

Etude comparative in vitro des effets anti paludiques des extraits totaux d'*Hygrophilla Auriculata* avec les antipaludiques modernes : Quinine et L Artem forte

BWAMI MUSOMBWA Mwaty¹, BYUMANINE NTABAZA J. Roger², KWIBE MAYUNGA Daniel³, AKSANTI LWANGO⁴, SADIKI MUKOBELWA⁵, NEEMA BORA⁶, CIKURU MUSHAMALIRWA Blaise⁷, MBILIZI YVES SANTOS⁸, SHANGO SHUNGU FRANCK⁹, BILUGA MAGAMBI MOISE¹⁰, and KAISHUSHA MBONY Danie¹¹

¹Assistant 2^e mandant, USK/BUKAVU et Chef de Bureau ISTM/BUKAVU, RD Congo

²Assistant 2^e mandant, ISTCE/BUKAVU et ISTM/SHABUNDA, RD Congo

³Assistant 2^e mandant, ISTM/UVIRA et UPGL/UVIRA, RD Congo

⁴Assistant 1^e mandant, ISTM/BUKAVU, RD Congo

⁵Assistant 1^e mandant, ISTCE/BUKAVU et USK/BUKAVU, RD Congo

⁶Assistante 1^e mandant, ISTM/BUKAVU, RD Congo

⁷Assistant 2^e mandant, ISTCE/BUKAVU, RD Congo

⁸Assistant 2^e mandant, ISTCE/BUKAVU, RD Congo

⁹Assistant 2^e mandant, ISTCE/BUKAVU, RD Congo

¹⁰Assistant 2^e mandant, ISTCE/BUKAVU, RD Congo

¹¹Professeur Docteur à l'UCB/BUKAVU, RD Congo

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: This scientific article had as objective to compare the antipaludic activities and efficiency of *Hygrophilla auriculata* plant than those of antipaludic modern drugs.

The method consisted to mixture samples of strongly infested blood with *Hygrophilla auriculata* extracts in some samples and modern anti-malaric dugs in others. After incubation of 24h, 48h and 72h we passed to the parasitologic test.

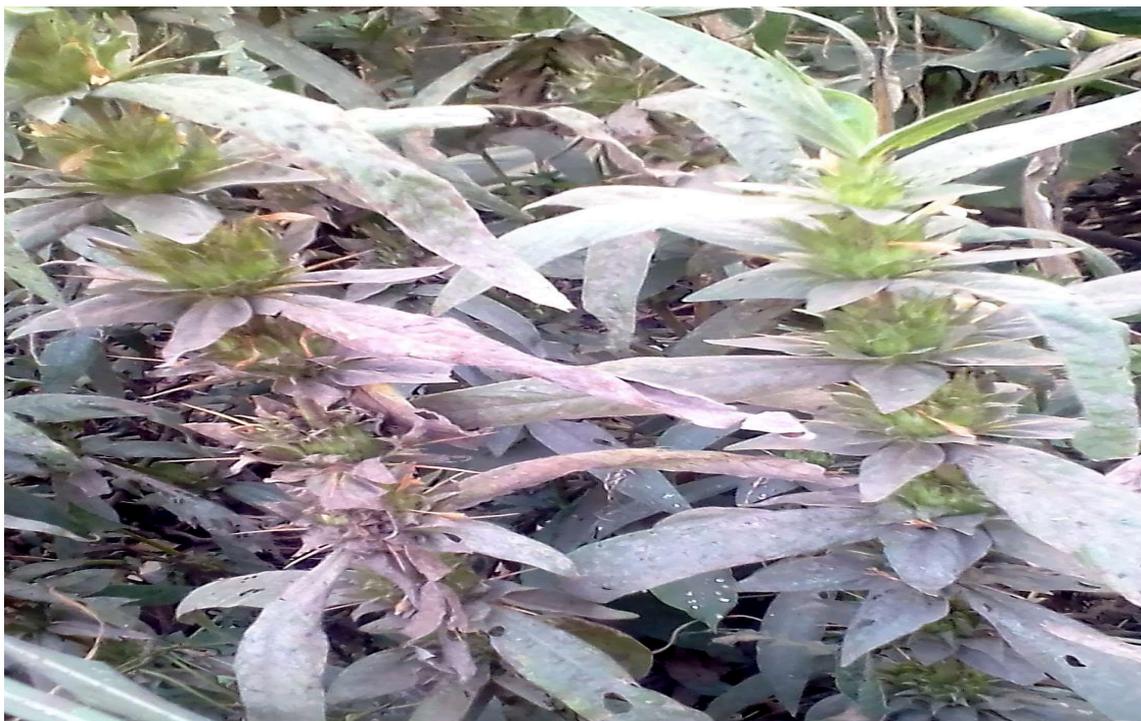
Obtained result revealed the high efficiency and antimalaric activities of *Hygrophilla auriculata* crudes extracts than modern anti-malaric drugs such as Quinine and "L-Artem Forte". This leded us to conclude that *Hygrophilla auriculata* plant has a high antipaludic activity so it must be used to treat people great leak region.

KEYWORDS: *hygrophilla auriculata*, anti-malaric effect, cruds extracts, antipaludic drugs.

RESUME: Ce travail scientifique intitulé « étude comparative in vitro des effets antipaludiques des extraits totaux d'*Hygrophilla auriculata* avec des antipaludiques modernes : Quinine et L-artem Forte, avait comme objectif d'étudier l'efficacité et l'effet antipaludique des extraits totaux de la plante *Hygrophilla auriculata*. La procédure consistant à l'analyse parasitologique d'un échantillon de sang fortement impaludé, puis le mélanger avec quelques ml des extraits totaux de la plante *Hygrophilla auriculata* et d'autres échantillons avec quelques ml de Quinine et L-artem forte et procéder par une incubation de : 24h ; 48h et 72h.

Les résultats obtenus ont montré une très grande activité antipaludique des extraits aqueux et éthanoliques de la plante *Hygrophilla auriculata* à toutes les doses, plus que les médicaments antipaludiques modernes après 72h d'incubation. Ce qui nous a poussé à conclure que la plante *Hygrophilla auriculata* du littorale du lac Kivu inspire une grande activité antipaludique qui peut être exploitée à la longue pour secourir les nombreuses victimes du paludisme grave au Sud de tropiques.

MOTS-CLEFS: *Hygrophilla auriculata*, activité antipaludique, extraits totaux, médicaments antipaludiques modernes.



Hygrophilla Auriculata = Buganga bukali

1 INTRODUCTION

1.1 PROBLEMATIQUE

Le concept des plantes antipaludiques n'est pas nouveau dans le monde des plantes médicinales. Plusieurs plantes se sont révélées efficaces contre diverses maladies en général et contre le paludisme en particulier.

Il apparaît alors que l'avenir de nombreux produits chimio thérapeutiques repose sur les plantes. C'est dans ce contexte que la plante *Hygrophilla auriculata* s'est révélée très efficace contre des nombreuses maladies.

En effet, une revue « journal of Pharmacognosy and Phytochemistry de calcuta en Inde » a montré que les organes d'*Hygrophilla auriculata* à savoir : les racines, la tige, les feuilles, les fleurs et les fruits sont efficaces dans le traitement de nombreuses maladies telles que les inflammations, l'algie, les infections bactériennes, les helminthiases, le diabète, la fièvre, les néphropathies ; les hépatopathies diverses et les tumeurs malignes (SUDESHNA et Santanu Paul, 2017).

L'augmentation de l'arsenal thérapeutique contre le paludisme par la plante *Hygrophilla auriculata* apparaît une nécessité en médecine moderne. Car découvrir des nouveaux produits contre le paludisme serait un soulagement des populations du monde entier. Depuis les années 1960, il ya eu apparition des souches de parasites ne réagissant plus aux médicaments conventionnels comme la chloroquine. Plusieurs études montrent la résistance de la malaria aux antipaludéens de synthèse en Afrique Centrale et occidentale (BAGALWA, BASHWIRA et BYAMUNGU, 2007). L'agent vecteur de cette parasitose est le moustique anophèle femelle qui est aussi contaminée par piqûre d'une personne impaludée au repos et devient vectrice des hématozoaires du paludisme connus sous l'appellation de plasmodium.



Fig. 1. *Anophèles gambiae*, vecteur du paludisme se nourrissant sur sa victime

Source : ASSOGBA CODJO M., 2006

Selon les statistiques mondiales du paludisme, l'OMS recense 207 millions de cas de paludisme dans le monde et 627000 de décès pour la plupart des enfants africains en 2015. (BENJAMIN OLOMO, 2016).

Selon les dernières estimations de l'OMS publiées en 2017, il a été constaté 216 millions de cas de paludisme et 445.000 décès dus au paludisme au niveau mondial, avec 90% de cas en Afrique. (World Malaria report, 2017). Un enfant de moins de 5 ans meurt du paludisme toutes les deux minutes en Afrique et 99% de ce cas sont causés par le plasmodium falciparum.

En RDC, la transmission du paludisme est quasi-pérenne. 97% de la population vivent dans les régions où la transmission est permanente (PNLP, 2015). Le paludisme y constitue la première cause de morbidité et de mortalité chez les enfants de 0 à 5 ans, les femmes enceintes, les PVV et les voyageurs non immunisés (APP, 2017).

Malgré les mesures de lutte contre le paludisme : distribution gratuite des moustiquaires imprégnés d'insecticides, utilisation des médicaments modernes (A.C.T. ; Quinine...) lors des prises en charge dans les formations sanitaires, le paludisme persiste et la résistance aux antipaludéens est un problème récurrent. L'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle en RD Congo constitue une voie de recherche intéressante.

Les extraits totaux d'*Hygrophilla auriculata* avaient démontré des effets antidotes (CIMANUKA et MANO 2014). Une étude ethno pharmacologique faite par BALAGIZI Innocent auprès des populations du Bushi au Sud-Kivu, à l'Est de la RDC a trouvé que plante *Hygrophilla auriculata* soigne la malaria, l'hépatite, le prolapsus utérin, les migraines, les empoisonnements. Le présent article scientifique intitulé « **ETUDE COMPARATIVE IN VITRO DES EFFETS ANTIPALUDIQUES DES EXTRAITS TOTAUX d'*Hygrophilla Auriculata* AVEC LES ANTIPALUDIQUES MODERNES : Quinine et L-Artem Forte** » a été conçu dans le domaine de la phytochimie pharmacologique pour apporter notre contribution à la découverte des nouveaux produits naturels contre le paludisme.

Eu égard à ce qui précèdent, nous nous posons la question suivante : Quel serait le degré d'efficacité des extraits totaux de la plante *hygrophila auriculata* sur le paludisme par rapport à la Quinine et L-Artem forte, les deux antipaludéens modernes les plus courants à l'Est de la RDC ?

1.2 HYPOTHESE

Les extraits aqueux et éthanoliques de la plante *hygrophila auriculata* traiteraient plus efficacement la malaria grave que les médicaments modernes ; quinine et L-Artem forte ?

1.3 OBJECTIFS

Pour justifier notre hypothèse, nous nous sommes assigné l'objectif suivant : comparer les effets antipaludiques et l'efficacité des extraits de la plante *hygrophila auriculata* avec les médicaments antipaludiques modernes par des examens parasitologiques des échantillons du sang fortement impaludé auxquels nous avons ajouté des extraits aqueux et éthanoliques de la plante *hygrophila auriculata* d'une part et des solutions éthanoliques de médicaments antipaludiques modernes : Quine et L-Artem forte.

Ainsi contribuer à la lutte contre le paludisme par des produits naturels de notre région et inciter les populations à la protection de la nature précurseur des médicaments naturels.

1.4 INTERET DU SUJET

C'est dans le but de contribuer à l'augmentation de l'arsenal médical dans la lutte contre le paludisme que notre choix a porté sur *hygrophila auriculata*.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 MATÉRIELS

- Des tubes à hémolyse ;
- Des pipettes pasteurs en plastiques ;
- Des tubes à essai ;
- Des gants en plastique lis ;
- L'incubateur ;

- Lames portes -objets
- Solution de May Grunwald ;
- Solution de Giemsa-filte ;
- Ethanol à 95°
- Microscope binoculaire ;
- Test de dépistage rapide (TDR).
- Un pilon
- Un mortier

2.1.1 PRÉPARATION DES EXTRAITS

Les échantillons de *hygrophilla auriculata* ont été récoltés à Bukavu, le long du lac Kivu Est de la RD Congo pendant le mois de Février 2018. Ils ont été séchés à l'ombre et pilés dans un mortier pour obtenir une poudre fine. Des extraits de la plante ont été préparés suivant les méthodes classiques par macération, technique la plus fréquemment utilisée par les tradipraticiens.

A cet effet, 20 g de poudre ont été macérés dans 200 ml d'éthanol 70% et après évaporation à sec, on a obtenu un résidu.

La même procédure a été adoptée pour un extrait aqueux.

2.1.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Du sang fortement impaludé identifié par un Test de dépistage rapide et une G.E (goutte épaisse) ;
- Peser 1g de Quinine et le dissoudre dans 100ml d'Ethanol 70% ;
- Peser 1g de L-Artem Forte et le dissoudre dans 100ml d'Ethanol 70% ;
- Prélever 100ml de chaque extrait de la plante *hygrophilla auriculata* dans 2 tubes à essai différents ;
- Evaporer tout le solvant dans les extraits de la plante *hygrophilla auriculata* et reprendre la solution à l'aide de l'hexane pour éliminer toute la chlorophylle.

2.2 METHODES

Le test a utilisé deux méthodes dont la méthode de test de dépistage rapide (TDR) et la méthode de la goutte épaisse.

2.2.1 TEST DE DÉPISTAGE RAPIDE (TDR)

- Recueillir l'échantillon de transfert dans une micropipette fournie ;
- Ajouter 5 µl de sang dans le puits « S »
- Ajouter 2 gouttes (60 µl) de solution de tampon dans le puits « A ». démarrer la minuterie ;
- Lire le résultat après 20 minutes ;
- Si la bande de contrôle « C » n'apparaît pas dans la fenêtre des résultats, alors ce résultat est invalide. Il faut reprendre le test.
- La présence d'une ligne à côté de « C » indique un résultat négatif ;
- La présence de 2 lignes (une ligne dans l'écran à côté de « C » et une autre ligne dans l'écran à côté de « T ») indique un résultat positif.

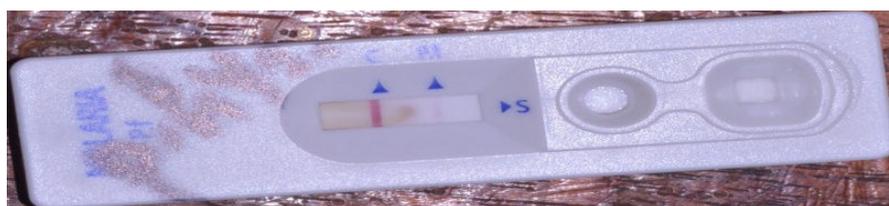


Fig. 2. Lame de TDR

Source : Expérience faite par nous au Laboratoire d'analyses médicales de l'ISTM-Bukavu en mai 2018

2.2.2 TEST DE LA GOUTTE ÉPAISSE (GE)

2.2.2.1 CALCUL DE LA DENSITÉ PARASITAIRE (DP)

La détermination de la densité parasitaire peut être requise pour des enquêtes transversales des recherches épidémiologiques ou des études spéciales comme l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des médicaments antipaludiques. Il faudra pour cela deux compteurs manuels (un pour le parasite et l'autre pour les leucocytes).

La méthode consiste à :

- Dénombrer les parasites observés avec l'un des compteurs et les leucocytes avec l'autre champ après champ à l'objectif à immersion ;
- Le nombre des parasites et des leucocytes que vous allez compter dépend de leurs fréquences et du temps de votre disposition pour faire la numération. Plus le nombre de parasites recensés est faible plus il faut compter un grand nombre de leucocytes. Une fois le comptage est terminé, on calcule le nombre relatif de parasites par rapport au nombre de leucocytes et on exprime le résultat en « parasites par microlitre de sang » à partir d'une simple formule mathématique.
- Si la DP est la densité parasitaire on a :

$$DP = \frac{\text{Nombre de parasites comptés} \times 8000}{\text{Nombre de leucocytes comptés}}$$

Dans ce système on a :

+ = 1 à 10 parasites pour 100 champs de la goutte épaisse à l'objectif à immersion.

++ = 11 à 100 parasites pour 100 champs de la goutte épaisse à l'objectif à immersion.

+++ = 1 à 10 parasites par champ de la goutte épaisse à l'objectif à immersion.

++++ = Plus de 10 parasite par champ de la goutte épaisse à l'objectif à immersion (JOHN STOREY, 1991 in OMS, 2014).

8000 = Nombre moyen de leucocytes pour une personne normale recommandé par l'OMS.

2.2.2.2 CONFECTION DE LA GOUTTE ÉPAISSE

1^{ère} expérimentation :

- Calculer d'abord la charge parasitaire ;
- A l'aide d'une pipette pasteur en plastique, prélever 4 ml du sang fortement impaludé dans 4 tubes à essai différents ;
- Ajouter dans 1 tube à essai, 4 ml d'extrait aqueux de la plante *hygrophila auriculata* dans le 1^{er} tube, 4 ml d'extrait éthanolique dans le 2^e tube, 4 ml d'une solution de sulfate de quinine dans le 3^{ème} tube et 4 ml d'une solution de L- Artem forte dans le 4^e tube à essai.
- Incuber pendant 72 heures à l'étuve à 37°C ;
- Procéder au dépouillement en faisant un examen microscopique : TDR et G.E : examen parasitologique.

2^{ème} expérimentation :

- Calculer d'abord la charge parasitaire de l'échantillon ;
- Prélever 3 ml du sang fortement impaludé dans 4 tubes à essai ;
- Ajouter dans un tube, 1 ml d'extraits aqueux de la plante ; 1 ml d'extrait éthanolique dans le 2^e tube, 1 ml de la solution de quinine dans le 3^e tube et 1 ml de la solution de L-artem forte dans le 4^e tube ;
- Incuber pendant 24h ; 48h et 72 heures puis procéder au dépouillement par TDR et G.E

3 RESULTATS ET DISCUSSION

L'activité antipaludique des extraits aqueux et organiques de *Hygrophilla auriculata* in vitro est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Résultats après incubation de 24 heures

		Charge parasitaire (Tr/Ch)	Extraits de H. Auriculata		Antipaludiques modernes	
			HA _q	HE _t	Quinine	L-Atem forte
1 ^{ère} Expérience	TDR	+	+	+	+	+
	G.E	4080	2450	2860	3220	3460
2 ^e Expérience	TDR	+	+	+	+	+
	G.E	14600	8600	8800	12500	13640

Tableau 2. Résultats après incubation de 48 heures

		Charge parasitaire (Tr/Ch)	Extraits de H. Auriculata		Antipaludiques modernes	
			HA _q	HE _t	Quinine	L-Atem forte
1 ^{ère} Expérience	TDR	+	+	+	+	+
	G.E	4080	1420	1480	1640	1670
2 ^e Expérience	TDR	+	+	+	+	+
	G.E	14600	4200	4600	6200	6400

Tableau 3. Résultats après incubation de 72 heures

		Charge parasitaire (Tr/Ch)	Extraits de H. Auriculata		Antipaludiques modernes	
			HA _q	HE _t	Quinine	L-Atem forte
1 ^{ère} Expérience	TDR	+	—	—	—	—
	G.E	4080	—	—	—	—
2 ^e Expérience	TDR	+	—	—	+	+
	G.E	14600	—	—	< 2500	3640
Réduction de la charge parasitaire en %			100	100	100	100
			100	100	83	75

Source : Tableau fait par nous sur base des expériences effectuées Laboratoire d'analyses médicales de l'ISTM-Bukavu en mai 2018

Où : — = Test négatif

+ = Test Positif

HA_q = Extrait aqueux de *Hygrophylla auriculata*

HE_t = Extrait éthanolique de *Hygrophylla auriculata*

4/4 : 4ml de médicament dans 4ml de sang fortement impaludé

¼ : 1ml de médicament dans 4ml de sang fortement impaludé

Pour les expériences du tableau N°3 :

Le test antipaludique réalisé au laboratoire d'analyses médicales de l'ISTM/Bukavu a montré que :

Lors de la 1^{ère} expérience avec une charge parasitaire initiale de 4080Tr/Ch, la plante H. Auriculata s'est révélée avec une activité antipaludique très grande et cela au même titre que les antipaludiques modernes : Quinine et L-auteur forte puis dans les mêmes conditions c'est-à-dire à doses égales et à volumes égaux de sang. La charge parasitaire a été anéantie, c'est-à-dire réduite à 100%.

Le Test de réaction rapide montre une absence de *P. falciparum* à tous les niveaux. Ces mêmes résultats ont été révélés par la goutte épaisse.

La 2^{ème} expérience avait révélé une charge parasitaire de 14600 Tr/Ch. Après réduction de la dose au quart des médicaments le TDR a révélé la présence des parasites de *P. falciparum* dans les tubes à essai où il y avait de la quinine et de la L-Artem forte. Le même test n'a révélé aucun parasite de *P. falciparum* dans le tube à essai où il y avait des extraits aqueux et éthanoliques de la plante H. Auriculata.

La G.E a confirmé ces résultats en révélant une diminution de la charge parasitaire de *P. falciparum* dans le tube à essai où il y avait la quinine. Elle a passé de 14600 à moins de 2500 soit une diminution d'environ 82%.

Par ailleurs, la L-auteur forte a réduit la charge parasitaire à peu près 75%.

Les extraits de la plante H. Auriculata ont réduit la charge parasitaire à 100% quelle que soit la dose.

Cette réduction est au même degré pour chaque extrait. Le TDR n'a révélé aucune présence des parasites de *P. falciparum* malgré la réduction de la dose c'est-à-dire tous les tests étaient négatifs.

4 CONCLUSION

Le présent article scientifique avait comme objet, une étude comparative de l'effet antipaludique des extraits de *H. Auriculata* à ceux des antipaludiques modernes (Quinine et L-auteur forte).

A l'issu des expériences effectuées au laboratoire de l'ISTM/BUKAVU, nous avons aboutit aux conclusions suivantes :

1. L'activité antipaludique de *Hygrophilla auriculata* est de loin supérieure à celle des antipaludiques modernes (Quinine et L-auteur forte) à toutes les doses appliquées.
2. La réduction de la charge parasitaire du *P. falciparum* est fonction à la fois de la durée d'incubation et de la dose pour les produits modernes utilisés.

Ainsi, cette plante se révèle efficace sur les souches du plasmodium *falciparum* même à des doses faibles d'où son effet antipaludique est supérieur à celui des médicaments antipaludiques modernes.

L'activité thérapeutique des antipaludiques dans les populations autochtones ne peut être directement extrapolée des résultats *in vitro* compte tenu des phénomènes immunitaires surajoutés. Néanmoins, ces résultats incitent à poursuivre les études sur la sensibilité du plasmodium aux antipaludiques dans les pays de forte endémie.

Cependant, la pharmacovigilance et l'étude *in vitro* de l'efficacité de cette plante serait nécessaire pour attirer l'attention des populations, la toxicité de la plante *Hygrophilla auriculata* d'une part et d'autre part compléter les informations des chercheurs d'autres part en vue d'une continuité dans la découverte des nouveaux produits moins onéreux contre le paludisme.

REFERENCES

- [1] BALAGIZI K. et al., (1999), Etude de l'efficacité de la tisane des feuilles d'*Artemisia annua* dans le traitement du paludisme au Sud-Kivu (Est de la RDC, Recherches Africaines A, 3,1-6.
- [2] SUDESHNA SAHA et Santsanu Paul (2017) ; Potential of *H. Auriculata* (Schumach). Heine as a source of future – cancer drugs. A comprehension review.
- [3] BYUMANINE Roger ans als (2017) ; contribution à l'étude de la Relation-Structure extrait aqueux et organiques de *spilantes mauritian*.
- [4] OMS (2006) ; Rapport annuel du paludisme, PNUD /R.D. Congo.
- [5] OMS (2010) : World malaria Rapport, PNUD/R.D.C.
- [6] CIMANUKA J. & MANO I (2014); Evaluation de l'activité antidote des extraits d'*Hygrophilla auriculata*, *Microglosa pyrifolia* et *senecio cidomifolium*, plante médicinal du Bushi (Inédit, ISP/BKV).
- [7] BALAGIZI K. & MULLER M. (2007), plantes médicinales du Bushi, Ed. Genès-Italie.
- [8] CHIZA J. Baptista (2014), Evaluation de la prise en charge du paludisme chez les adultes dans la zone urbaine de Kadutu, C.S. FUNU-1/01 – 31/01/2014. Inédit ISTCE /BKV – Uvira.
- [9] Andrew CHEVALIER (2001) ; Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse Bordas.
- [10] LAURENCE M. & SOMOGYI A. (2002), Pharmacologie thérapeutique, Ed.
- [11] Michel Fedérich (2017), les plantes tropicales, sources potentielles des médicaments antipaludiques, CIRM, Paris.
- [12] BENJAMIN OLLOMO, (2013), Un nouvel éclairage sur l'origine du paludisme *P. vivax* chez l'homme CNRS-IRD.
- [13] BAGALWA M. et al., (2007), Evolution *in vitro* de l'activité antimalarique des extraits glycosidiques de *K. crenata* (crassulaceae) sur les plasmodium *falciparum*, pp98-103.
- [14] HARMANDEZ H. (1990), Effect of aqueous extract of *artemisia* on the *in vitro* culture of *P. falciparum*, *Fitoterapia*, 61,65 pp.