscurité pendant 1h et lire la DO de la couleur bleu à 700 nm contre le blanc. | | | | | | |
| Acide gallique (µg) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |

II.2.1.3. Dosage des flavonoïdes (Dhar *et al.*, 2012)

➤ Principe

Les flavonoïdes en présence du chlorure d'aluminium donnent des complexes de couleur jaune qui absorbent à 430 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans le milieu réactionnel.

➤ Mode opératoire

Dans les tubes blancs et tests ont été respectivement introduits, 500 µL de méthanol et 500 µL de la solution d'extrait ensuite 500 µL de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 2% (m/v) a été introduit dans chacun des tubes. L'ensemble des tubes est mélangé à l'aide du vortex puis ont été incubé à température ambiante pendant 1h et les densités optiques de la coloration jaune lues à 430 nm contre le blanc. Le dosage a été réalisé en triple et la quercétine a été utilisée comme étalon. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligrammes équivalents de Quercétine par gramme d'extrait (mgEqQ/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage (Annexe 3).

Tableau 6 : Étalonage des flavonoïdes

| N° de Tubes | Blanc | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| Quercétine (10 µg/ml) (µL) | / | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Méthanol (µL) | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | / |
| AlCl₃ 2% (m/v) (µL) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Agiter puis laisser à température ambiante pendant 1h et lire la DO de la couleur jaune à 430nm contre le blanc. | | | | | | |
| Quercétine (µg) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

II.2.2.2. Évaluation du pouvoir réducteur du Fe^{3+} des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* (Patil *et al.*, 2009)

➤ Principe

En milieu acide et en présence du chlorure ferrique, l'antioxydant transforme le ferricyanure de potassium $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ en un précipité bleu de ferrocyanure de potassium qui absorbe à 695nm.



➤ Mode opératoire

Dans chaque tube nous avons introduit successivement 50 μL de chaque extrait, 1100 μL de tampon phosphate (0,6 M pH 6,6) 1000 μL de ferricyanure de potassium 0,25%. Dans le blanc, 1100 μL d'eau distillée ont été ajoutés au lieu du ferricyanure de potassium. Après incubation pendant 20 min à 50 °C, nous avons ajouté dans tous les tubes 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) 10%. L'ensemble a été centrifugé (3000 trs/ min, 10 min, à 4 °C) puis, à 1ml de surnageant ont été ajouté 1ml d'eau distillée et 200 μL de chlorure ferrique. L'ensemble a été bien homogénéisé puis laisser au repos pendant 10 min. l'absorbance a été mesuré à 700 nm contre le blanc et les pourcentages de réduction du fer ont été calculés par la formule suivante :

$$\% \text{réduction du fer} = \frac{DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{témoin}}} \times 100$$

$DO_{\text{témoin}}$: absorbance du tube témoin négatif

DO_{essai} : absorbance du tube de l'essai

L'évolution du pourcentage de réduction en fonction de la concentration en extrait nous a permis de déterminer les CE_{50} .

II.2.2.3. Évaluation de l'effet de *Lepidobotrys staudtii* sur l'inhibition de la peroxydation lipidique (Xiao *et al.*, 2009)

II.2.2.3.1. Préparation de l'homogénat de foie

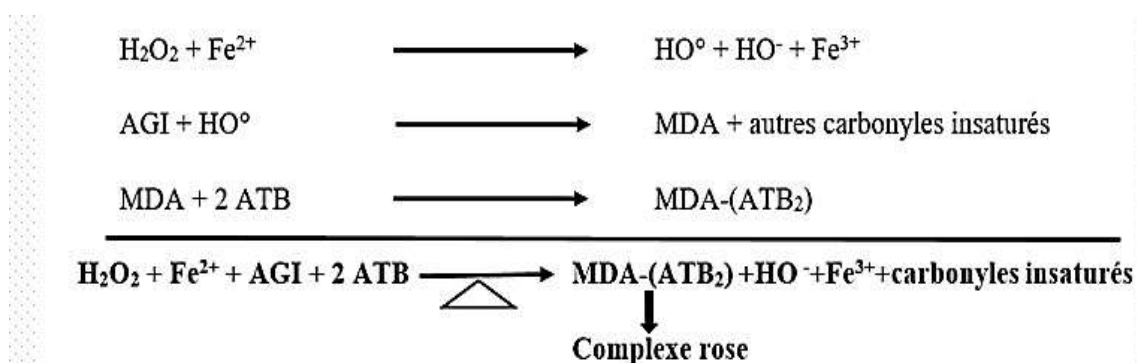
Un rat de type Wistar albinos a été euthanasié par injection de kétamine et le foie a été excisé. Le reste de la manipulation s'est effectué dans la glace. L'organe a été lavé dans une solution d'eau physiologique NaCl 0,9% puis, essoré et pesé. Une fois la masse du foie connue,

il a été découpé en petit morceaux et broyé à l'aide du piston en téflon de l'appareil de Potter et du sable de fontaine Bleu. Un homogénat 10% dans une solution de KCl 1,15% a ainsi été préparé en tenant compte du poids du foie, puis réparti dans plusieurs tubes et centrifugé (2000 trs/min, 10min, 4°C). Chaque surnageant a été recueilli et le volume noté. Suivant le nombre de dosages à effectuer, des aliquotes ont été préparés, puis conservé au congélateur jusqu'à utilisation.

II.2.2.3.2. Induction de la peroxydation lipidique

➤ Principe

Couplée au Fe^{2+} , le H_2O_2 libère le radical hydroxyle (HO^\bullet) qui attaque les liaisons éthyléniques des acides gras insaturés (AGI) pour les oxyder. Il se forme des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (ATB) dont le Malondialdéhyde (MDA) qui réagit en milieu acide et à chaud avec deux molécules de ATB pour former un complexe rose qui absorbe à 532 nm suivant l'équation ci-dessous.



➤ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, ont été introduit successivement 50 μ L d'extrait, 1 ml d'homogénat de foie de rats 10%, 50 μ L de $FeCl_2$ 0,5 mM et 50 μ L de H_2O_2 0,5 mM. Dans le tube blanc, le $FeCl_2$ et H_2O_2 ont été remplacé par 100 μ L KCl 1,15% tandis que dans le tube témoin négatif, le solvant d'extraction a été utilisé à la place de l'extrait et pour le tube standard l'acide ascorbique a été utilisé. Les mélanges ont été incubés (1 heure, 37° C). Après incubation, 1ml d'acide trichloracétique (ATC 15%) et 1ml d'ATB 0,67% ont été ajoutés dans tous les tubes et portés à ébullition au bain-marie pendant 15 minutes. Après refroidissement et centrifugation (3000 trs/min, 5 min, 4°C), les surnageants ont été récupérés et l'absorbance de la coloration rose lue à 532 nm contre le blanc. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés en utilisant la formule ci-dessous.

$$\%inhibition = \frac{DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{témoin}}} \times 100$$

DO_{témoin} : absorbance du tube témoin négatif

DO_{essai} : absorbance du tube de l'essai

L'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait ou d'acide ascorbique utilisé nous a permis de déterminer les CI₅₀ en µg/ml.

II.2.2.4. Évaluation de la capacité antioxydante totale des extraits de fractions

(Kumar *et al.*, 2011)

➤ Principe

Les phosphates en présence de molybdate d'ammonium en excès donnent un complexe phosphomolybdique ($H_3PO_4[(MoO_3)]_{12}$). En présence d'un réducteur, Ce complexe est réduit en un complexe phosphomolyb-2-molybdique ($H_3PO_4[(MoO_3)_{12}MoO_2]_2$) de couleur bleu qui absorbe à 695 nm.

➤ Mode opératoire

Dans chaque tube à essai nous avons introduit successivement: 50 µL de chaque extrait de *Lepidobotrys staudtii*, 1ml d'acide sulfurique 0,6 M, 1050 µL de phosphate de sodium 28 mM, 1050 µL de molybdate d'ammonium 4 mM. Les tubes ont été bouchés avec les billes et chauffés pendant 90 min puis refroidis sur un courant d'eau froide. L'absorbance du mélange de coloration bleue a été mesurée à 695 nm.

La capacité antioxydante totale des extraits de fractions exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique/g d'extrait a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

II.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de *Lepidobotrys staudtii*

II.2.3.1. Obtention des macrophages

L'isolement des macrophages primaires de rat a commencé par leur élicitation par injection intra-péritonéale de 0.5 ml d'une solution d'amidon 2 % (agent inflammatoire) (Titus *et al.*, 1995). Quatre jours après injection, les animaux (2) sont euthanasiés par injection de kétamine. Par la suite, nous avons injecté à l'aide d'une seringue, 20 ml de tampon PBS (0.1 M, pH 7,4) chez le rat dans la cavité péritonéale de l'animal pour la collecte des macrophages. Après massage de la cavité abdominale, le tampon injecté est ensuite aspiré lentement. La solution obtenue contenant les macrophages a été introduite dans les tubes Falcon de 15 ml et conservée dans la glace.

Le fluide obtenu a été centrifugé (3000 trs/min, 4°C, 10 min) et le surnageant éliminé. Le culot obtenu contenant les cellules a été récupéré. Les hématies ont été éliminées par choc osmotique (Bansal, 1987) en suspendant les cellules dans 1 ml d'une solution hypotonique de

NaCl 0,05 M pendant 1 min. Ensuite, l'isotonie a été rétablie par ajout de 1 ml de NaCl 0,25 M. Le mélange a été de nouveau centrifugé (3000 trs/min, 4°C, 10 min), et le culot obtenu contenant en majorité les macrophages a été suspendu dans 2 ml de milieu de culture RPMI et maintenu dans la glace.

II.2.3.2. Test au bleu Trypan (Bansal, 1987)

➤ Principe

La molécule de bleu trypan a tendance à infiltrer les cellules. Une fois dans la cellule, son exclusion dans le milieu extracellulaire se fait par un mécanisme nécessitant de l'énergie. Seules les cellules possédant une source d'ATP sont capables de mettre en place un tel mécanisme. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule de bleu trypan et apparaîtra brillante au microscope tandis qu'une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue.

➤ Mode opératoire

Dans un tube eppendorf de 1.5 ml, nous avons introduit successivement 25 µL de suspension cellulaire puis 225 µL de la solution de bleu trypan (0,2 % dans le NaCl 0,9%). Le mélange a été homogénéisé et 20 µL ont été introduits dans une cellule de Malassez et recouverts d'une lamelle. Les cellules ont enfin été observées au microscope optique (objectif: 40X) et comptées. La concentration des cellules/ml de milieu a été déterminée à l'aide de la formule ci- après.

$$N = n \times 100 \times 10^3 \times Fd$$

N= nombre de macrophages par ml de milieu (cellules/ml)

n= nombre de cellules comptées à l'aide des cellules de Malassez

Fd= facteur de dilution

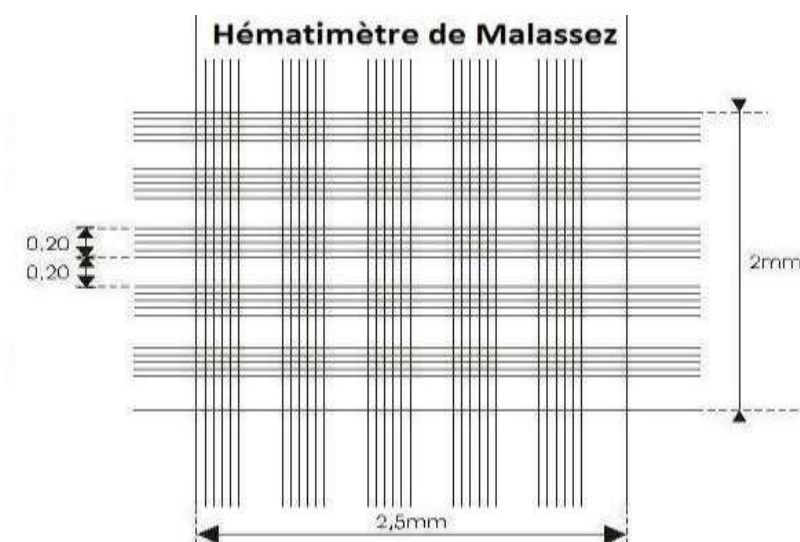


Figure 14 : Hématimètre de Malassez

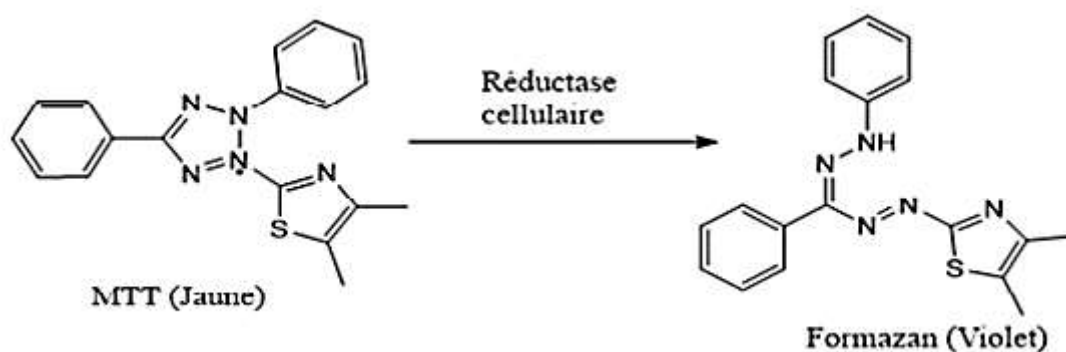
II.2.3.3. Mise en incubation des macrophages

Après comptage des cellules à l'aide de l'hématimètre de Malassez, les cellules ont été répartis dans différents puits à raison de 10^4 cellules/ml. En effet, dans les puits tests et témoins positifs, 150 μ L de cellules ont été introduit avec 50 μ L de *Saccharomyces cerevisiae* (250 μ g/ml) ; dans les puits du blanc 150 μ L de cellules ont été introduit avec 50 μ L de RPMI. La microplaque a été incubée pendant 1h à 37°C (5% de CO₂), puis 50 μ L d'extrait à différentes concentrations (0.1, 1, 10 et 100 μ g/ml) ont été ajoutées dans les puits tests et 50 μ L de RPMI ont été ajouté dans les puits du témoin positif et 50 μ L de baicalin pour le standard. La microplaque a été de nouveau incubée pendant 3h à 37°C (5% de CO₂). Les surnageants ont été utilisés pour les tests des dosages de l'oxyde nitrique tandis que les culots ont été utilisés pour les tests de dosages de la lipoxigénase et pour la cytotoxicité au MTT.

II.2.3.4. Test de viabilité des macrophages au 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) (WU *et al.*, 2012)

➤ Principe

Le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT) est un réactif utilisé pour évaluer l'activité des déshydrogénases NADH dépendantes. Ces enzymes sont capables de réduire le sel de tétrazolium de couleur jaune en un produit formazan bleu violet qui absorbe avec un maximum à une longueur d'onde de 550 nm. Seules les cellules avec une mitochondrie fonctionnelle peuvent réduire le MTT.



Réaction de réduction du MTT en formazan par la reductase

➤ Mode opératoire

Le culot cellulaire issu des différentes incubations a été repris dans 100 μ L d'une solution de MTT (0,5 mg/ml dans le PBS) et le mélange a été incubé à 37°C pendant 1h 30 min, puis le surnageant a été éliminé et 100 μ L d'isopropanol acidifié ont été ajoutés dans chaque tube pour dissoudre les cristaux de formazan formés. Enfin, l'absorbance de la solution bleue

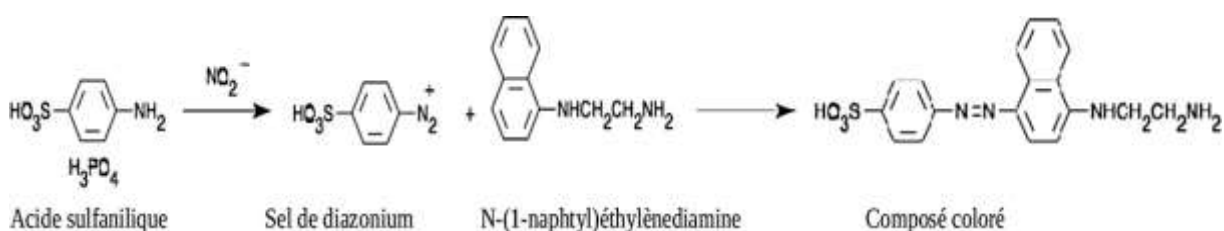
violette a été lue à 550 nm contre la solution d'isopropanol acidifié. Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été calculés en utilisant la formule suivante:

$$\%Viabilité = \frac{DO_{essai}}{DO_{témoin}} \times 100$$

II.2.3.5. Évaluation de l'effet des extraits de fractions de la plante sur l'inhibition de la production de l'oxyde nitrite par les macrophages (Sun *et al.*, 2003)

➤ Principe

Il est basé sur la réaction de diazotation de Griess décrite en 1879. Le sulfanilamide et naphthyl éthylène diamine dihydrochloride (NED) compétissent pour le Nitrate dans la réaction acide. Au cours de la phagocytose, le monoxyde d'azote formé se complexe avec le réactif de Griess pour former un composé de coloration jaune qui absorbe à 550 nm.



➤ Mode opératoire

Les surnageants obtenus précédemment ont été utilisés. 100 µL de surnageant ont été mélangé avec 100 µL du réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl éthylène diamine dihydrochloride dans 2.5% v/v d'acide phosphorique). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été mesuré à 550 nm. La quantité de nitrite est mesurée par rapport à la courbe standard de nitrate de sodium (Annexe 3).

Le pourcentage d'inhibition de la production de l'oxyde nitrique a été calculé selon la formule:

$$\%Inhibition = \frac{DO_{témoin} - DO_{essai}}{DO_{témoin}} \times 100$$

II.2.3.6. Évaluation de l'effet des extraits de fractions de plante sur l'activité de la 5-lipoxygénase (Yougbaré-Ziebrou *et al.*, 2015)

➤ Principe

La 5-lipoxygénase est l'une des enzymes majeures impliquées dans le processus inflammatoire de par sa catalyse de l'oxydation des lipides membranaires (acide arachidonique, acide linoléique) en vue de la production de médiateurs pro-inflammatoires, ceci par

l'intermédiaire d'hydroperoxydes produit en premier. Ces hydroperoxydes ont de ce fait une longueur d'onde d'absorption maximale de 234 nm témoignant de l'effectivité de la réaction catalysée par cette enzyme. La diminution de la DO sera donc due à la faible quantité d'hydroperoxydes produit, cela est due à l'inhibition de l'enzyme.

➤ Mode opératoire

Ce test a été réalisé dans des tubes à essai. Après avoir isolé les macrophages de rat et récupéré dans le milieu de culture, 950 µL de cellules ont été introduit dans chacun des tubes (100000 cellules par tube). Ensuite nous avons ajouté 300 µL de suspension de *Saccharomyces cerevisiae* (250 µg/ml) dans chacun des tubes, sauf le témoin négatif où on a ajouté plutôt le milieu de culture. Il s'en est suivi une première incubation d'une heure à 37°C (5% de CO₂). Par la suite, 50µL d'extrait ont été introduit dans les tubes tests, 50µL de baicalin pour les tubes standards et 50µL de milieu pour les témoins; il s'en est suivi une seconde incubation de 3 heures. Après cela nous avons centrifugé chacun des tubes à 2000 trs/min pendant 10 minutes à 4°C et éliminé le surnageant. Le culot contenant les cellules a été récupéré dans 50 µL de Triton X-100 puis les tubes ont été agités pendant 2 minutes. Enfin nous avons ajouté 1000 µL d'acide linoléique (125µM) et incubé pendant 30 minutes. Après cela la densité optique du surnageant a été lue à 234 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de cette enzyme a été calculé à l'aide de la formule ci-contre.

$$\%Inhibition = \frac{DO \text{ témoin positif} - DO \text{ test}}{DO \text{ témoin positif}} \times 100$$

II.2.4. Méthode de sélection de meilleurs extraits de fractions antioxydant et anti-inflammatoire

Les extraits de fractions ont été classés suivant les valeurs croissantes du pouvoir anti-radicalaire (PA), concentration efficace 50 (CE₅₀) et la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀). Ensuite, un score a été calculé comme moyenne des rangs occupés par chaque extrait.

Les extraits de fractions granulométriques présentant le plus petit score ont été retenus. Ces deux extraits de fractions seuls et combiné (50 : 50) ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antiplasmodiale.

II.2.5. Étude de l'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

II.2.5.1. Culture *in vitro* et maintenance des parasites en continu dans les érythrocytes

Les souches de *Plasmodium falciparum* sensibles à la chloroquine (*Pf3D7*) et multi-résistantes (*PfDd2*) ont été mises en culture et maintenues en culture continue en présence d'érythrocytes humains du groupes sanguin O⁺ selon la méthode développée par **Trager et Jensen, 1976**.

En effet, les cryotubes de conservation contenant les souches ont été retirées au congélateur à -80°C et préchauffés à 37°C pendant 2 minutes afin de faciliter la décongélation. Ensuite, le contenu du cryotube a été transféré dans un tube Falcon de 50 ml où il a été ajouté 100 µl de solution de NaCl 12% goutte à goutte pour faire sortir la solution de conservation des globules rouges. Après 5 minutes de repos, 5 ml de solution de NaCl 1,6% ont été ajoutés goutte à goutte à ce mélange pour rétablir l'isotonie du milieu. L'ensemble a été centrifugé à 2500 tr/min pendant 5 min. Le surnageant a été retiré et le culot a été lavé une fois avec du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 complet (Sigma-Aldrich) (Annexe 2). Enfin, le culot restant a été mis en culture et maintenu en suspension à 4% d'hématocrite dans les érythrocytes humains frais d'un donneur du groupe sanguin O⁺ et dans le milieu de culture RPMI 1640 complet. Les cultures ont été réalisées dans des boîtes de pétri de 60 mm et ont été incubées à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture était renouvelé quotidiennement par du milieu RPMI 1640 complet frais dans le but d'assurer une croissance optimale et continue des parasites. Des frottis sanguins ont été réalisés et colorés au MGG (*May-Grundwald Giemsa*) à 10% puis observés au microscope optique (*Huma Scope Classic*) à l'objectif 100X avec l'huile à immersion pour vérifier l'état de la culture et la croissance parasitaire. En prélude au test d'activité antiplasmodiale, les cultures parasitaires contenant majoritairement le stade en anneau ont été synchronisées 48h avant.

II.2.5.2. Synchronisation des cultures de *P. falciparum*

La synchronisation est une procédure qui permet de ramener les parasites au même stade évolutif en anneau en vue de permettre l'appréciation de l'activité d'un extrait sur un cycle complet du parasite. Elle consiste en la destruction sélective des stades avancés (les trophozoïtes et les schizontes) de développement du parasite par traitement au sorbitol 5% (p/v) (**Lambros et Vanderberg, 1979**). En effet, la membrane érythrocytaire est normalement imperméable au sorbitol mais les canaux induits par le parasite dans la membrane cellulaire infectée permettent

le passage du sorbitol. Lorsque les érythrocytes parasités aux stades avancés sont mis en suspension dans une solution de sorbitol, il y a une absorption nette de sorbitol et d'eau dans les érythrocytes, entraînant un gonflement et une hémolyse de ces cellules (**Kirk *et al.*, 1994**). Expérimentalement, Les cultures parasitaires contenant au moins 80% du stade en anneau ont été centrifugé à 2500 tours/min pendant 5 minutes et le surnageant a été retiré puis remplacé avec 5ml de solution de sorbitol à 5% (p/v). Le mélange a été bien homogénéisé et incubé à 37°C pendant 10 minutes, puis centrifugé à nouveau à 2500 tours/min pendant 5 minutes suivit de 3 tours de lavage avec du milieu RPMI 1640 incomplet pour éliminer au maximum la solution de sorbitol. Après synchronisation, les parasites ont été remis en culture avec du milieu de culture RPMI 1640 complet à 4% d'hématocrite. Après 48h d'incubation, le test d'activité antiplasmodiale des extraits de fractions a été réalisé.

II.2.5.3. Dilution des extraits en prélude du test d'activité antiplasmodiale

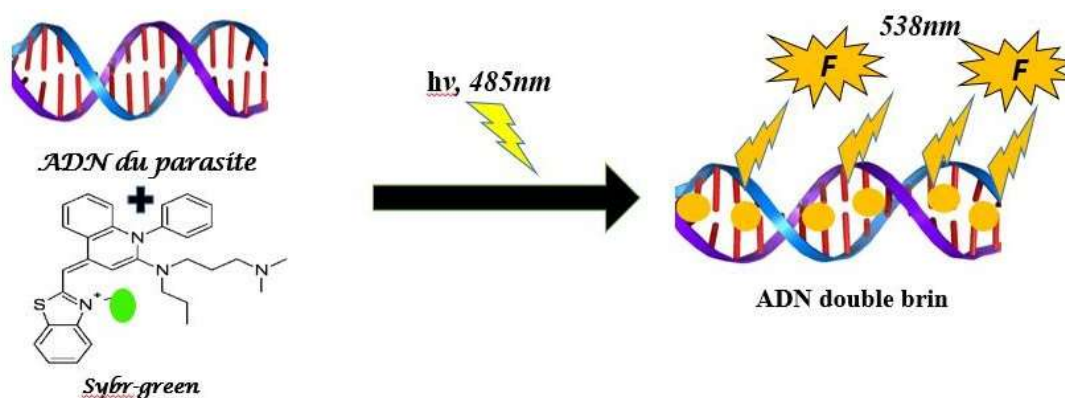
Les solutions stocks d'extraits concentrées à 100 mg/ml ont été préparées en dissolvant 100 mg de chaque extrait de fractions dans 1ml de DMSO (100%). Dans le but de tester nos extraits de fractions à différentes concentrations, avec une concentration finale de DMSO inférieur à 1%, concentration non toxique à la croissance parasitaire, les plaques intermédiaires ont été préparés à partir de 1mg/ml. Pour cela, dans les microplaques de 96 cupules à fond rond (Sigma-Aldrich), 2 μ L de chaque solution stock d'extrait ont été prélevés et dilués dans 198 μ L de RPMI 1640 dans les premiers puits afin d'obtenir une concentration de 1mg/ml et 160 μ L de RPMI 1640 incomplet dans les autres puits de la plaque. Ensuite, une série de dilution en série de raison géométrique 5 a été effectuée afin d'obtenir des concentrations variant de 1mg/ml à 0,0016 mg/ml pour les extraits et de 1% à 0,0016% pour le DMSO. De façon similaire, la chloroquine et l'artémisinine (Sigma-Aldrich) ont été utilisées comme molécules de références, et ont été diluées pour obtenir les concentrations variant de 10 μ M à 0,016 μ M à partir d'un stock à 100 mM. Les plaques intermédiaires ainsi préparées ont été conservées à -80°C pour un usage ultérieur.

II.2.5.4. Évaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits de fractions

Le test d'activité antiplasmodiale des extraits de fractions a été réalisé dans les microplaques de 96 puits à fond plat (Sigma Aldrich) selon le protocole décrit par **Smilkstein *et al.*, 2004**.

➤ Principe

Il est basé sur la capacité des parasites à se multiplier et à survivre en présence d'une concentration définie de l'extrait ou de la molécule de référence. La viabilité des parasites est déterminée à l'aide du SYBR green 1 (Sigma Aldrich) qui a la capacité de se fixer sur l'ADN double brin produisant ainsi une forte fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de parasites présents dans le milieu.



Principe de révélation au SYBR green Une fois fixé sur l'ADN, le SYBR green devient fluorescent. Ainsi, le complexe ADN double brin/SYBR green I absorbe la lumière bleue (excitation) à une longueur d'onde $\lambda = 485 \text{ nm}$ et émet de la lumière verte à une longueur d'onde $\lambda = 538 \text{ nm}$.

➤ Mode opératoire

Expérimentalement, 90 μL de la suspension parasitaire synchronisée au stade en anneau, préparé à 2% de parasitémie et 1% d'hématocrite ont été incubées avec 10 μL de solution de chaque extrait provenant des plaques intermédiaires précédemment préparées. Le contrôle positif était constitué des molécules de référence (artémisinine et chloroquine) tandis que le témoin négatif (100% de croissance) était constitué de 100 μL de la suspension parasitaire. Les plaques ont été incubées pendant 72h à 37°C dans un incubateur humidifié constitué de 5% de CO_2 . Les concentrations finales dans les plaques tests variaient de 100 $\mu\text{g/ml}$ à 0,00016 $\mu\text{g/ml}$ (DMSO $\leq 0,1\%$) pour les extraits et de 1 μM à 0,0016 μM pour l'artémisinine et la chloroquine dans un volume final de 100 μL . Au terme de la période d'incubation, 100 μL du tampon de lyse de SYBR green I (0,2 μL de SYBR green I/ml de tampon de lyse) constitué de Tris (20mM ; PH 7,5), EDTA (5 Mm), saponine (0,008% p/v) et Triton X-100 (0,08% v/v) ont été ajouté délicatement dans chaque puit, suivi d'une incubation supplémentaire de 1 heure à l'obscurité (Smilkstein *et al.*, 2004). La fluorescence a ensuite été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques (Infinite M200, Tecan) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 538 nm respectivement. Les tests ont été réalisés en triple. Les valeurs de

fluorescences obtenues ont servi aux calculs des pourcentages d'inhibition (%INH) selon la formule ci-dessous:

$$\%INH = \frac{\text{Fluorescence controle négatif} - \text{Fluorescence test}}{\text{Fluorescence controle négatif}} \times 100$$

Les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) ont été déterminées à partir des courbes sigmoïdales de concentrations-réponse obtenues par le tracé du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme décimale de la concentration en inhibiteur.

❖ Calcul de l'indice de résistance

L'indice de résistance (IR) est un paramètre qui permet de savoir si un extrait agit préférentiellement sur la souche multi-résistante (*PfDd2*) ou plutôt sur la souche chloroquino-sensible (*Pf3D7*) (Smit *et al.*, 2015). L'IR a été calculé pour chaque extrait en utilisant la formule suivante :

$$IR = \frac{CI50 \text{ PfDd2}}{CI50 \text{ Pf3D7}}$$

Un IR <1 indique que l'extrait agit préférentiellement sur la souche résistante et si IR >1, l'extrait agit de préférence sur la souche sensible.

II.2.6. Analyse statistique

Les analyses statistiques des valeurs obtenues ont été réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Excel et Graphpad Prism 8.0.1. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart-type et les différentes valeurs ont été comparées à l'aide du test d'analyse des variances « one-way ANOVA » avec le test de comparaison multiple de Tukey et les différences ont été considérée comme significatives pour une p-value p<0,05.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction des extraits de fractions granulométriques sont compris dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Rendements d'extraction

| Fractions | A | B | C | D |
|------------|---------|--------|--------|--------|
| Rendements | 19,38 % | 19,94% | 21,16% | 26,46% |

A = fraction >300 μ m ; B = fraction < 300 μ m ; C = fraction >100 μ m et D = fraction <100 μ m

Il en ressort du Tableau 7 que le rendement d'extraction augmente avec la granulométrie de la poudre.

III.1.2. Profil phytochimique et taux des composés phénoliques totaux et flavonoïdes

III.1.2.1. Profil phytochimique

Tableau 8 : Résultats du criblage phytochimique

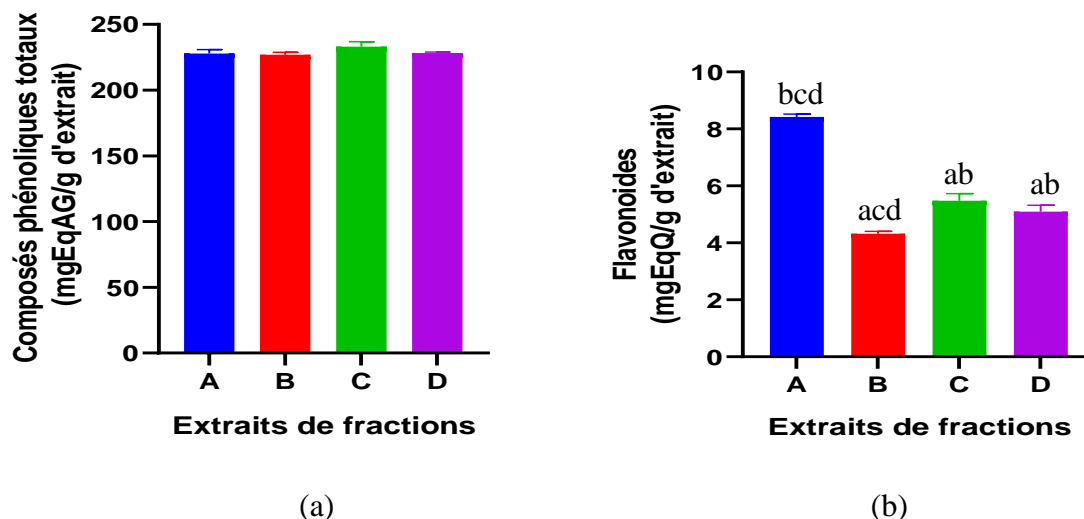
| Fractions | A | B | C | D |
|--------------------|---|---|---|---|
| Polyphénols | + | + | + | + |
| Flavonoïdes | + | + | + | + |
| Tanins | + | + | + | + |
| Coumarines | + | + | + | + |
| Glycosides | + | + | + | + |
| Saponines | + | + | + | + |

+ = présent ; A = fraction >300 μ m ; B = fraction < 300 μ m ; C = fraction >100 μ m et D = fraction <100 μ m

Le Tableau 8 nous montre en effet que ces extraits de fractions contiennent de nombreux métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes, tanins, coumarines, glycosides et saponines) biologiquement actifs.

III.1.2.2. Taux des composés phénoliques totaux et flavonoïdes des extraits de fractions de la plante

Les composés phénoliques étant des composés aux activités biologiques très variées, leurs taux ont été évalués dans les différents extraits de fractions de plante.



Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type des 3 essais.

a, b, c, d : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D.

A = fraction $>300\mu\text{m}$; B = fraction $<300\mu\text{m}$; C = fraction $>100\mu\text{m}$ et D = fraction $<100\mu\text{m}$.

Figure 15 : Taux des composés phénoliques totaux et flavonoïdes des extraits de fractions de la plante.

De la Figure 15 (a) et (b), il ressort que les teneurs en composés phénoliques totaux sont comparables pour l'ensemble des extraits de fractions. Quant à celles des flavonoïdes, elles varient en fonction des extraits de fractions dont l'extrait de la fraction A présente une forte teneur en flavonoïdes.

III.1.3. Activité antioxydante des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

III.1.3.1. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire a été déterminée en évaluant la capacité de ces extraits de fractions à piéger le radical DPPH. Cela a été fait à plusieurs concentrations d'extraits et la Figure 16 (Annexe 4) montre les résultats obtenus.

D'après la Figure 16, on constate que seules les concentrations en extraits supérieures à $10\mu\text{g/ml}$ ont une activité anti-radicalaire importante et le piégeage du radical DPPH par ces extraits de fractions évolue de manière concentration-dépendante. Cela nous a permis de déterminer les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) des extraits de fractions granulométriques regroupés dans le Tableau 9 ci-après.

Tableau 9 : CI₅₀ de l'activité de piégeage du radical DPPH par les fractions de *Lepidobotrys staudtii*

| Fractions | A | B | C | D | AA |
|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| CI ₅₀ ± Écart type (En µg/ml) | 3,13 ± 0,08 ^{c, e} | 3,10 ± 0,11 ^{c, e} | 5,22 ± 0,80 ^{d, e} | 2,96 ± 0,04 ^{c, e} | 10,43 ± 0,06 ^{a, b, c, d} |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type des 3 essais (triplicata).

a, b, c, d, e : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D, AA.

A = fraction >300µm ; B = fraction <300 µm ; C = fraction >100µm et D = fraction <100 µm ; AA= Acide ascorbique.

Du Tableau 9, il en ressort que l'extrait de la fraction D présente la meilleure capacité à piéger le radical DPPH de façon non significativement différente aux extraits de fractions A et B. Cependant, tous les extraits de fractions sont plus actifs que le standard (Acide ascorbique).

III.1.3.2. Activité réductrice du fer (FRAP)

Il était question pour nous ici, de déterminer la capacité de nos extraits de fractions à stimuler la réaction de réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺).

D'après la Figure 17 (Annexe 4), on constate que la réduction du fer III en fer II par ces extraits de fractions s'est faite de manière concentration dépendante. Cependant, on remarque que l'acide ascorbique a réalisé une réduction du fer plus efficace que les extraits de fractions. Le Tableau 10 suivant montre les concentrations efficaces 50 (CE₅₀) du pouvoir réducteur de ces extraits de fractions.

Tableau 10 : CE₅₀ de l'activité réductrice du fer des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

| Fractions | A | B | C | D | AA |
|---|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| CE ₅₀ ± Écart type (En µg/ml) | 19,13 ± 0,46 ^{c,d,e} | 18,65 ± 0,6 ^{c,d,e} | 15,02 ± 0,03 ^{a,b,e} | 15,55 ± 0,04 ^{a, b, e} | 12,81 ± 0,30 ^{a, b, c, d} |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type des 3 essais (triplicata).

a, b, c, d, e : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D, AA.

A = fraction >300µm ; B = fraction <300 µm ; C = fraction >100µm et D = fraction <100 µm ; AA= Acide ascorbique.

Le Tableau 10 montre que l'extrait de la fraction C possède la meilleure capacité à réduire le fer III en fer II et de manière non significativement différente par rapport à celui de la fraction D. Le standard (acide ascorbique) présentant une activité plus élevée.

III.1.3.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

La capacité des différents extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* et de l'acide ascorbique à inhiber la peroxydation des lipides membranaires a été effective. Ces résultats sont représentés sur la Figure 18 (Annexe 4).

La Figure 18 montre que l'activité inhibitrice des extraits de fractions granulométriques d'écorces de *Lepidobotrys staudtii* vis-vis de la peroxydation lipidique évolue de manière concentration dépendante. De ce fait, le Tableau 11 nous montre les valeurs des CI₅₀.

Tableau 11 : CI₅₀ de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*.

| Fractions | A | B | C | D | AA |
|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------|
| CI ₅₀ ± Écart | 29,85 ± | 14,11 ± | 38,35 ± | 24,68 ± | 1,16 ± |
| type (En µg/ml | 1,51 ^{b,e} | 0,17 ^{c,e} | 3,18 ^{b,d,e} | 1,15 ^{c,e} | 0,03 ^{a, b, c, d} |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type des 3 essais (triplicate).

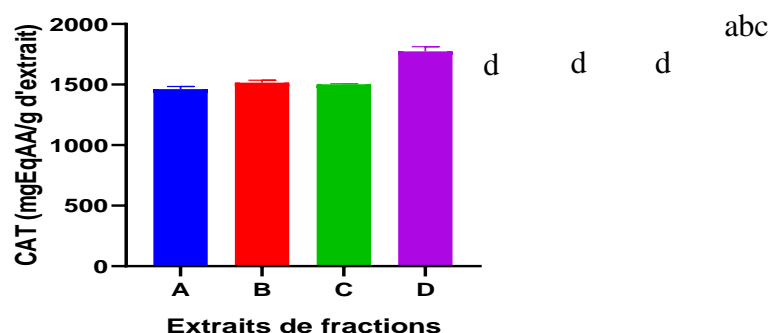
a, b, c, d, e : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D, AA

A = fraction >300µm ; B = fraction <300 µm ; C = fraction >100µm et D = fraction <100 µm ; AA= Acide ascorbique.

Du Tableau 11, nous remarquons que l'extrait de la fraction B présente la meilleure activité inhibitrice de la peroxydation lipidique de manière non significativement différente à l'extrait de la fraction D, toutefois le composé standard (acide ascorbique) présente une meilleure activité.

III.1.3.4. Capacité antioxydante totale

La détermination de la capacité antioxydante totale s'est faite par la méthode du phosphomolybdène, les résultats exprimés en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait de la plante (mgEq AA/g d'extrait).



Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type des 3 essais (triplicata).

a, b, c, d : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D.

A = fraction $>300\mu\text{m}$; B = fraction $<300\mu\text{m}$; C = fraction $>100\mu\text{m}$ et D = fraction $<100\mu\text{m}$.

Figure 16 : Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*.

La Figure 16 montre la capacité antioxydante totale des extraits de fractions en (mgEq AA/g d'extrait) évaluée par la réduction du complexe phosphomolybdique. Ainsi, l'extrait de la fraction D présente la meilleure capacité antioxydante.

III.1.4. Activité anti-inflammatoire des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

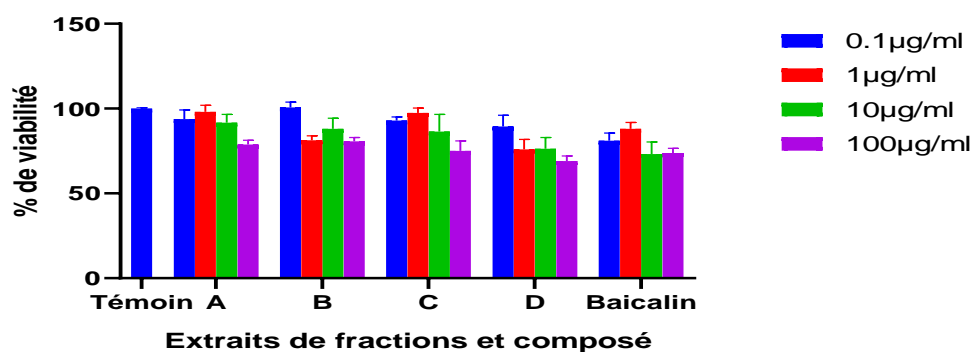
III.1.4.1. Viabilité des macrophages en culture et cytotoxicité des extraits de fractions sur la culture

III.1.4.1.1. Viabilité des macrophages primaires au bleu Trypan

Les macrophages ont été isolés avec une viabilité de 100% car aucune cellule morte n'a été observée au microscope optique lors du comptage.

III.1.4.1.2 Cytotoxicité des extraits de fractions au MTT

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits de fractions d'écorce de *Lepidobotrys staudtii* sur les macrophages primaires a été faite au MTT (à différentes concentrations d'extraits). Le résultat obtenu est présenté sur la Figure 17.



Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type des 3 essais (triplicata).

A = fraction $>300\mu\text{m}$; B = fraction $<300\mu\text{m}$; C = fraction $>100\mu\text{m}$ et D = fraction $<100\mu\text{m}$.

Figure 17 : Cytotoxicité au MTT des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* sur une culture primaire de macrophage

De la Figure 17, il en ressort que les extraits aux différentes concentrations (0,1 à 100 $\mu\text{g/ml}$) n'ont pas significativement ($p < 0,05$) affecté la viabilité ($>70\%$) des macrophages en culture.

III.1.4.2. Effet des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* sur la production d'oxyde nitrique par les macrophages

La capacité des extraits de fractions de plante à réguler la production de l'oxyde nitrique par les macrophages a été testée et le résultat est présenté sur la Figure 21 (Annexe 4).

De la Figure 21, on constate une baisse significative de la production de l'oxyde nitrique (NO) par les macrophages activés en présence des extraits de fractions par rapport au témoin. Le Tableau 12 présente les concentrations inhibitrices 50 des différents extraits de fractions sur la production du NO.

Tableau 12 : CI_{50} de l'activité inhibitrice des extraits de fractions de la plante sur la production du NO

| Fractions | A | B | C | D | Baicalin |
|--|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| $CI_{50} \pm$ Écart type (En $\mu\text{g/ml}$) | 0,12 \pm 0,01 ^b | 15,65 \pm 0,68 ^{a,c,e} | 0,36 \pm 0,07 ^b | 1,38 \pm 0,15 | 0,18 \pm 0,03 ^b |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type des 3 essais (triplicata).

a, b, c, d, e : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D, AA.

A = fraction $>300\mu\text{m}$; B = fraction $<300\mu\text{m}$; C = fraction $>100\mu\text{m}$ et D = fraction $<100\mu\text{m}$.

Du Tableau 12, il en ressort que l'extrait de la fraction A possède une meilleure activité inhibitrice de la synthèse de ce médiateur par rapport l'extrait de la fraction C et le standard (Baicalin) de façon non significativement différente.

III.1.4.3. Effet des extraits de fractions de plante sur l'activité de la 5-lipoxygénase de macrophages

L'activité inhibitrice des extraits de fractions sur la 5-lipoxygénase des macrophages de rats a été évaluée et les résultats sont présentés sur la Figure 22 (Annexe 4).

De la Figure 22, nous constatons que l'activité de cette enzyme en présence des extraits de fractions évolue de manière concentration dépendante. Le Tableau 13 nous présente les concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) de ces extraits de fractions sur l'activité de cette enzyme.

Tableau 13 : CI₅₀ de l'activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase par les extraits de fractions de la plante

| Fractions | A | B | C | D | Baicalin |
|---|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CI ₅₀ ± Écart type (En µg/ml) | 0,20 ± 0,01 ^b | 68,13 ± 7,08 ^{a,c,d,e} | 4,80 ± 0,33 ^b | 4,55 ± 0,64 ^b | 0,09 ± 0,03 ^b |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type des 3 essais (triplicata).

a, b, c, d, e : différences significatives respectivement par rapport à A, B, C, D, AA.

A = fraction >300µm; B = fraction <300 µm; C = fraction >100µm et D = fraction <100 µm.

Le Tableau 13 montre que l'extrait de la fraction A présente la meilleure activité inhibitrice de cette enzyme par rapport aux extraits de fractions C et D ainsi que le standard (Baicalin) de façon significativement non différente.

III.1.5. Meilleurs extraits de fractions antioxydant et anti-inflammatoire

Tableau 14 : Calcul de scores

| | A | B | C | D |
|---------------------------------|-----|---|-----|-----|
| DPPH | 3 | 2 | 4 | 1 |
| FRAP | 4 | 3 | 1 | 2 |
| MDA | 3 | 1 | 4 | 2 |
| CAT | 4 | 2 | 3 | 1 |
| Score tests antioxydants | 3,5 | 2 | 3 | 1,5 |
| NO | 1 | 4 | 2 | 3 |
| 5-LOX | 1 | 4 | 3 | 2 |
| Score tests anti-inflammatoires | 1 | 4 | 2,5 | 2,5 |

A = fraction >300µm; B = fraction <300 µm; C = fraction >100µm et D = fraction <100 µm.

Ainsi, l'extrait de la fraction D possède le meilleur potentiel antioxydant et celui de la fraction A présente le meilleur potentiel anti-inflammatoire. De plus, ces deux extraits de fractions ont les meilleurs teneurs en flavonoïdes.

III.1.6. Activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

L'activité antiplasmodiale *in vitro* des extraits de fractions granulométriques sélectionnés a été évaluée sur les souches *Pf3D7* et *PfDd2* utilisant le test de SYBR Green I après 72h d'exposition dans les cultures synchrones. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : CI₅₀ des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* sur *Pf3D7* et *PfDd2*

| Codification | CI ₅₀ (Moy. ± ET) (µg/ml) | | Indice de Résistance (IR) |
|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | <i>PfDd2</i> (Multi-résistante) | <i>Pf3D7</i> (Sensible) | |
| A | 19,42±1,21 | 21,88±1,69 | 0,88 |
| D | >100±ND | 19,88±2,00 | 5,03 |
| Z (A+D) | 29,85±3,65 | 8,88±1,08 | 3,36 |
| Art (µM) | 0,02±0,00 | 0,03±1E-05 | 0,66 |
| CQ (µM) | 0,73±0,09 | 0,04±0,00 | 18,25 |

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type des 2 essais (double)

A = fraction >300µm; **D** = fraction <100 µm ; **Z** = A+D ; **Art** = Artémisinine et **CQ** = Chloroquine, **ND** = Non déterminé.

Il ressort du Tableau 15 que les CI₅₀ des extraits de fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *L. staudtii* varient de 8,88 à >100 µg/ml.

L'activité antiplasmodiale est classée selon les critères de classification de **Pekam et al., (2025)** dans le Tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16 : Critères de classification de l'activité antiplasmodiale des extraits de fractions

| CI ₅₀ (µg/ml) | Activité | Souche multi-résistante | Souche sensible |
|----------------------------|-------------|-------------------------|-----------------|
| CI ₅₀ < 5 | Très actif | | |
| 5 ≤ CI ₅₀ < 15 | Prometteuse | | Z |
| 15 ≤ CI ₅₀ < 50 | Modérée | A et Z | A et D |
| CI ₅₀ ≥ 50 | Inactif | D | |

III.2. Discussion

Le paludisme est une maladie infectieuse potentiellement mortelle due à plusieurs espèces de parasites du genre *Plasmodium* (OMS, 2024). L'élimination de cet agent pathogène de l'organisme passe par l'implication de divers mécanismes oxydatifs et inflammatoires. Dans certains cas, on assiste à un dérèglement de ces mécanismes de défenses, cela contribue à la pathogénèse de la maladie (Vasquez *et al.*, 2021). L'objectif général de ce travail est d'évaluer *in vitro* les potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii*. L'extrait aqueux de la fraction de poudre plus fine (fraction <100 µm) a présenté le meilleur rendement. Cela est en accord avec les résultats de Laurent *et al.*, (2023) qui ont démontré que le rendement d'extraction augmente avec la diminution de la granulométrie de la poudre de *Parkia biglobosa* et suggère qu'une extraction efficace nécessite une faible granulométrie. En effet, elle favorise la dissolution d'un grand nombre de substances solubles dans le solvant augmentant ainsi le rendement. Les extraits obtenus ont été utilisés pour l'évaluation des activités biologiques.

Le stress oxydatif est la conséquence d'une surproduction des radicaux libres. Ces derniers étant capables de s'attaquer aux macromolécules biologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Les composés antioxydants sont généralement capables de neutraliser ces radicaux libres (Al-dalaen & Al-qtaitat, 2014). C'est ainsi que nous avons évalués lors de ce travail l'effet des extraits de fractions granulométriques de poudre d'écorce de *L. staudtii* sur le stress oxydatif. Il en résulte que les extraits des fractions de *L. staudtii* piègent le radical DPPH avec une activité plus élevée pour l'extrait de la fraction <100 µm (D) (CI₅₀=2,96±0,04µg/ml), bien supérieur à celle de l'acide ascorbique (CI₅₀=10,43±0,06µg/ml). Cela traduit la capacité de ces extraits à piéger les espèces radicalaires néfastes produites en conditions de stress oxydatif lors du paludisme. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Pechangou *et al.*, (2022) avec l'extrait aqueux de *Codiaeum variegatum*. Par la suite, le test de réduction du fer a montré que l'extrait de la fraction <100 µm (D) présente une meilleure capacité à réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ (CE₅₀=15,55±0,04µg/ml) mais inférieur à celle de l'acide ascorbique (CE₅₀=12,81±0,3µg/ml) ; cela montre en effet à quel point cet extrait pourrait intervenir dans le métabolisme du fer. Puisque, la majorité du fer apportée par l'alimentation est sous la forme Fe³⁺. Cette forme n'étant pas biodisponible, elle est convertie en fer ferreux (Fe²⁺) pour son absorption ; il existe de nombreux composants capables de réaliser cette réduction, en particulier l'acide ascorbique (Vaulont, 2017). Après cela, nous avons évalué l'activité inhibitrice des extraits de fractions sur la peroxydation lipidique induite par le

peroxyde d'hydrogène, il en est ressorti que l'extrait de la fraction <100 µm (D) (CI₅₀ = 24, 68 ± 1, 15 µg/ml) a indiqué une inhibition efficace bien que significativement moins actif que l'acide ascorbique (CI₅₀ = 1, 16 ± 0, 03 µg/ml). Ce qui suggère que l'extrait de cette fraction protégerait bien les lipides membranaires contre l'effet des pro-oxydants, un taux élevé du MDA signe d'une peroxydation lipidique est observé chez les patients atteints de paludisme (**Vasquez et al., 2021**). Par ailleurs, la capacité antioxydante totale des extraits de fractions de poudre a été évaluée grâce à la réduction du complexe phosphomolybdique dont l'extrait de la fraction <100 µm (D) a montré une fois de plus la meilleure capacité (1773 ± 37,91 mgEq AA/g d'extrait).

À travers ces tests, nous avons pu démontrer que l'extrait de la fraction <100 µm (D) possède le meilleur potentiel à réagir en cas de stress oxydatif.

Dans l'organisme, le processus inflammatoire chez les macrophages implique divers acteurs comme les médiateurs pro et anti-inflammatoires (NO, TNFα, Il-1β / Il-4, Il-6, Il-10, TGFβ). Ceux-ci peuvent agir par la production ou l'inhibition de la production des EORs et des ENRs, par l'activation des voies enzymatiques (Lipoxygénases, cyclooxygénases). Tout cela est réalisé en vue d'éliminer un agent pathogène (**Ondua et al., 2019**). L'oxyde nitrique (NO) synthétisé par les cellules endothéliales et la 5-lipoxygénase (5-LOX) produite par les leucocytes sont deux molécules qui interviennent dans la réponse immunitaire et l'inflammation lors du paludisme. Leur hyperactivité peut également exacerber l'inflammation palustre (**Werz et al., 2014**). C'est pourquoi dans ce travail l'effet des extraits de ces fractions a été évalué sur la production de certains médiateurs inflammatoires. Dans un premier temps, la gamme de concentration non toxique des extraits de fractions a été déterminée au moyen du test au MTT. Il s'agit d'un sel de tétrazolium qui cible principalement l'effectivité du processus respiratoire à travers l'activité des enzymes déshydrogénases mitochondriales. Il apparaît que les extraits de fractions aux différentes concentrations (0,1 à 100 µg/ml) n'ont pas significativement affecté la viabilité des macrophages en culture (extrait non toxique). Après cela, nous avons constaté une baisse significative (p<0,05) de la quantité de NO produite par les macrophages par rapport au témoin et de manière concentration dépendante. En effet, l'oxyde nitrique est un médiateur pro-inflammatoire synthétisé par la NO synthétase à partir de l'arginine. Il est impliqué dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins pendant l'inflammation et joue un rôle crucial dans le contrôle des infections paludéennes en particulier pendant la phase sanguine asexuée du cycle de vie du parasite (**Zheng et al., 2013**); l'inhibition de sa synthèse est donc un signe d'une activité anti-inflammatoire. Ainsi, l'extrait de la fraction >300 µm (A) a révélé une meilleure activité inhibitrice (CI₅₀ = 0, 12 ± 0, 01µg/ml) de façon non significativement différente au

baicalin ($CI_{50} = 0,18 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats sont meilleurs à ceux obtenus par **Enang et al., (2023)** qui a démontré que l'extrait de *Pentaclethra macrophylla* inhibe la production du NO produit par les macrophages avec une $CI_{50} = 5,799 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$. Par la suite, l'effet des extraits de fractions sur l'activité de la 5-lipoxygénase a été évalué. Cette enzyme qui permet la synthèse des leucotriènes (LTB₄) responsable du recrutement des cellules immunitaires au site de l'inflammation. Nous avons ainsi pu constater que l'extrait de la fraction >300 μm (A) a inhibé et de manière concentration dépendante l'activité de la 5-lipoxygénase avec une $CI_{50} = 0,21 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ non significativement différente que le baicalin ($CI_{50} = 0,09 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$).

Au regard de ce qui précède, l'extrait de la fraction <100 μm (D) a été sélectionné sur la base de scores comme le meilleur antioxydant et celui de la fraction >300 μm (A) le meilleur anti-inflammatoire pour l'évaluation de l'activité antiplasmodiale. Nous avons également fait une combinaison (Z) (50:50) de ces deux meilleurs extraits afin d'optimiser l'effet des extraits de fractions sur le *Plasmodium falciparum*.

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Le cycle de vie du parasite comprend plusieurs étapes dont la phase asexuée, appelée le stade sanguin qui se produit chez l'hôte humain. Cette phase est principalement responsable de l'apparition des symptômes et sert de cible principale des médicaments antipaludiques (**Pekam et al., 2025**). Ainsi, l'activité antiplasmodiale au stade sanguin des extraits de fractions de *L. staudtii* a été évaluée sur les souches de *P. falciparum* chloroquino-sensible (*Pf3D7*) et multi-résistante (*PfDd2*) utilisant le test de SYBR Green I. Il en ressort que les extraits des fractions <100 μm (A) et >300 μm (D) ont montrés une activité antiplasmodiale modérée ($CI_{50}=21,88\pm 1,69$ et $19,88\pm 2,00 \mu\text{g/ml}$ respectivement) par rapport à la fraction Z (A+D) ayant montré une activité antiplasmodiale prometteuse ($CI_{50}=8,88\pm 1,08 \mu\text{g/ml}$) sur la souche chloroquino-sensible (*Pf3D7*). En ce qui concerne la souche multi-résistante (*PfDd2*), les extraits des fractions A et Z ont montrés une activité antiplasmodiale modérée (CI_{50} respectives $=19,42\pm 1,21$ et $29,85\pm 3,65 \mu\text{g/ml}$) cependant l'extrait de la fraction D était inactif ($CI_{50} >100\pm \text{ND} \mu\text{g/ml}$). De plus, l'extrait de la fraction A a donné un IR de 0,88 ce qui suggère que cet extrait agirait préférentiellement sur la souche multi-résistante ; à l'inverse les extraits de fractions D et Z agiraient de préférence sur la souche sensible (IR respectifs = 5,03 et 3,36). Ces résultats sont différents à ceux obtenus par **Pekam et al. (2025)** avec les extraits bruts et fractions de *L. staudtii* sur les souches de *P. falciparum* chloroquino-sensible (*Pf3D7*) et multi-résistante (*PfDd2*), qui avait obtenu une activité antiplasmodiale prometteuse ($CI_{50} <10 \mu\text{g/ml}$)

pour tous les extraits bruts et fractions. La différence d'activité observée entre ces résultats pourrait s'expliquer par leur distribution écologique, le système de solvant utilisé pour extraire les métabolites secondaires, etc. (**Jiatsa et al., 2022**).

Dans le but de pouvoir déterminer les familles de composés biochimiques pouvant soutenir ces activités, nous avons réalisé un screening phytochimique de ces quatre extraits de fractions. De là, nous avons remarqué la présence de phénols, flavonoïdes, tanins, coumarines, glycosides et saponines pour tous les extraits de fractions. Des familles de composé majeurs ayant démontré des activités avérées sur diverses voies de modulation de la réponse inflammatoire en condition pathologique d'infection par *Plasmodium falciparum* (**Chirawurah et al., 2017**).

Le dosage des composés phénoliques et flavonoïdes effectué ensuite nous a montré que tous les extraits des fractions sont riches en composés phénoliques en particulier les extraits de fractions A et D sont plus riches en flavonoïdes. En effet, dans la littérature, il y a un lien entre le taux de flavonoïdes et l'activité antiplasmodiale des plantes (**Ravipati et al., 2012 ; Oluba, 2019**).

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION

Parvenu au terme de cette étude portant sur l'évaluation *in vitro* des potentiels antiplasmodial, antioxydant et anti-inflammatoire des fractions granulométriques de la poudre d'écorce de *Lepidobotrys staudtii*, il en résulte que :

- L'extrait de la fraction <100 µm (D) possède le meilleur potentiel antioxydant à travers le piégeage du radical DPPH, la réduction du fer, la capacité antioxydante totale et l'inhibition de la peroxydation lipidique ;
- L'extrait de la fraction >300 µm (A) possède la meilleure activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la production de l'oxyde nitrique et l'activité de la 5-lipoxygénase ;
- L'extrait de la fraction >300 µm (A) et le combiné (Z) (50:50) présentent une activité antiplasmodiale modérée et prometteuse respectivement. En plus, ces extraits de fractions possèdent de nombreux métabolites secondaires responsables des activités biologiques observées et sont non toxiques pour les cellules en culture à des concentrations de 0,1 à 100 µg/ml.

Dans l'ensemble, *L. staudtii* est une plante médicinale intéressante de par les résultats obtenus et serait une source potentielle d'un candidat phytomédicament ayant des potentiels antioxydant, anti-inflammatoire et antiplasmodial.

PERSPECTIVES

Dans le but d'approfondir ces travaux, nous envisageons dans un avenir proche de :

- Identifier des composés actifs à l'origine des activités étudiées ;
- Déterminer l'effet de ces deux meilleurs extraits *in vivo* sur un modèle humain du paludisme ;
- Déterminer le mécanisme d'action antiplasmodial de ces deux meilleurs extraits.

REFERENCES

REFERENCES

1. **Abdel Azizi, M., Anangmo, N. C. N., Cédric, Y., Nkadeu, G. G. A., Sidiki, N. N. A., Noutong, T. J. S., Djimefo, T. A. K. and Payne, V. K. (2023).** In vitro Antiplasmodial, Cytotoxicity and Antioxidant Activities of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae): A Cameroonian Plant Commonly Used to Treat Malaria. *Journal of Tropical Medecine*, 2023, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/4061592>.
2. **Al-dalaen, S. M., & Al-qtaitat, A. I. (2014).** Review article : Oxidative stress versus antioxidants. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5), 60–71. <https://doi.org/10.11648/j.bio.20140205.11>.
3. **Alfonso-prieto, M., Biarne, X., & Vidossich, P. (2009).** The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *J. AM. CHEM. SOC.*, 131(33), 11751–11761. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>.
4. **Ambroise-Thomas, P. (2007).** La petite et la grande histoire du paludisme. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 191(9), 1849-1857.
5. **Anosike, C. A., Obidoa, O., & Ezeanyika, L. U. S. (2012).** Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(76), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-76>.
6. **Argy, N. and S. H. (2018).** Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme. *Actualités Pharmaceutiques*, 574, 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.01.004>.
7. **Ashenafi, E. and Fikadu, M. (2023).** Malaria : An Overview. *Infection and Drug Resistance*, 16, 3339–3347. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/IDR.S405668>.
8. **Ashley, E. A., Phyto, A. P., & Woodrow, C. J. (2018).** Malaria. *Lancet*, 391, 1608–1621. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).
9. **Bansal, S. K. (1987).** Carbohyhydrate metabolism in the rat peritonéal macrophages. *Journal of Biological Sciences*, 12(1), 415-42.
10. **Barnes, P. J. (2011).** Glucocorticosteroids : current and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 163, 29–43. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01199.x>.
11. **Bartoloni, A., & Zammarchi, L. (2012).** Clinical Aspects of f Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e201 2026,. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.026>.

12. **Batool, U., Abbas, K., Batool, U., Memon, A. S., & Soomro, S. (2021).** Oxidative Stress: A Double Edged Sword. *Biosight*, 02(01), 4–12.
13. **Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
14. **Bokesch, H. R., McKee, T. C., Currens, M. J., Gulakowski, McMahan, Cardellina II J. H. and Boyd M. R. (1996).** HIV-Inhibitory Gallotannins from *Lepidobotrys staudtii*, *Natural Product Letters*, 8(2), 133-136. <http://dx.doi.org/10.1080/10575639608043252>.
15. **Botanico Hub (2025, 06 juin).** Plant-families. Lepidobotryaceae. Botanico Hub. <http://botanicohub.com/plant-families/Lepidobotryaceae>.
16. **Boulanger, T. (Pharmacien). (2017).** Pharmacologie : Anti-inflammatoires. IFSI. Présentation PowerPoint.
17. **Bouquet, A. (1969).** Féticheurs et médecine traditionnelle du congo (Brazzaville). *Office de la recherche scientifique et technique outre-mer*. 305 pages.
18. **Calhella, R. C., Haddad, H., Ribeiro, L., Heleno, S. A., Caroch, M., & Barros, L. (2023).** Inflammation : What ' s There and What ' s New ? *Applied Sciences*, 13(2312.), 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app13042312>.
19. **Caner Gunaydin, S. Sirri Bilge. (2018).** Effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens au niveau moléculaires. *Eurasian J Med.*, 50 (2), 116-121.
20. **Centers for Disease Control and prevention (CDC) (2015).** Malaria. Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites. <http://medbox.iab.me/modules/en-cdc/cdc/www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>.
21. **Chen, Q., Schlichtherle, M., and Wahlgren, M., (2000).** Molecular Aspects of Severe Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 439-450.
22. **Culleton, R., Coban, C., Zeyrek, F.Y., Cravo, P., Kaneko, A., Randrianarivelosia, M., Andrianaranjaka, V., Kano, S., Farnert, A., Arez, A.P., Sharp, P.M., Carter, R. and Tanabe, K. (2011).** The origins of African *Plasmodium vivax* ; insights from mitochondrial genome sequencing. *PLo One*, 6(12), 29137.
23. **Danis, M. and Mouchet, J. (1991).** Palusdisme. *Ellipses*. 240.
24. **Dhar, P., Tayade, A. B., Bajpai, P. K., Sharma, V. K., Das, S. K., Chaurasia, O. P., Srivastava, R. B., Singh, S. B. (2012).** Antioxidant capacities and total

- polyphenol contents of hydroethanolic extract of phytococktail from Trans-Himalaya. *Journal of Food Science*, 77(2), 156-161.
25. **Dobbs, K. R., Crabtree, J. N., & Dent, A. E. (2021)**. Innate Immunity to Malaria, The Role of Monocytes. *Immunol Rev.*, 293(1), 8–24. <https://doi.org/10.1111/imr.12830>.Innate.
26. **Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017)**. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7(324), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00324>.
27. **Elgazzar, A. H., & Elmonayeri, M. (2015)**. Inflammation. *A.H. Elgazzar (Ed.), The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*, 69–98. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06112-2>.
28. **Eming, S. A., Krieg, T., Davidson, J. M., & Hall, R. P. (2007)**. Inflammation in Wound Repair : Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
29. **Enang II, E. B., Pechangou, N. S., Njayou, F. N., Medoua, M. L., and Moundipa, F. P. (2023)**. Screening of ten wild fruits extracts from Cameronn’s flora for their anti-inflammatory and antioxidant potential. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 18(01), 781-795.
30. **Favier, A. (2006)**. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*, 64, 390–396.
31. **Garcia, L. S. (2010)**. Malaria. *Clin Lab Med*, 30, 93–129. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.001>.
32. **Gomes, A. R. Q., Cunha, N., Varela, E. L. P., Cordovil Brígido, P. H., Vale, V. V., Dolabela, M. F., E. P. de C. and S. P. (2022)**. Oxidative Stress in Malaria : Potential Benefits of Antioxidant Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5949), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms23115949>.
33. **Guija-guerra, H., & Guija-poma, E. (2023)**. Radicales libres y sistema antioxidante, *Horiz Med (Lima)*, 23(2), e2158. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2023.v23n2.12>
34. **Gulcin, I. (2012)**. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.*, 83(3), 345-91. Doi:10.1007/s00204-011-0774-2.
35. **Haleng, J., Pincemail, J., Deffraigne, J. O., Charlier, C. et Chapelle, J.P. (2007)**. Stress oxydant, *Rev Med Liège*, 62, 10, 628-638.
36. **Ida Ghlichloo ; Valérie Gerriets (2023)**. Médicaments anti-inflammatoires non

- stéroïdiens (AINS). *Livre. National Library of Médecine (NIH)*.
37. **IUCN (2025)**. The IUCN Red List of Threatened Species. *Version 2025-1*. <http://www.iucnredlist.org>. ISSN 2307-8235.
38. **Jiatsa Mbouna, C. D., Tchatat Tali, B. M., Tsouh Fokou, P. V., Madiesse Kemgne, E. A., Keumoe, R., Toghueo Kouipou, R. M., Yamthe Tchokouaha, L. R., Tchunte Tchuenmogne, M. A., Kenou, D. K., Sahal, D., & Boyom, F. F. (2022)**. Specific sub fractions from *Terminalia mantaly* (H. Perrier) extracts potently inhibit *Plasmodium falciparum* rings, merozoite egress and invasion. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114909. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114909>.
39. **Kasturi, J., Palla, P. R., Bakshi, V., & Boggula, N. (2019)**. Non-steroidal anti-inflammatory drugs : an overview. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 9(1-s), 442–448. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i1-s.2287>.
40. **Kerrour Mohamed (Professeur). (2021)**. Cours de physiopathologie générale : Réaction inflammatoire. *Institut des Sciences Vétérinaire en Algérie*. 3-9.
41. **Kirk, K., Horner, H. A., Elford, B. C., Ellory, J. C., & Newbold, C. I. (1994)**. Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3339-3347. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41868-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41868-0).
42. **Koffi, J. A., Tano, D. K., Yavo, W., Suisse, C., & Scientifiques, D. R. (2020)**. Evaluation of antiplasmodial activity of extracts from endemic medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire. *BioImpacts*, 10(3), 151–157. <https://doi.org/10.15171/bi.2014.008>.
43. **Kokkas, B. (2010)**. Tissue injury and inflammation. *Annals of General Psychiatry*, 9(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1744-859X-9-S1-S1>.
44. **Kotepui, K. U., Mahittikorn, A., Mala, W., Lasom, S., Masangkay, F. R., Majima, H. J., & Kotepui, M. (2024)**. Total antioxidant status levels in malaria : a systematic review and meta - analysis. *Malaria Journal*, 23(198), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12936-024-05003-z>.
45. **Kumar RB, Karmakar I, Dolai N, Bala A, Mazumder UK, Kar B (2011)**. Antioxydant and in in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 976-980.

46. **Lambros, C., & Vanderberg, J. P. (1979).** Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *The Journal of Parasitology*, 65(3), 418-420. <https://doi.org/10.2307/3280287>.
47. **Laurent, B. A. G., Rainatou, B., Boladé, A. C., Belem-Kabré, W. L. M. E., Tata, T. K., Ouattara, S. W. N., Ouedraogo, S., Youl EH Noela, O. N. (2023).** Influence de la taille des particules sur les propriétés phytochimique, antioxydant et anti-inflammatoire de la poudre d'écorce du tronc de *Parkia biglobosa* (JACQ) (Fabaceae-Mimosadeae). *Journal internationale de recherche pharmaceutique*, 35(33), 15-27.
48. **Lu, S. C. (2013).** Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3143-53.
49. **Magoudjou Pekam, J.N., Efange, N.M., Mishro, L., Keumoe, R., Ndjakou, B.L., Ayong, L., Njayou, F.N., Moundipa, P.F., Rajendran, V., (2025).** *In vitro* Antiplasmodial Activities of Extracts and Fractions from *Lepidobotrys staudtii* against sensitive and resistant Blood-stage Parasities of *Plasmodium falciparum*, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2025.100610>.
50. **Mitul Patel, Muruganathan, Shivaling Gowda K, P. . (2012).** In Vivo Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti- Inflammatory Activity- A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 1(2), 1–5.
51. **Niba, P. T. N., Nji, A. M., Chedjou, J. P. K., Hansson, H., Hocke, E. F., Ali, I. M., Achonduh-Atijegbe, O., Evehe, M.-S. B., Jørgensen, M. H. M., Fomboh, C. T., Cui, L., Stresman, G., Bigoga, J. D., Alifrangis, M., & Mbacham, W. F. (2023).** Evolution of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance markers post-adoption of artemisinin-based combination therapies in Yaounde, Cameroon. *International Journal of Infectious Diseases*, 132, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.03.050>.
52. **Njomnang, P. and Benoit-Vical, F. (2007).** Are West African plants a source of future antimalarial drugs? *J. Ethnopharmacol*, 114(2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.012>.
53. **Noack, M., Kolopp-sarda, M., Immunogénomique, U., Herriot, H. E., Civils, H., Lyon, D., & Claude, U. (2018).** Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 499, 28–37. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(18\)30052-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30052-2).
54. **Olivier Werz, Olof Radmark, Dieter Steinhilber. (2014).** Progrès récents en

- Biochimie de la 5-lipoxygénase. WILEY Oline Library. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a002463>.
55. **Oluba, O. M. (2019)**. *Ganoderma* terpenoid extract exhibited anti-plasmodial activity by a mechanism involving reduction in erythrocyte and hepatic lipids in *Plasmodium berghei* infected mice. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0951-x>.
56. **Ondua M., Njoya E. M., Abdalla M. A., & McGaw, L. J. (2019)**. Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27-35. doi: 10.1016/j.jep.2018.12.030.
57. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2024)**. Dossier d'information. Principaux messages. Rapport 2024 sur le paludisme dans le monde.
58. **Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2024)**. Dossier d'information. Données et tendances régionales. Rapport 2024 sur le paludisme dans le monde.
59. **Pages, F., Orlandi-Pradines, E., et Corbel V. (2007)**. Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et maladies infectieuses*, 37, 153-161.
60. **Patil, A. P., Patil, V. V. and Patil, V. R. (2009)**. In vitro free radicals scavenging activity of *Madhuca indica* Gmel. *Pharmacology online*, 2, 1344-1352.
61. **Pechangou S. N., Enang II B. E., Ngohoba V. S., Njoya E. M., Njayou F. N., and Moundipa P. F. (2023)**. Crude Extracts of *Codiaeum Variegatum* Stem Exhibit Potent Antioxidant And Anti-inflammatory Activities in Vitro. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 8(1), 25-35. DOI:10.14218/JERP.2022.00039.
62. **Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., Van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhies, W. C., & Wells, T. N. C. (2017)**. *Malaria*. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
63. **Plan Stratégique National de Lutte contre le Paludisme au Cameroun 2019-2023 (PSNLP) (2019)**/ *MinSanté 2019*.
64. **Popa, G. L., & Popa, and M. I. (2021)**. Recent Advances in Understanding the Inflammatory Response in Malaria : A Review of the Dual Role of Cytokines. *Journal of Immunology Research*, 10–12. <https://doi.org/10.1155/2021/7785180>
65. **Prabhavathi, R. M., Prasad, M. P. and Jayaramu, M. (2016)**. Studies on

- qualitative and quantitative phytochemical analysis of *Cissus quadrangularis*. *Advances in Applied Science Research*, 7(4), 11-17.
66. Pradines, B., Dormoi, J., Briolant, S., Bogreau, H., & Rogier, C. (2010). La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2010 (422), 51.
67. Price, R. I. C. N., Simpson, J. A., Nosten, F., Luxemburger, C., Kuile, F. T. E. R., Chongsuphajaisiddhi, T. A. N., & White, N. J. (2015). Factors Contributing to Anemia after Uncomplicated Falciparum Malaria. *Am J Trop Med Hyg.*, 65(5), 614–622.
68. **Rapport d'Activités 2021 du Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) (2019)/ MinSanté 2022.**
69. Ravipati, A. S., Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P. T., Shanmugam, K., Munch, G., Wu, M. J., Satyanarayanan, M., Vysetti, B. (2012). Antixiodant and ant-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complement Altern Med.*, 12, 173. doi : 10. 1186/1472-6882-12-173.
70. Robert, V. & Boudin C. (2003). Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. *Bull Soc Pathol Exot.*, 96(1), 6-20.
71. Saifi, M. A., Beg, T., Harrath, A. H., Suleman, F., Altayalan, H., & Quraishy, S. Al. (2013). Antimalarial drugs : Mode of action and status of resistance. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(5), 148–156. <https://doi.org/10.5897/AJPPX12.015>.
72. Savithramma, N., Linga, R. M. and Suhrulatha, D. (2011). Screening of Medicinal plants for secondary metabolites. *MiddleEast Journal of science research*, 8 (3): 579-584.
73. Sillans, R., (1951). Sur quelques plantes médicinales de l'Afrique centrale. *Rev. Bot. Appl. Agric. Trop.*, 31, 407-427.
74. Shibeshi, Melkamu Adigo; Kfle, Z. D. and Atnafie, A. T. (2020). Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery. *Infection and Drug Resistance*, 13, 4047–4060.
75. Shio, M. T., Eisenbarth, S. C., Savaria, M., Vinet, A. F., Harder, K. W., Sutterwala, F. S., Bohle, D. S., Descoteaux, A., Richard, A., & Olivier, M. (2009). Malarial Hemozoin Activates the NLRP3 Inflammasome through Lyn and Syk Kinases. *PLoS Pathogens*, 5(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000559>
76. Signore, A. (2013). About inflammation and infection. *EJNMMI Research*, 3(8), 2–

3. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-8>.
77. **Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J. X., Wilairat, P., & Riscoe, M. (2004).** Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1803-1806. <https://doi.org/10.1128/aac.48.5.1803-1806.2004>
78. **Smit, F. J., van Biljon, R. A., Birkholtz, L.-M., & N'Da, D. D. (2015).** Synthesis and *in vitro* biological evaluation of dihydroartemisinin-chalcone esters. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.016>.
79. **Sorg, O., & Kaya, G. (2007).** Oxidative Stress in Human Pathology. *Advances in Gene, Molecular and Cell Therapy*, 1(1), 56–67.
80. **Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003).** Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay, *Sensors*, 3(1), 276-284. <https://doi.org/10.3390/s30800276>.
81. **Tane P., Tsopmo, A., Ndemo, D., Ayafor, J. F., and Sterner, O. (1996).** New Friedelane Triterpenes from *Lepidobotrys staudtii*. *Tetrahedron*, 52(41), 14989-14994.
82. **Titus, R. G., Gueiros-Filho, F.J., De Frietas, L. R., Berveley, S. M. (1995).** Development of a safe live leishmania vaccine line by gene replacement. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 92, 10267-10271.
83. **Trager, W. & Jensen, J. B. (1976).** Human malaria parasites in continuous culture. *Science Translational Medicine*, 193(4254), 673-675. <https://doi.org/10.1126/science.781840>.
84. **Trease, G. E. & Evans, W. C. (1989).** Trease and Evan's Textbook of Pharmacognosy. 13th Edition. Cambridge University Press, London. 546p.
85. **Turkson, B. K., Agyemang, A. O., Nkrumah, D., & Nketia, R. I. (2021).** Treatment of Malaria Infection and Drug Resistance, *IntechOpen*, 1–15. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98373>.
86. **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160. 1-40.
87. **Vasquez, M., Zuniga, M., & Rodriguez, A. (2021).** Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11, 1–8.

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768182>.
88. **Vaulont, S. (2017)**. Métabolisme du fer. *Archives de Pédiatrie*, 24, 5532-5539.
89. **Voronkova, Y. S., Voronkova, O. S., Gorban, V. A., & Holoborodko, K. K. (2018)**. Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants: a review. *Ecology and Noospherology*, 29(1), 52–55. <https://doi.org/10.15421/031809>
90. **Wai, I., Li, S., Chin, L., & Cheung, P. (2016)**. How Not to Miss a Case of Malaria in Emergency Department in Malaria Non-Endemic Areas ? Practical Approach & Experiences in Hong Kong. *Open Journal of Emergency Medicine*, 4, 93–109. <https://doi.org/10.4236/ojem.2016.44012>.
91. **World Health Organisation (WHO) (2024)**/ Cameroun. Regional office for Africa/ 2024.
92. **Xiao-Yu, S., Zhen-Y, U. W. and Jian-Ren, L. (2009)**. In vitro and vivo antioxidant activity of Pinus Koraiensis seed extracts containing phenolic Compound. *Food Chemistry* 117(1): 681-689.
93. **Yakoubi Mimouna (2022)**. Etude de la composition chimique et l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de Warionia saharae. Thèse de Doctorat en Sciences. Université MUSTAPHA Stambouli Mascara.
94. **Yougbaré-Ziebrou, M. N., Ouédraogo, N., Lompo, M., Bationo, H., Yaro, B., Gnoula, C., Sawadogo, W. R. and Guissou, I. P. (2016)**. Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de Saba senegalensis Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14, 213-219.
95. **Zheng, L., Feng, H., Liu, D., Pan Yan-Yan and Cao Ya-Ming. (2013)**. The expression of malaria invasion-related molecules is affected by two different nitric oxide-based treatments. *Folia Parasitologica*, 60(3), 213-217.
96. **Zheng, M., Liu, Y., Zhang, G., Yang, Z., Xu, W., & Chen, Q. (2023)**. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine , Food , and Cosmetics, *Antioxidants*, 12(1675), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox12091675>.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : liste des équipements de laboratoire utilisé

- ❖ Incubateur à CO₂ 5% ; Hôte à flux laminaire (BBS-H1100) ;
- ❖ Centrifugeuse réfrigérée 5804R de marque Eppendorf ;
- ❖ Bain marie (UNITRONIC 320 OR) ;
- ❖ Microscope optique (OLYMPUS AXIOVERT 40C) ; Microscope optique (Huma scope classic)
- ❖ Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-120-01 et GENESYS) ;
- ❖ Vortex (Karl Hecht KG VM4);
- ❖ pH-mètre ; Agitateur magnétique ; Balance à précision ; Chauffe ballon ; Bain marie ; Étuve (HP-AD070) ; Lecteur de plaque V230 ;
- ❖ Cellule de Malassez ; Tubes Eppendorf ; Tubes Falcon ; Tubes à essai ; micropipettes ; Filtre Nalgen (membrane 0,22µm) ;
- ❖ Trousse à dissection ; Portoirs ; Tubes à essai ; Bécher ; Ballon à fond rond ; Eprouvette ; Pissette ; Embouts.
- ❖ Lecteur de microplaques (Infinite M200, Tecan), Microplaques 96 puits (Sigma-Aldrich)

Annexe 2 : Procédures de préparation des réactifs tests antioxydants, anti-inflammatoires et antiplasmodiaux.

1. Étude du potentiel antioxydant

1.1 Inhibition de la peroxydation lipidique

- Solution de NaCl 0,9% (p/v)
 - Peser 1,8 g de NaCl
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 200 ml.
- Solution de KCl 1,15% (p/v)
 - Peser 5,75 g de KCl
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
- Solution de TCA 15% (p/v)
 - Peser 15 g de TCA
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de TBA 0,67% (p/v)
 - Peser 0,67 g de TBA

- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de FeCl_2 0,5mM
 - Peser 0,2 g de FeCl_2
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 50 ml
- Solution de H_2O_2 0,5mM (d = 1,11, %w = 30%)
 - Prélever 161 μl de H_2O_2
 - Diluer dans l'eau distillée qsp 50 ml

1.2 Dosage des polyphénols totaux

- Solution d'acide gallique (étalon): $C_p = 100 \mu\text{g/ml}$ et $V_f = 100 \text{ ml}$
 - Peser 0,01 g d'acide gallique
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml
- Solution de Folin-ciocalteu 2 N
 - Prélever 10 ml du réactif de Folin-ciocalteu
 - Diluer l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de Na_2CO_3 20% (p/v) et $V_f = 100 \text{ ml}$
 - Peser 20 g de Na_2CO_3
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

1.3 Dosages des flavonoïdes

- Solution de quercétine (étalon): $C_p = 10\mu\text{g/ml}$ et $V_f = 100 \text{ ml}$
 - Peser 0,001g de Quercétine
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml
- Solution d' AlCl_3 2% (m/v): $V_f = 100 \text{ ml}$
 - Peser 2g de AlCl_3
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml

2. Étude du potentiel anti-inflammatoire

- Solution de tampon phosphate salin (PBS) 0,1 M pH 7,4
 - Peser 3,07g de Na_2HPO_4 , 0,75g de KH_2PO_4 , de 1,268g KCl et 0,54g NaCl
 - Mélanger les différents sels ci-dessus, dissoudre dans environ 180 ml d'eau distillée vérifier le pH à l'aide d'un pH mètre et compléter le volume à 250mL avec de l'eau distillée. Homogénéiser le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique

- Solution d'amidon pour élicitation des macrophages
 - Peser 0,1g d'amidon
 - Dissoudre dans 5mL de PBS
- Solutions de NaCl pour la destruction des érythrocytes
 - ✓ **NaCl 0,05 M, (20mL)**
 - Peser 0,059g de NaCl
 - Dissoudre dans 20mL d'eau distillée
 - ✓ **NaCl 0.25 M (20ml)**
 - Peser 0,29g de NaCl
 - Dissoudre dans 20mL d'eau distillée
- Préparation du milieu de culture (DMEM : Dubelcco's Minimal Essential Medium)

La préparation du milieu de culture se fait dans un environnement aseptique. Pour créer une atmosphère de cette nature dans notre laboratoire, le milieu de culture a été préparé dans un environnement clos en présence des bruleurs de Bunsen.

Pour 1litre du milieu de culture, on pèse 10g de poudre DMEM et 0,5g de NaHCO₃. On dissout l'ensemble dans un peu d'eau distillée (300mL environ). On ajoute ensuite l'antibiotique Pénicilline de manière à obtenir les concentrations finales de 100UI/ml respectivement puis le volume est complété à 1 litre avec l'eau distillée et le mélange obtenu est aussitôt filtré sous une unité de filtration fonctionnant en présence d'une pompe à vide ou des unités de microfiltration. Le milieu est immédiatement aliquoté dans les tubes Falcon stériles de 50mL et conservé au frais à 4°C.

- Solutions de bleu Trypan pour coloration
 - ✓ Solution A (eau physiologique):
 - Peser 0,9g de NaCl
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillée qsp
 - ✓ Solution B
 - Peser 0,2g de bleu trypan
 - Dissoudre dans 100mL Solution A qsp
- Préparation de la suspension de levures *Saccharomyces cerevisiae* (5×10⁷ cellules/ml) 250µg/ml
 - Peser 0,06g Levures (en poudre)

- Dissoudre dans 200mL d'eau distillée
- Solution de MTT
 - Peser 50mg de MTT
 - Dissoudre dans 100ml de PBS
- Solution d'isopropanol acidifiée
 - Prélever un volume de 299mL Isopropanol
 - Diluer dans 1ml de HCl concentré
- Solutions pour dosage de l'activité des NO
 - ✓ Solution de Griess
 - Solution A
 - Peser 0,05g de Naphtyléthylène diamine dihydrochloride
 - Dissoudre dans 50ml d'eau distillée
 - Solution B
 - Peser 0,5g de Sulphanylamide
 - Dissoudre dans 50mL de HPO₄ 2,5%
- Solution de Paranitrophenylphosphate (p-NPP) (10mM)
 - Peser 0,22g de p-NPP
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillée
- Solution étalon de nitrite 100μM ; V = 10 ml
 - Peser 0,69 mg de Nitrite de sodium
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillé
- Solution pour l'inhibition de la lipoxigénase
 - ✓ Solution d'acide linoléique 125μM
 - Prélever 3,895μL d'acide linoléique
 - Diluer dans 100mL de tampon borate 0,1M pH 9 (ajouter 4mL à 95% d'éthanol avant d'y mettre le tampon)
 - ✓ Tampon borate 0, 1 M
 - Peser 12,41g d'acide borique
 - Dissoudre dans 1L d'eau distillée

3. Préparation du milieu de culture RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) pour le test d'activité antiplasmodiale

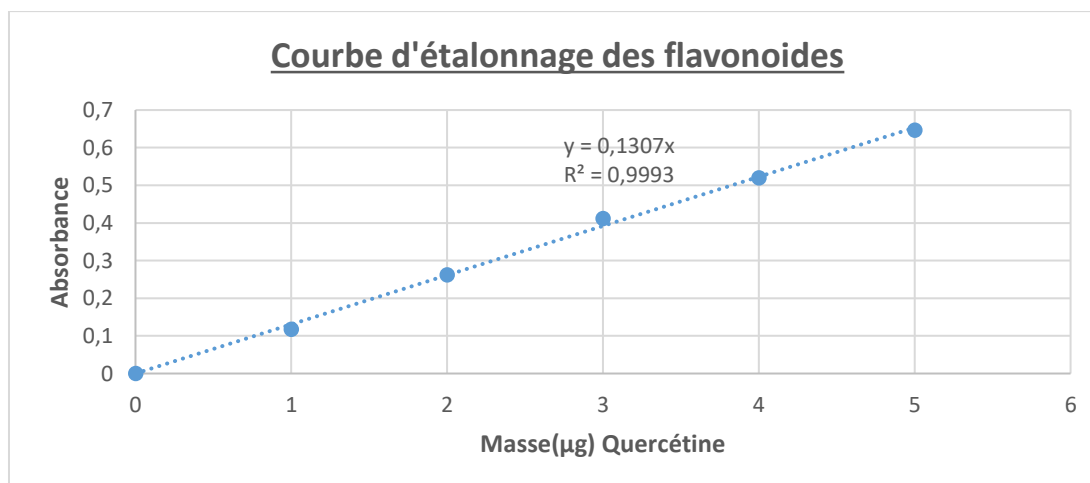
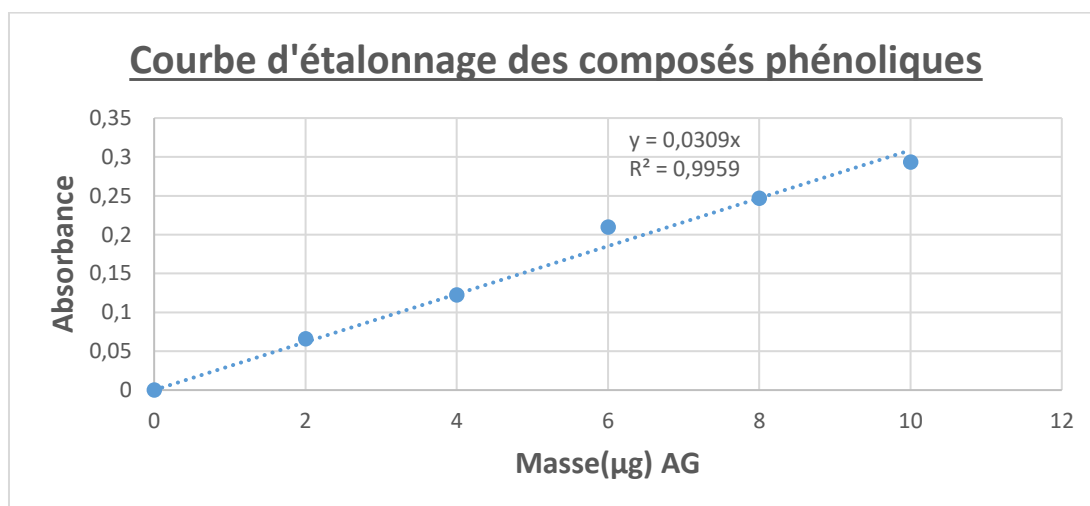
Dans un bocal stérile en verre d'un litre, les constituants suivants ont été ajoutés :

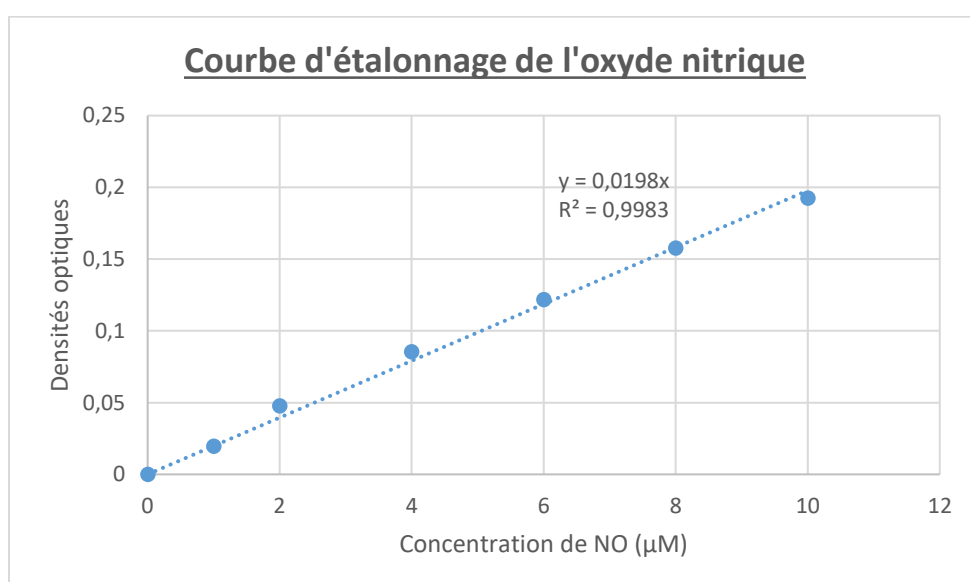
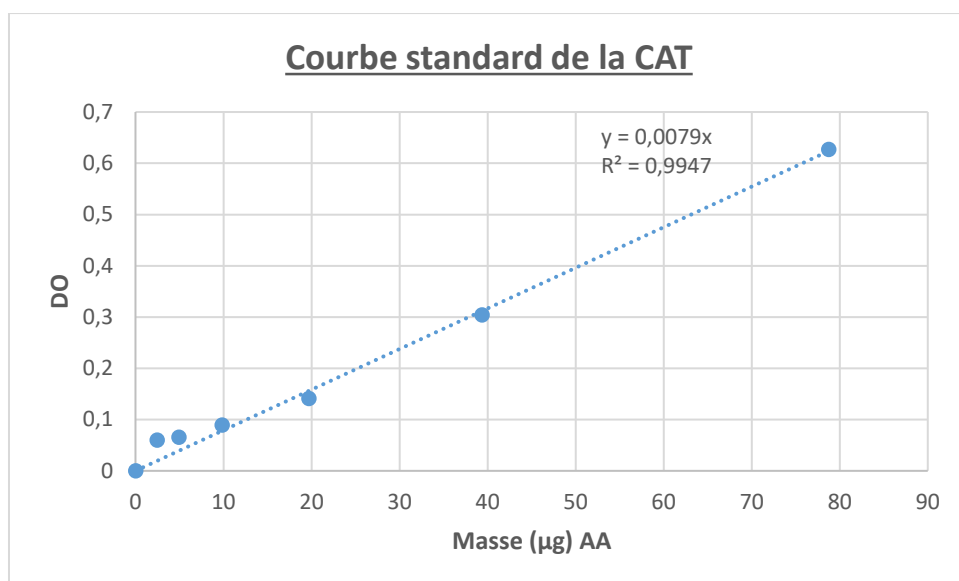
- 16,2g de poudre de RPMI 1640 avec la L-glutamine et HEPES ;

- 2,0 g de bicarbonate de sodium ;
- 2,0 g de D (+) –glucose ;
- 5,0 g d'albumax II (Gibco) ;
- 10ml (1 X) d'hypoxanthine ;
- 400 μ L (4 μ M) de Gentamicine.

Le mélange a été bien homogénéisé avec de l'eau distillée stérile puis filtré sous vide à l'aide d'un filtre millipore de 0,22 μ m, puis reparti dans des tubes falcons de 50ml et conservés à 4°C.

Annexe 3 : Courbes d'étalonnage





Annexe 4 : Figures des activités antioxydant et anti-inflammatoire des fractions granulométriques de *L. staudtii*

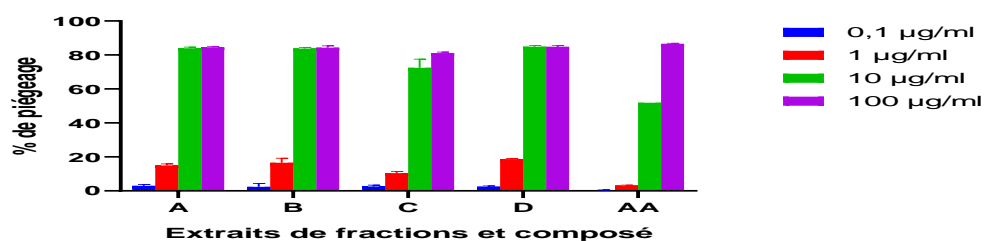


Figure 16 : Activité de piégeage du radical DPPH par les extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*.

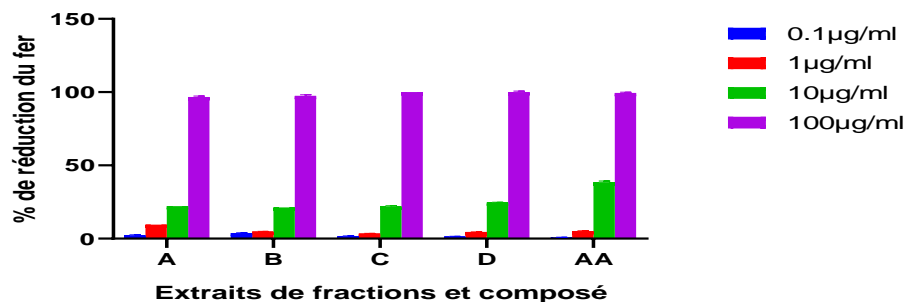


Figure 17 : Activité réductrice du fer des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*.

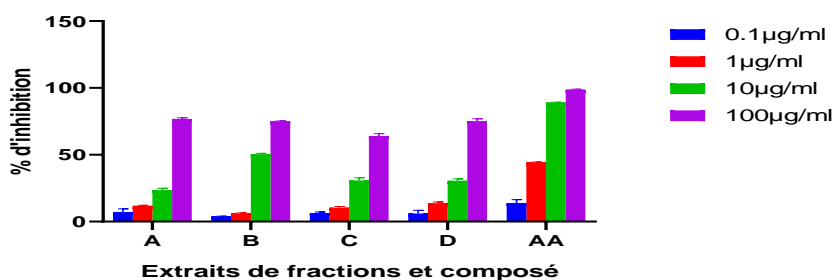


Figure 18 : Activité inhibitrice des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* sur la peroxydation lipidique.

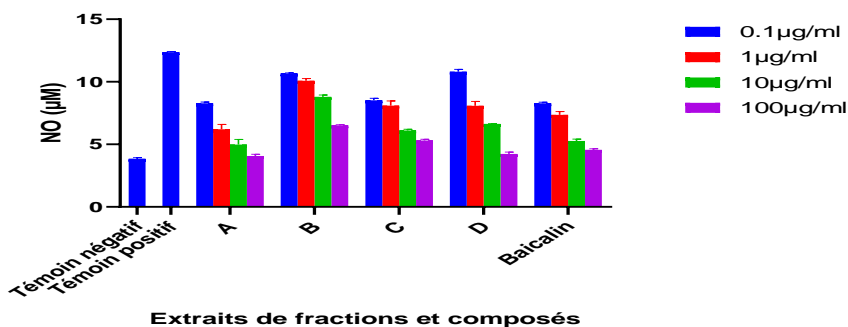


Figure 21 : Activité inhibitrice de la production de NO par les extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii*

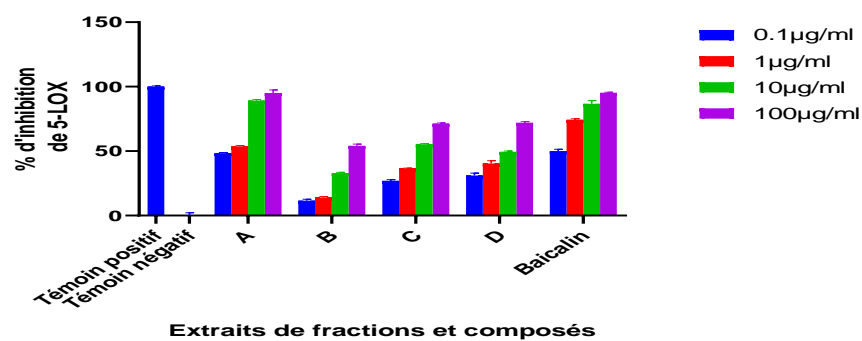


Figure 22 : Effet des extraits de fractions de *Lepidobotrys staudtii* sur l'activité de la 5-lipoxygénase.

Annexe 5 : Clairance éthique

Centre de Recherche et Formation Doctorale, Science de la Vie, Santé et Environnement (CRFD-SVSE)
Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environmental Sciences
University of Yaoundé I (UYI)



Joint Institutional Review Board for Animal & Human Bioethics (JIRB)
Email: jirbsecretariat@gmail.com

30 May 2025

SINGABE BEYALEM

University of Yaoundé 1, Cameroon
Faculty of Science, Department of Biochemistry

Ethical Clearance Reference N°: BTC-JIRB2024-155 (please use this reference number for all correspondences)

Protocol Title : " Evaluation in vitro des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-plasmodiales des fractions d'écorcés de *Lepidobotrys staudtii* "

Investigator(s) Name(s): SINGABE BEYALEM, MSc Student, Doctor KOUOH ELOMBO Ferdinand, Supervisor.

The proposed research protocol and related documents have been reviewed and deliberated by the JIRB of the Centre for Research and Graduate Studies in Life, Health & Environment Sciences (CRFD-SVSE) at the Biotechnology Centre, University of Yaoundé 1, on the 30th May 2025.

The JIRB is satisfied with the current version of the research protocol and supporting documents and agrees that there is no objection on ethical grounds to the proposed study. The JIRB is therefore pleased to approve it on the consideration that the research team will strictly abide by the conditions of the approval below:

- Investigators must strictly follow the plan of the approved protocol. Any changes to the approved protocol will require prior JIRB approval.
- Must be promptly reported to the JIRB: (1) Any deviations from or changes to the protocol that are made to eliminate immediate hazards to the fauna or study participants; (2) All risks that may be rare or remote and especially those that may entail serious consequences or compromise potential benefits or that would affect the conduct of the research.
- Must prepare and submit a standard progress report of the research to the JIRB at completion or one year from the date of issuance of the approval letter and thereafter, on an annual basis.
- Must notify the JIRB when the research is completed. Failure to submit an annual progress report on the study may affect the conditions of approval.

The current ethical clearance is for one-year renewable, on the condition that a progress report is submitted to the JIRB. While the JIRB has given its approval for this study on a satisfactory ethical basis, it is necessary for the investigators to obtain research permit from the Ministry of Scientific Research and Innovation (MINRESI, Cameroon).

Sincerely,

Professor Jude D. Bigoga, M.Sc, Ph.D.
JIRB Chair
Faculty of Science, University of
Yaoundé I, Cameroon



**Professor Frederic Nico Njyou, M.Sc.,
Ph.D.**
Coordinator for Animal Research Bioethics
Faculty of Science, University of Yaoundé
I, Cameroon