

## Evaluation *in vitro* de l'activité antiplasmodiale d'extraits de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle du Niger: *Sebastiania chamaelea* (L.) Müll. Arg., *Euphorbia hirta* L., *Cassia occidentalis* L. et *Cassia nigricans* (Vahl) Greene

### [ *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of plants from traditional pharmacopea of Niger: *Sebastiania chamaelea* (L.) Müll. Arg., *Euphorbia hirta* L., *Cassia occidentalis* L. and *Cassia nigricans* (Vahl) Greene ]

R. Sadou Nassirou<sup>1</sup>, M.-L. Ibrahim<sup>2</sup>, I. Moussa<sup>1</sup>, B. Mahamadou<sup>2</sup>, A. T. Ilagouma<sup>1</sup>, A. Abdoulaye<sup>1</sup>, O. Ouwe Missi Oukem-Boyer<sup>2</sup>, and K. Ikhiri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Université Abdou Moumouni (FAST/UAM), BP 10662 Niamey, Niger

<sup>2</sup>Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES), BP 10887 – 634 Bd de la Nation, YN034 Niamey, Niger

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** Until now, malaria remains a major public health problem in the intertropical zone. The situation is aggravated by the developing resistance of *Plasmodium falciparum* strains against currently used drugs even artemisinin. Antimalarial new drugs are urgently needed. In this study, we have compared the antiplasmodial activity of defatted ethanolic extracts of four medicinal plants from the traditional pharmacopoeia of Niger to the one of *Artemisia annua*. We used the Mark III Test of World Health Organization, over the W2 chloroquine-resistant strain of the parasite. Antiplasmodial activity was discussed over the light of phytochemical profile of the plants, determined by standard methods of chemical screening. *Cassia nigricans*, *Sebastiania chamaelea* and *Euphorbia hirta* exhibited good antiplasmodial activity, with respectively IC<sub>50</sub> of 2,8 µg/ml, 3,3µg/ml and 3,7µg/ml. Their traditional use against malaria is then justified; however, *Cassia occidentalis* exhibited moderate activity with IC<sub>50</sub> of 10,4µg/ml.

**KEYWORDS:** Antimalarial plants, traditional medicine of Niger, *P.falciparum*, *Artemisia annua*

**RESUME:** Le paludisme est un problème majeur de santé publique dans la zone intertropicale. Les souches de *Plasmodium falciparum* deviennent aussi de plus en plus résistantes aux molécules couramment utilisées et même contre l'artémisinine. Il devient urgent de trouver de nouvelles molécules antipaludiques. Nous avons évalué puis comparé l'activité antiplasmodiale des extraits éthanoliques dégraissés de quatre plantes issues de la médecine traditionnelle du Niger à celle d'*Artemisia annua* sur la souche de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistante W2. La méthode utilisée est celle de l'OMS/2001 ou test de Mark III. L'activité antiplasmodiale a été discutée à la lumière du profil phytochimique des différentes plantes, déterminé par les méthodes standards de screening chimique. *Cassia nigricans*, *Sebastiania chamaelea* et *Euphorbia hirta* présentent une bonne activité antiplasmodiale. Leurs IC<sub>50</sub> respectives sont de 2,8µg/ml, 3,3µg/ml et 3,7µg/ml. Cela justifie leur utilisation contre le paludisme en pharmacopée traditionnelle du Niger. Par contre, *Cassia occidentalis* présente une activité modérée avec une IC<sub>50</sub> de 10,4µg/ml.

**MOTS-CLEFS:** Plantes antipaludiques, médecine traditionnelle du Niger, *P. falciparum*, *Artemisia annua*.

## 1 INTRODUCTION

En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a répertorié 207 millions de cas de paludisme à travers le monde, avec environ 627 000 décès, dont 90% en Afrique, la quasi-totalité étant des enfants de moins de cinq ans [1]. Au Niger, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique qui entrave son développement socio-économique. En 2013, 3 364 450 cas de paludisme ont été enregistrés, dont plus de 3 000 décès [2].

L'une des méthodes essentielles de lutte contre le paludisme de l'OMS est la prise en charge médicale. Elle permet une guérison rapide, prévient l'évolution vers les formes graves, les infections placentaires, l'anémie maternelle et réduit la morbi-mortalité palustre.

Toutefois, le nombre limité de molécules antipaludiques et surtout l'émergence de la résistance des souches de *Plasmodium falciparum* à la plupart des antipaludiques couramment utilisés constituent un problème qui entrave la lutte contre le paludisme.

La médecine traditionnelle utilisée depuis des millénaires par les populations se révèle d'une grande utilité pour soigner de nombreuses maladies [3]. A l'heure actuelle, les antipaludiques les plus efficaces que sont la quinine et l'artémisinine proviennent de plantes : *Cinchona sp.* et *Artemisia annua*, issues respectivement de la pharmacopée traditionnelle péruvienne et chinoise et utilisées depuis des siècles pour traiter le paludisme [4]. Par ailleurs, des travaux exécutés dans le laboratoire de Recherche en Chimie des Substances Naturelles de la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Abdou Moumouni ont montré que plusieurs plantes issues de la pharmacopée traditionnelle du Niger contiennent des principes actifs anti-plasmodiques dont l'activité a été prouvée *in vitro* et *in vivo* [5], [6].

Il est capital d'orienter la recherche vers la valorisation des remèdes traditionnels afin de trouver de nouvelles molécules antipaludiques.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les parties aériennes de *Sebastiania chamaelea*, *Euphorbia hirta* et *Cassia occidentalis* ont été récoltées dans le jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Abdou Moumouni de Niamey, entre les mois d'août et de novembre 2011. Les parties aériennes de *Cassia nigricans* ont été récoltées dans la vallée du fleuve Niger à proximité de Niamey.

Les parties aériennes d'*Artemisia annua* ont été récoltées dans la localité de Kollo à une trentaine de kilomètres au Sud de Niamey. Après identification systématique au Département de Biologie et dépôt d'un échantillon à l'herbier de la Faculté, le matériel végétal restant a été séché à l'air libre à l'abri du soleil, puis réduit en poudre.

### 2.2 SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Les grandes familles de métabolites secondaires ont été recherchées dans les plantes suivant les méthodes classiques de caractérisation. Les tanins et polyphénols ont été identifiés par le test au FeCl<sub>3</sub> et le réactif de Stiasny ; les flavonoïdes par la réaction à la cyanidine ; les saponosides par le test de mousse ; les quinones par le test de Borntträger ; les triterpènes et stéroïdes par le test de Liebermann-Burchard et enfin les alcaloïdes par les tests de Mayer et Dragendorf [7], [8].

### 2.3 PRÉPARATION DES EXTRAITS DE PLANTES

50g de poudre de la plante ont été extraits avec 500 ml d'éthanol à 95° durant 24 heures sous agitation. L'opération a été répétée deux fois sur le résidu d'extraction dans 300 ml d'éthanol à 95°. Les filtrats ont été regroupés et évaporés à sec sous vide. L'extrait éthanolique brut sec ainsi obtenu a ensuite été dégraissé deux fois avec un volume suffisant d'hexane et séché à l'air libre. Après pesée et calcul de rendement, les extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### 2.4 TEST D'ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE

La méthode utilisée est celle modifiée du semi-microtest optique décrit par Rieckman *et al.*, en 1978 [9] et adoptée par l'OMS pour la surveillance de l'émergence de la résistance du parasite aux antipaludiques (Mark III Test) [10].

La souche de référence W2 est maintenue en culture continue par la méthode de Trager et Jensen (1976) [11]. Les hématies parasitées sont mises en culture dans un milieu RPMI 1640 contenant 25 mM de tampon Hepes, 4 mM de L-Glutamine, 25 µg/mL de gentamycine et enrichi à 10% de sérum humain AB+ décomplémenté ; elles sont placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C et 80% de taux d'humidité. Le milieu est changé toutes les 24h, l'hématocrite est maintenu à 5% et la parasitémie ajustée à 2% à l'aide d'hématies non parasitées. La culture est synchronisée par une solution de sorbitol à 5% car ce test s'effectue uniquement sur des jeunes trophozoïtes.

Les solutions mères d'extraits sont préparées à la concentration de 2mg/ml dans du milieu RPMI contenant 5% de DMSO. A partir des solutions-mères d'extrait, une dilution en cascade est réalisée (de 200 µg/ml à 0.39µg/ml) puis par puits dans une microplaque de 96 puits à fond plat, avec du milieu RPMI et une suspension globulaire parasitée à 5% d'hématocrite, 2% de parasitémie et synchronisée. Chaque drogue est testée en duplicata. Dans les puits témoins de croissance parasitaire, les 50 µL de drogue sont remplacés par 50 µL de milieu de culture et dans les puits blancs (témoins négatifs ne contenant pas de parasites) par 50 µL du solvant RPMI-DMSO 5%. Les microplaques sont couvertes et placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 72 heures. Des frottis ont été réalisés toutes les 24 heures à partir de chaque puits et les parasitémies déterminées au microscope optique afin d'évaluer le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire =  $[1 - \text{Parasitémie moyenne du duplicata de chaque dilution} / \text{Parasitémie moyenne du duplicata des puits témoins}] * 100$  [12].

Enfin, la concentration inhibitrice 50% (IC<sub>50</sub>) est calculée à partir de l'équation de la courbe obtenue en représentant les pourcentages d'inhibition de croissance parasitaire en fonction des concentrations d'extraits par une régression logarithmique.

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET EXTRACTION

Les plantes étudiées contiennent des tanins, des flavonoïdes, des triterpènes, des stéroïdes, et des quinones. Seuls *Euphorbia hirta*, *Cassia occidentalis* et *Cassia nigricans* contiennent des alcaloïdes. Le tableau 1 indique les métabolites secondaires retrouvés dans les plantes étudiées.

**Tableau 1 : Métabolites secondaires retrouvés dans les plantes étudiées**

Espèce	Tanin	Saponosides	Flavonoïdes	Quinones	Triterpènes et stéroïdes	Alcaloïdes	
						Mayer	Dragendorf
<i>Artemisia annua</i>	+++	+	++	++	++++	-	-
<i>Cassia occidentalis</i>	+	+/-	+++	++	+++	+	+
<i>Cassia nigricans</i>	++	-	+++	++++	++	+	+
<i>Euphorbia hirta</i>	+++	+/-	++	+/-	+++	++	++
<i>Sebastiania chamaelea</i>	++++	-	++	+	+++	-	-

+ à +++: présence à abondance; +/- : Traces; - : absence

Les rendements d'extraction obtenus ont été les suivants :

*Artemisia annua*: 20%; *Cassia nigricans*: 24.6%; *Sebastiania chamaelea*: 24.8%; *Euphorbia hirta*: 9.6%; *Cassia occidentalis*: 9.2%

#### 3.2 ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE

L'activité anti plasmodiale des différents extraits. Les Cl<sub>50</sub> des extraits des différentes plantes à 24h, 48h et 72h est résumée dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Activité antiplasmodiale des extraits de plantes étudiées

IC <sub>50</sub> (µg/ml)	24 heures	48 heures	72 heures
<i>Artemisia annua</i>	0,74	0,32	7,34
<i>Sebastiania chamaelea</i>	3,3	14,8	99,7
<i>Euphorbia hirta</i>	3,7	93,8	351,4
<i>Cassia nigricans</i>	2,8	90,4	52,5
<i>Cassia occidentalis</i>	10,4	1,0	17,0

La variation de l'inhibition de la croissance parasitaire en fonction des concentrations des différents extraits à 24h, 48h et 72h, ayant permis la détermination des IC<sub>50</sub>, est représentée par les courbes des figures 1, 2, 3, 4 et 5.

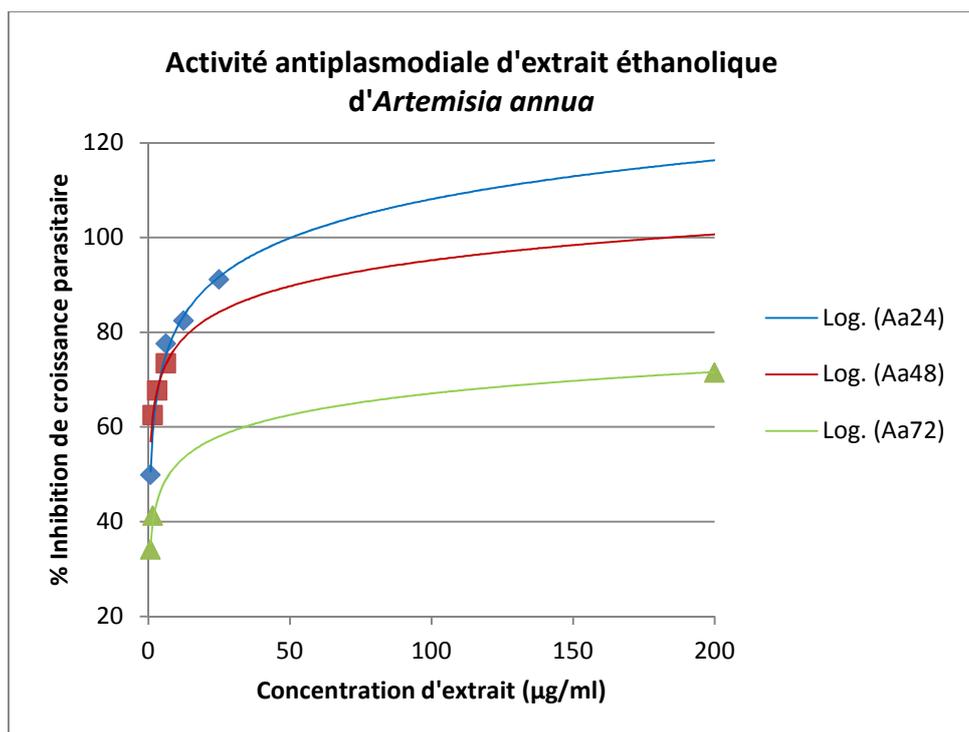


Figure 1: Activité antiplasmodiale d'extrait d'*Artemisia annua*

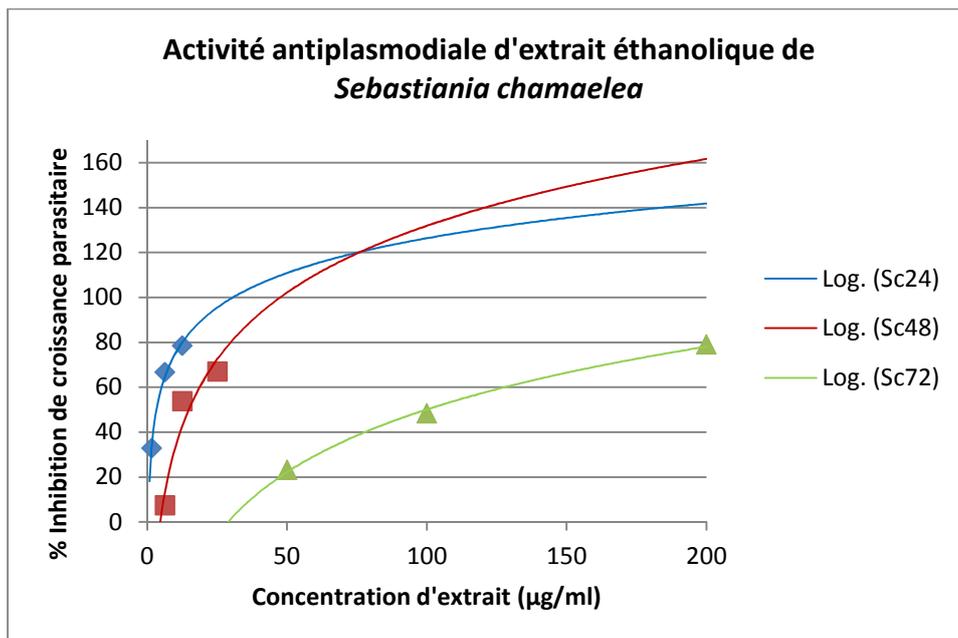


Figure 2: Activité antiplasmodiale d'extrait de *Sebastiania chamaelea*

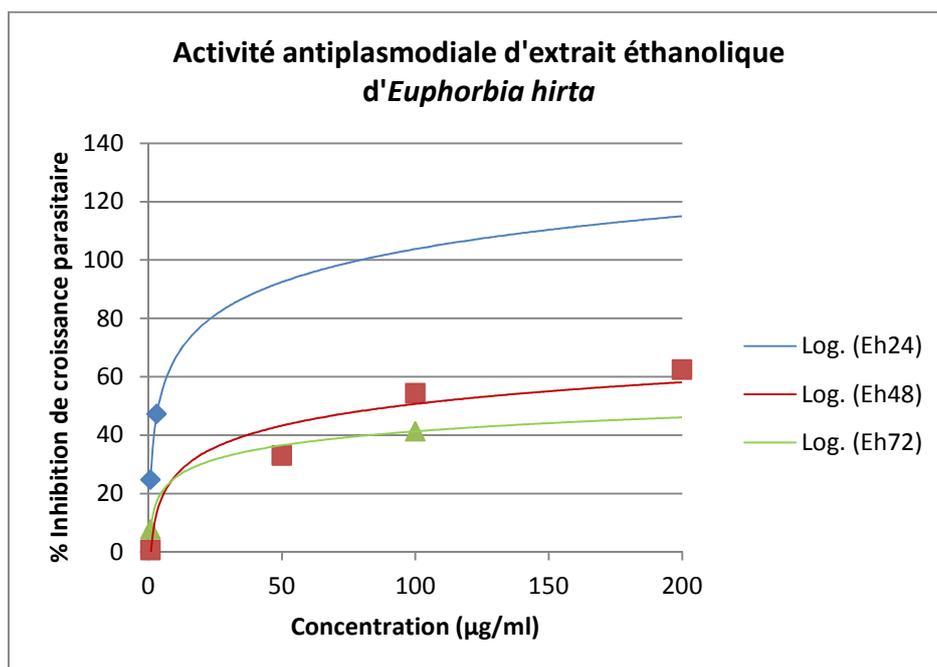


Figure 3: Activité antiplasmodiale d'extrait de *Euphorbia hirta*

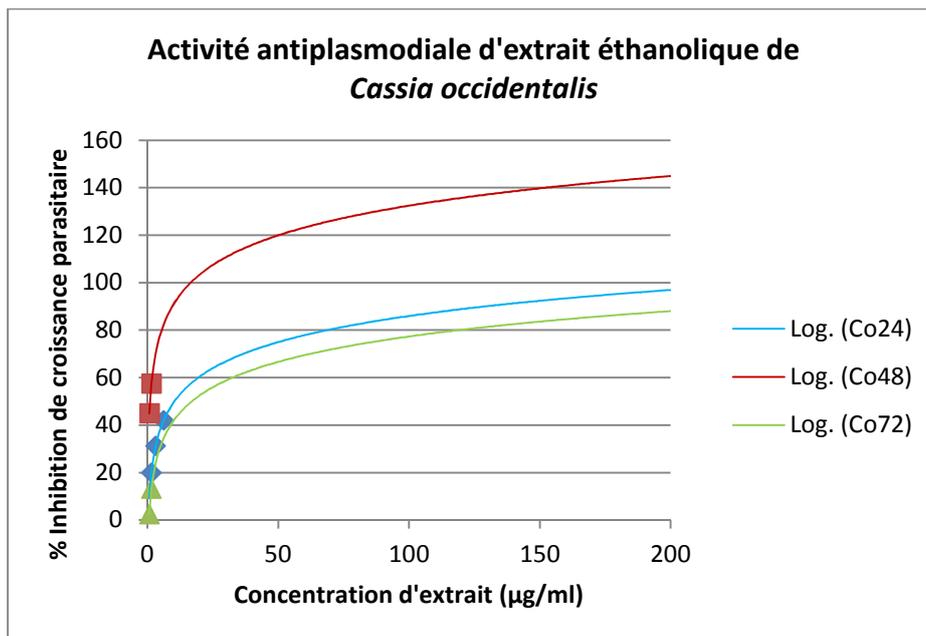


Figure 4: Activité antiplasmodiale d'extrait de *Cassia occidentalis*

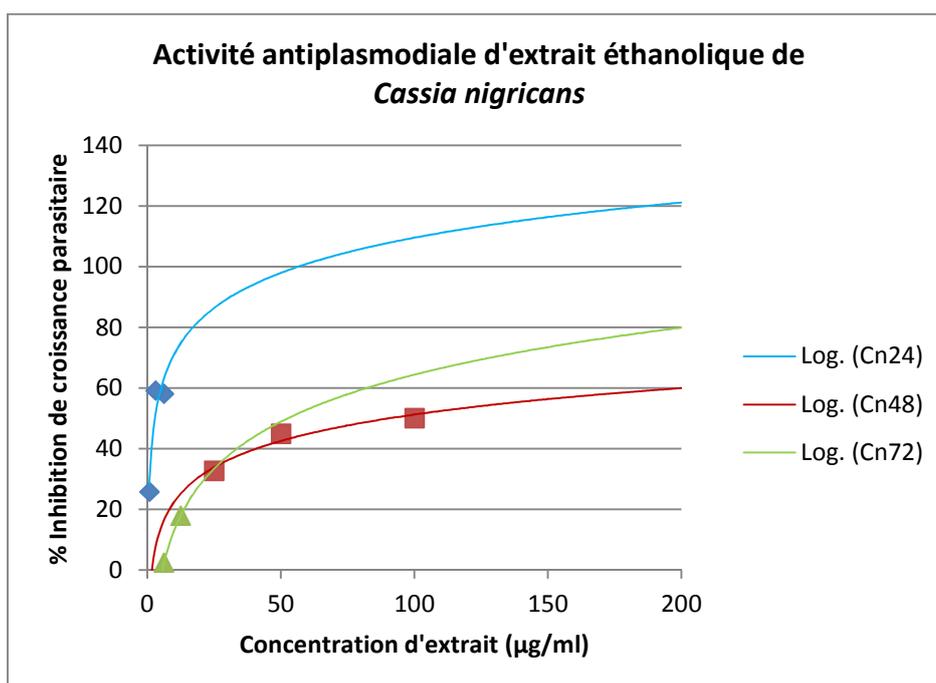


Figure 5: Activité antiplasmodiale d'extrait de *Cassia nigricans*

#### 4 DISCUSSION

L'extrait de la plante de référence, *Artemisia annua*, cultivée et récoltée au Niger, s'est révélé être le plus actif, mais également le plus riche en triterpènes et stéroïdes. Cela se justifie car les principes actifs responsables de l'activité antiplasmodiale de la plante font partie de cette catégorie de métabolites [13], [14]. D'autre part, cet extrait a montré une meilleure activité antiplasmodiale ( $IC_{50} = 0.74\mu\text{g/ml}$ ) que celle trouvée pour la même espèce par Ramazani *et al.* en 2009 [15], ( $IC_{50} = 15.2\mu\text{g/ml}$  sur la souche résistante K1) et Benoît-Vical *et al.*, en 2008 [16] ( $IC_{50} = 1.5\pm 1\mu\text{g/ml}$  sur souche résistante

FcM29). Cependant le type d'extraction (extrait éthanolique brut), la souche de *Plasmodium* utilisée et les méthodes d'analyse (méthode LDH et isotopique respectivement) sont différents. Les quatre plantes étudiées ici *Sebastiania chamaelea*, *Euphorbia hirta*, *Cassia nigricans* et *Cassia occidentalis*, qui ont fait l'objet d'études similaires sont dans le même cas de figure.

D'après l'échelle proposée par Wilcox *et al.*, 2011 [17], après 24 heures d'incubation, les extraits éthanoliques dégraissés de *Cassia nigricans* ( $IC_{50} = 2.8\mu\text{g/ml}$ ), *Sebastiania chamaelea* ( $IC_{50} = 3.3\mu\text{g/ml}$ ) et *Euphorbia hirta* ( $IC_{50} = 3.7\mu\text{g/ml}$ ) ont révélé une bonne activité antiplasmodiale ( $2\mu\text{g/ml} < IC_{50} < 5\mu\text{g/ml}$ ), et une activité modérée pour *Cassia occidentalis* ( $IC_{50} = 10.4\mu\text{g/ml}$ ).

*Cassia nigricans*, la seconde plante la plus active, est riche en quinones. Il a été montré que l'émodine, le principe actif de cette plante, fait partie de cette catégorie [18], [19]. Par contre Obodozie *et al.*, 2004 [18], obtiennent une  $IC_{50} > 125\mu\text{g/ml}$  sur K1 avec l'extrait méthanolique de la plante entière de *Cassia nigricans*. Ainsi, l'extrait éthanolique dégraissé semble concentrer plus d'éléments actifs contre le parasite.

*Sebastiania chamaelea*, est l'espèce la plus riche en tanins et polyphénols. Garcia-Alvarez *et al.*, 2013 [20] ont montré que les éléments actifs de cette plante contre *Plasmodium* sont les acide ellagique et acide gallique. De plus ces auteurs ont obtenu une :  $IC_{50} = 34.5 \pm 6\mu\text{g/ml}$  (FcM29) pour l'extrait méthanolique de *Sebastiania chamaelea* et une  $IC_{50} = 6.6 \pm 1.3\mu\text{g/ml}$  (FcM29)/  $12\mu\text{g/ml}$  (W2) pour l'extrait aqueux de la plante entière. Indépendamment de la méthode utilisée, l'extrait éthanolique dégraissé semble avoir une meilleure activité.

*Euphorbia hirta* est également riche en tanins et polyphénols, en triterpènes, en stéroïdes et contient également des alcaloïdes. Les polyphénols (acide ellagique), les flavonoïdes (quercétine), terpènes et stéroïdes seraient responsables de l'activité antiplasmodiale de la plante [21], [22], [23], [24], [25].

Tona *et al.*, 2004 [25] trouvent une  $IC_{50}$  similaire ( $2.4 \pm 0.2\mu\text{g/ml}$ ) à la nôtre ( $3.7\mu\text{g/ml}$ ), avec l'extrait éthanolique de la plante entière.

Enfin, *Cassia occidentalis* qui a montré l'activité la plus faible des quatre plantes ( $IC_{50} = 10.4\mu\text{g/ml}$ ) est également moins riche en polyphénols, quinones, triterpènes et stéroïdes. Tona *et al.*, 2004 [25] par contre, ont obtenu pour l'extrait éthanolique des feuilles de *Cassia occidentalis* une  $IC_{50} = 2.8 \pm 0.5\mu\text{g/ml}$ ; l'activité serait due selon eux à la présence de certaines molécules du groupe des quinones, des flavonoïdes, des triterpènes et des stéroïdes [21], [23], [26].

Il est apparu dans la plupart des cas lors des expérimentations que l' $IC_{50}$  des extraits augmente avec le temps de contact des parasites avec la drogue. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le développement de mécanismes biochimiques d'adaptation du parasite aux drogues testées [27].

Dans le même temps, nous avons constaté que plus le temps de contact parasite-drogue augmente, moins il y a de formes jeunes du parasite. Cela pourrait s'expliquer de deux manières. Premièrement, il s'agirait de l'action directe de nos drogues, qui agiraient aux stades de multiplication et de ré-invasion du cycle érythrocytaire du parasite [27].

D'un autre côté, la quantité de nutriments disponibles s'amenuisant, certaines plasmodies auraient tendance à évoluer plus vite vers les formes matures (schizontes, gamétocytes) pour survivre.

## 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les extraits de plantes testés ont présenté une activité antiplasmodiale inférieure à celle de la référence *Artemisia annua*. Trois d'entre eux ont montré une bonne activité antiplasmodiale en concordance avec leur profil phytochimique: *Cassia nigricans*, *Sebastiania chamaelea*, *Euphorbia hirta*, ce qui justifie l'utilisation traditionnelle de ces plantes. Par contre, *Cassia occidentalis* présente une activité modérée. Ces différents résultats faciliteraient la poursuite du travail de recherche d'un principe actif à partir des familles chimiques ayant présenté une bonne activité antiplasmodiale. Ainsi, de futurs chefs de file antipaludiques pourraient être dégagés et de futurs médicaments développés.

## REFERENCES

- [1] Organisation Mondiale de la Santé, 2013. 10 Faits sur le paludisme. <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/fr/>
- [2] OCHA Niger : Bulletin Humanitaire Mensuel Numéro 38, Novembre 2013, Niger. Accessed May 3, 2014. <http://www.unocha.org/niger/niger-bulletin-humanitaire-mensuel-num%C3%A9ro-38-novembre-2013-0>.

- [3] Sofowora Abayomi, 1996 : Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. *Karthala Paris, France, 2ème éd., 384p.*
- [4] Wright, C.W., 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology 100: 67–71.*
- [5] Abdoulaye A., Moussa I., Ousmane A., Ikhiri K., 2009. Rapport d'Activité de Recherche sur les Plantes Antipaludiques du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, *Département de Chimie/FAST/UAM Niger.*
- [6] Benoit-Vical, F., Grellier, P., Abdoulaye, A., Moussa, I., Ousmane, A., Berry, A., Ikhiri, K., Poupat, C., 2006. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of *Momordica balsamina* alone or in a traditional mixture. *Chemotherapy 52: 288–292.*
- [7] Bruneton J. 1999. Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales. Technique & documentation-Lavoisier 1120 p.
- [8] Evans WC. 2002. Pharmacognosy. *Saunders Elsevier 585p.*
- [9] Rieckmann, K.H., Sax, L.J., Campbell, G.H., Mrema, J.E., 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *The Lancet 1: 22-23.*
- [10] WHO 2001. *In vitro* Micro-test (Mark III) for the assesment of the response of Plasmodium falciparum to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin *CTD/MAL/97.20 Rev. 2, 21p.*
- [11] Trager W., Jensen J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science 193: 673-675.*
- [12] Fidock DA., Rosenthal PJ, Croft SL., Brun R., Nwaka S., 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening *Antimalarial efficacy screening: in vitro and in vivo protocols, supplemental file. Nature Reviews Drug Discovery 3: 509-520.*
- [13] Camacho Corona, M.del R., Croft, S.L., and Phillipson, J.D., 2000. Natural products as sources of antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Anti-Infect. Invest. Drugs, 2, 47–62.*
- [14] Wright, C.W. 2002. Antiprotozoal natural products. In *Pharmacognosy*, 15th ed., Evans, W.C., Ed. Harcourt, London, pp. 407–413.
- [15] Ramazani A., Sardari S., Zakeri S., Vaziri B., 2009. *In vitro* antiplasmodial and phytochemical study of five Artemisia species from Iran and *in vivo* activity of two species. *Parasitol Res 107:593–599.*
- [16] Benoit-Vical,F.,Soh,P.N.,Salery,M.,Harguem,L.,Poupat,C.,Nongonierma,R.,2008. Evaluation of Senegalese plants used in malaria treatment: focus on *Chrozophora senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology 116: 43–48.*
- [17] Willcox M, Benoit-Vical F, Fowler D, et al. 2011. Do ethnobotanical and laboratory data predict clinical safety and efficacy of anti-malarial plants? *Malaria J (Suppl 1):S7.*
- [18] Obodozie OO, Okpako LC, Tarfa FD, Orisadipe AT, Okogun JI, Inyang US, Ajaiyeoba EO, Wright CW (2004). Antiplasmodial principles from *Cassia nigricans*. *Pharmaceut. Biol., 42(8): 626-628.*
- [19] Ayo RG., 2010. Phytochemical constituents and bioactivities of the extracts of *Cassia nigricans* Vahl: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(14), pp. 1339-1348.
- [20] Garcia-Alvarez MC, Moussa I, Njomnang Soh P, Nongonierma R, Abdoulaye A, Nicolau-Travers ML, Fabre A, Wdzieczak-Bakala J, Ahond A, Poupat C, Ikhiri K, Benoit-Vical F. 2013. Both plants *Sebastiania chamaelea* from Niger and *Chrozophora senegalensis* from Senegal used in African traditional medicine in malaria treatment share a same active principle. *Journal of Ethnopharmacology*149: 676–684.
- [21] Cimanga, K., 1997. The biologically active constituents of two African medicinal plants: *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter (Periplocaceae) and *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redhead (Rubiaceae). *PhD Thesis. University of Antwerp, Belgium. pp. 255–370.*
- [22] Banzouzi, J.T., Prado, R., Mena, H., Valentin, A., Roumetan, C., Mallie M., Pelissier, Y., Blache, Y., 2002. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *Journal of Ethnopharmacology 81, 399–401.*
- [23] Phillipson, J.D., Wright, C.W., 1991. Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica 57, S53–S59.*
- [24] Kraft, C., Jennett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Mavi, S., Bienzle,U., Eich, E., 2003. *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research 17, 123–128.*
- [25] Tona, L., Cimanga, R.K., Mesia, K., Musuamba, C.T., De Bruyne, T., Apers, S., Hernans, N., Van Miert, S., Pieters, L., Totté, J., Vlietinck, A.J., 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology 93: 27–32.*
- [26] Christensen, S.B., Kharazmi, A., 2001. Antimalarial natural products.Isolation, characterisation and biological properties. In: Tringali, C. (Ed.), *Bioactive Compounds from Natural Sources*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 379–432.
- [27] Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Kone-Bamba, D., Kone, M., Mallie, M., Yapo, A., Bastide, J.M., 1996. *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 54: 67–71.*