

Etude micrographique et évaluation de l'activité antiplasmodiale in vivo du fruit de *Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H. Durand (Apocynaceae).

AKOUBET Ouayogodé Aminata^{1*}, KOUAKOU Landry², KABLAN Ahmont Landry Claude³, ADIKO N'dri Marcelline¹, DJADJI Ayoman Thierry², KOUAKOU Siransy-Gisèle², KONÉ-BAMBA Diéneba¹, CHAMPY Pierre⁴.

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, Botanique, Biologie végétale et Cryptogamie, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 714 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

² Laboratoire de Pharmacologie, pharmacie clinique et thérapeutique, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 714 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

³ Département de Mathématiques, Physique, Chimie, UFR des Sciences Biologiques, Université Peleforo Gon Coulibaly, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire.

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Pharmacognosie, Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

Date de réception : 01 Octobre 2021 ; Date de révision : 25 Octobre 2021 ; Date d'acceptation : 03 Novembre 2021

Résumé:

Le paludisme est endémique en Côte d'Ivoire, où la majeure partie de la population a recours à des médications traditionnelles. *Picralima nitida* (Stapf) T.Durand & H. Durand (Apocynaceae), arbre des forêts d'Afrique tropicale, est une plante utilisée classiquement en médecine traditionnelle comme antipaludique. Malgré les nombreux travaux réalisés, aucune étude micrographique, ni évaluation in vivo de l'activité antiplasmodiale n'a été réalisée à partir de la pulpe de fruit de cette espèce végétale. L'objectif de ce travail était de réaliser l'étude micrographique du fruit et de son extrait et d'évaluer l'activité antiplasmodiale in vivo sur *Plasmodium berghei*. Pour l'étude micrographique, des coupes anatomo-histologiques du fruit ont été réalisées. Des éléments caractéristiques ont pu être identifiés, tel que des fragments de parenchyme, de sclérenchyme ainsi que des poils sécréteurs et des vaisseaux de bois. L'évaluation de l'activité antiplasmodiale in vivo a été effectuée grâce au test de Riley. A partir du 4^{ème} jour de traitement, l'élimination du parasite était plus importante avec l'extrait de péricarpe dosé à 10 mg/kg/jour (60,7 à 95,4 %) comparativement à celle de la pulpe dosée à 2mg/kg/jour (29,4 à 48,2 %) et le péricarpe dosé à 2mg/kg/jour (9,6 à 30,4 %). La cinétique de neutralisation du parasite du 4^{ème} jour à la fin du traitement de l'extrait de péricarpe dosé à 10 mg/kg/jour était similaire aux substances de références utilisées à hauteur de 98,9 à 100 % pour la chloroquine et 81 à 100 % pour l'artéméthér 12mg/kg/jour. Les résultats obtenus justifieraient son utilisation comme antipaludique en médecine traditionnelle.

Mots clés: *Picralima nitida*, fruit, micrographie, antiplasmodiale, in vivo.

Micrographic study and evaluation of the antiplasmodial activity in vivo of the fruit of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand (Apocynaceae).

Abstract :

Malaria is endemic in Côte d'Ivoire, where most of the population uses traditional medications. *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand (Apocynaceae), tree from tropical African forests, is a plant classically used in traditional medicine as an antimalarial. Despite the extensive work carried out, no micrographic study or in vivo evaluation of antiplasmodial activity has been carried out using the fruit pulp of this plant species. The objective of this work was to carry out the micrographic study of the fruit and its extract, and to evaluate the antiplasmodial activity in vivo on *Plasmodium berghei*. For the micrographic study, anatomo-histological sections of the fruit were made. Characteristic elements could be identified such as fragments of parenchyma, sclerenchyma as well as secretory hairs and wooden vessels. The evaluation of antiplasmodial activity in vivo was performed using the Riley's test. From the 4th day of treatment, the elimination of the parasite was greater with the pericarp extract dosed at 10 mg / kg / day (60,7 to 95,4%) compared to the pulp extract dosed at 2 mg / kg / day (29,4 to 48,2%) and the pericarp dosed at 2 mg / kg / day (9,6 to 30,4%). The kinetics of neutralization of the parasite from the 4th day at the end of the treatment of the pericarp extract dosed at 10 mg / kg / day was similar to the reference substances used at 98,9 to 100% for chloroquine and 81 to 100% for artemether 12mg / kg / day. The results obtained would justify its use as an antimalarial in traditional medicine.

Key words: *Picralima nitida*, fruit, micrography, antimalarial, in vivo.

Introduction

La médecine traditionnelle est une option de soins de santé cruciale pour les populations pauvres du tiers monde. Elle soulage 70 à 90 % de la population d'Afrique (WHO, 2012). Le coût très souvent élevé de la médecine moderne, associé à l'augmentation des résistances aux antipaludiques usuels (Noedl, 2018 ; SPILF, 2017), a suscité un regain d'intérêt pour la médecine

traditionnelle africaine (Kaboré et al., 1997 ; Guillemot et al., 2004). Ainsi, il est nécessaire de rechercher de nouvelles substances bioactives issues de la pharmacopée traditionnelle, des agents anti-infectieux efficaces et accessibles aux populations à faible revenu, d'où l'étude de *Picralima nitida*, espèce végétale communément utilisée en Côte d'Ivoire pour traiter le diabète.

(*) Correspondance : Akoubet O. A. ; e-mail : akoubetaminata@yahoo.fr ; tél. : (+225) 0749776350.

Très souvent employée comme fébrifuge et remède contre le paludisme, sa réputation d'antimalarique est attestée de manière ancienne (années 1910-1920) (Hamet, 1951). Les organes les plus utilisés sont les graines, puis l'écorce de tige et les racines. La pulpe de fruit n'est que peu citée. En Côte d'Ivoire, au Bénin et au Nigeria, les décoctions s'utilisent contre la jaunisse, la rougeole, par voie orale ou en lotion. Les graines sont utilisées pour traiter la hernie, sous forme broyées avec du jus de citron, par voie orale. Le broyat s'applique également sur les abcès (Louppe et al., 2008). *Picralima nitida* contient des alcaloïdes indolomonoterpéniques qui sont caractéristiques des Gentianales (familles des Rubiaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Gelsemiaceae). Ils sont présents dans une partie des Apocynaceae (sous-famille des Rauvolfioideae) (Nazar et al., 2013) et sont tous issus du même précurseur, la strictosidine, qui donne naissance à plus de 3000 dérivés (Fox et al., 2019). Ces molécules présentent des activités pharmacologiques majeures, qui justifient l'utilisation de nombreuses plantes en médecine traditionnelle, ainsi que des emplois anciens ou actuels en biomédecine occidentale de molécules isolées (ajmalicine (raubasine), réserpine,

strychnine, « vinca-alcaloïdes », vincamine, yohimbine...) (Fox et al., 2019).

Plusieurs molécules ont été isolées de *Picralima nitida*. Il s'agit essentiellement d'alcaloïdes et de polyphénols. Les molécules ayant montré une activité antiplasmodiale notable étaient des alcaloïdes indolomonoterpéniques (Kapadia et al., 1993). Des tests d'activité antiplasmodiale réalisés in vitro sur des extraits totaux (Kapadia et al., 1993) ou encore sur des molécules isolées (Okundji et al., 2015) confirment le potentiel antiplasmodial de la plante. Des résultats très encourageants ont été obtenus in vivo sur les graines (Okokon et al., 2007) (Idowu et al., 2015) ; cependant aucune étude micrographique, ni évaluation in vivo de l'activité antiplasmodiale n'a été réalisée sur la pulpe du fruit. Une préparation traditionnelle antipaludique originale a été mentionnée au cours de notre enquête au marché d'Adjamé (Abidjan) (Akoubet O.A., 2021) : elle exploite la pulpe de son fruit, par macération. La présente étude vise à identifier les éléments micrographiques, données nécessaires à la caractérisation de l'extrait traditionnel, et à évaluer l'activité antiplasmodiale in vivo de l'extrait de pulpe et de péricarpe du fruit.

Matériels et Méthodes

Le travail présenté a été réalisé aux laboratoires de Pharmacognosie (pour l'étude micrographique) et de Pharmacologie (pour l'évaluation de l'activité antiplasmodiale in vivo), de la faculté de

1. Matériel

1.1 Matériel végétal:

Le matériel végétal était constitué de fruits de *Picralima nitida* (Stapf) Th. et H. Durand (Apocynaceae) provenant de Côte d'Ivoire (Figure1). La partie du fruit utilisée pour l'obtention de la recette traditionnelle était la

pharmacie de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan), en collaboration avec l'Institut Pasteur d'Abidjan.

pulpe. Les fruits ont été récoltés à Adiopodoumé (sud de la Côte d'Ivoire). Les échantillons (fruits frais) n'ont pas été déposés en herbier. Des échantillons de graines ont été conservés au laboratoire, avec les références : AA_PN_codes des lots correspondants.



Figure 1 : Planche d'herbier de *P. nitida* et fruit mûr frais.

1.2 Matériel animal:

Les animaux (mâle ou femelle) utilisés étaient des souris Swiss albinos, pesant 25 ± 2 g.

1.3 Matériel de micrographie:

Un Microscope optique de marque Optika Italy version like 2.1 surmonté d'une caméra de marque Optika Italy version 1 a été utilisé. Une solution de KOH a permis l'observation des éléments entre lame et lamelle.

1.4 Solvants et réactifs pour la réalisation des tests d'activité antiplasmodiale:

- Eau distillée
- Méthanol (Merk, Allemagne)
- Solution saline normale (NaCl 0,9 %, PHARMIVOIRE, Côte d'Ivoire)
- Solution Giemsa action Rapide pour Frottis (RAL Diagnostic, France)
- Artémether 80 mg injectable (Artem* Kunming Pharmaceuticals Corp. PR, China)
- Chloroquine phosphate 250 mg comprimé, Astral Pharmaceutical, Inde).

2. Méthodes

2.1 Diagnose du fruit et de l'extrait aqueux de *Picralima nitida* (Stapf) Th. et H. Durand (Apocynaceae):

Des coupes anatomo-histologiques de la pulpe du fruit, du péricarpe et des graines ont été réalisées, afin d'en identifier les éléments caractéristiques, dans un but de contrôle des recettes dérivant du fruit. La recette traditionnelle reproduite était un extrait aqueux obtenu par macération à froid de la pulpe du fruit, puis lyophilisé. Les coupes ainsi que le lyophilisat ont été observés entre lame et lamelle au microscope.

2.2 Etude microscopique:

Les méthodes microscopiques ont été déterminées selon la méthode décrite par la Pharmacopée Européenne 10^e édition (Pharmacopée européenne, 2021). Il s'agit de prélever une petite quantité de lyophilisat avec le bout pointu d'une pince au préalable mouillée de solution hydratée et mélanger à une goutte de KOH (5 %) entre lame et lamelle, et de monter les coupes anatomo-histologiques de pulpe, péricarpe du fruit et graines. Les préparations sont observées grâce au microscope optique. La caméra a servi à capturer les images des éléments microscopiques et cristaux caractéristiques du fruit, aux grossissements 100 et 400.

- Echantillons testés:

Pour la macération traditionnelle de pulpe de *P. nitida*, nous avons estimé à 325 mL au plus le volume administré (2 fois par jour) pour le traitement du paludisme, généralement pendant 5

jours. Un extrait de pulpe du fruit mûr de *P. nitida* (Lot 9) réalisé par macération à froid (extrait L9-AF) est employé. La lyophilisation de ce volume de l'extrait a conduit à l'obtention de 6,8945 g de résidus, soit 0,0212 g par mL d'extrait natif (non filtré). Pour un adulte de 70 kg, la dose usuelle en équivalent lyophilisat est de 0,198 mg/kg/jour. Pour l'administration aux animaux, l'extrait sec est dilué dans l'eau, à 0,03 mg/mL. L'administration est réalisée une fois par jour, par gavage. L'extrait de péricarpe de *P. nitida* du même lot de fruits (Lot 9 ; extrait L9-EC) est étudié à la même dose et à une dose 5 fois supérieure.

2.3 Test d'activité antiplasmodiale in vivo:

- Principe :

La méthode réalisée a été celle décrite par Peters (Peters et al, 1975) avec quelques modifications. Les souris ont été infectées par injection intrapéritonéale de 100µl de 1×10^7 érythrocytes parasités. Les animaux dont la parasitémie avoisinait 2 à 4% ont été réparties en 6 groupes homogènes de 6 rats suivi de l'administration des différents extraits à l'étude pendant 6 jours.

Le calcul de la réduction de la parasitémie après traitement a été possible grâce à la formule ci-dessous :

$$\text{Inhibition de la parasitémie} = \frac{\% PT. (NaCl) - \% P.}{\% PT. (NaCl)} \times 100,$$

avec, P: parasitémie ;

PT: parasitémie Temoin.

- Mode opératoire :

Pour l'expérimentation 36 souris ont été réparties en 4 groupes de 6 souris qui ont reçu les différentes solutions à raison de 0,1 ml pour 10g de pc comme suit :

Groupe 1 : Témoin négatif constitué d'animaux qui ont reçu par gavage une solution saline (NaCl 0,9 %) ;

Groupe 2 : Témoin positif 1 constitué d'animaux qui ont reçu par gavage une solution de chloroquine à 10mg/kg pc ;

Groupe 3 : Témoin positif 2 constitué d'animaux qui ont reçu par voie IP une solution d'artémether à 12 mg/kg pc ;

Groupe 4 : Essai 1 constitué d'animaux qui ont reçu par gavage l'extrait de la pulpe du fruit mûr de *P. nitida* (L9-AF, 2 mg/kg) ;

Groupe 5 : Essai 2 constitué d'animaux qui ont reçu par gavage l'extrait de péricarpe de *P. nitida* (L9-EC, 2 mg/kg) ;

Groupe 6 : Essai 3 constitué d'animaux qui ont reçu par gavage l'extrait de péricarpe de *P. nitida* (L9-EC, 10 mg/kg).

Tous les lots de souris ont été traités une fois par jour, pendant 5 jours successifs (J1-J5). La parasitémie est évaluée au microscope optique au grossissement Gx100 chaque jour pendant 6 jours successifs en réalisant un frottis sanguin fin fixé au méthanol et coloré au giemsa à 10%.

2.4 Considérations éthiques:

Les procédures expérimentales ont été menées selon les directives éthiques du Comité des ressources animales de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire) du 28 juin 2013. Toutes ces procédures utilisées étaient en accord strict avec les directives pour les soins et

l'utilisation des animaux de laboratoire et les statuts de l'Union Européenne concernant la manipulation des animaux de laboratoire (86/609/CEE) (Louhimies, 2002).

2.5 Analyse statistique:

les données ont été analysées avec le logiciel Graph Pad Prism (version 7.0). La comparaison des différents pourcentages de parasitémie a été possible grâce au test ANOVA (analyse de variance non paramétrique) et à la comparaison multiple de Dunnett's au risque α égal à 5 %. La codification pour une différence statistiquement significative a été la suivante : * : $p < 0,05$: différence significative ; ** : $p < 0,01$: différence très significative.

Résultats et Discussion

1. Diagnose du fruit:

1.1 Au plan macroscopique:

Le fruit est constitué d'une partie externe (épicarpe) et d'une partie interne charnue, la pulpe (mésocarpe). Il contient de nombreuses graines aplaties (Figure 2).

1.2 Au plan microscopique:

On retrouve dans l'épicarpe un épiderme constitué de cellules polyédriques et de nombreux poils sécréteurs, suggérant la production et l'excrétion de substances par la plante (Figure 3).

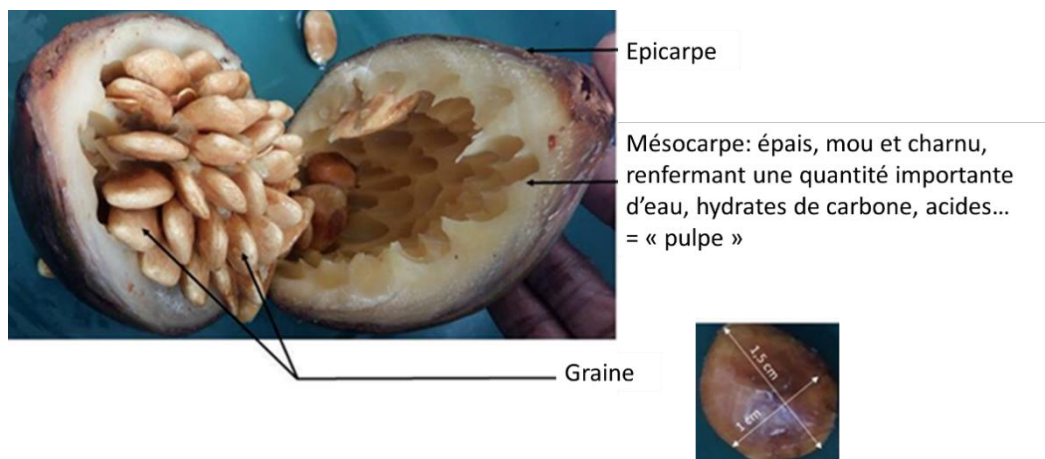


Figure 2 : Section longitudinale de fruit mûr de *P. nitida* ; en bas : graine.

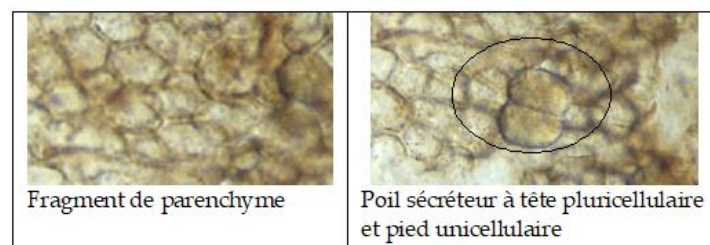


Figure 3 : Coupe transversale de l'épicarpe du fruit : fragment d'épicarpe (Gx 40).

Le mésocarpe quant à lui est constitué de parenchyme, contenant de nombreuses poches sécrétrices et lacunes, et de sclérenchyme, constitué de cellules scléreuses plus ou moins

allongées (Figure 4). On y retrouve également des paquets de fibres sclérifiées, des vaisseaux de bois spiralés, ainsi que des cristaux d'oxalate de calcium.

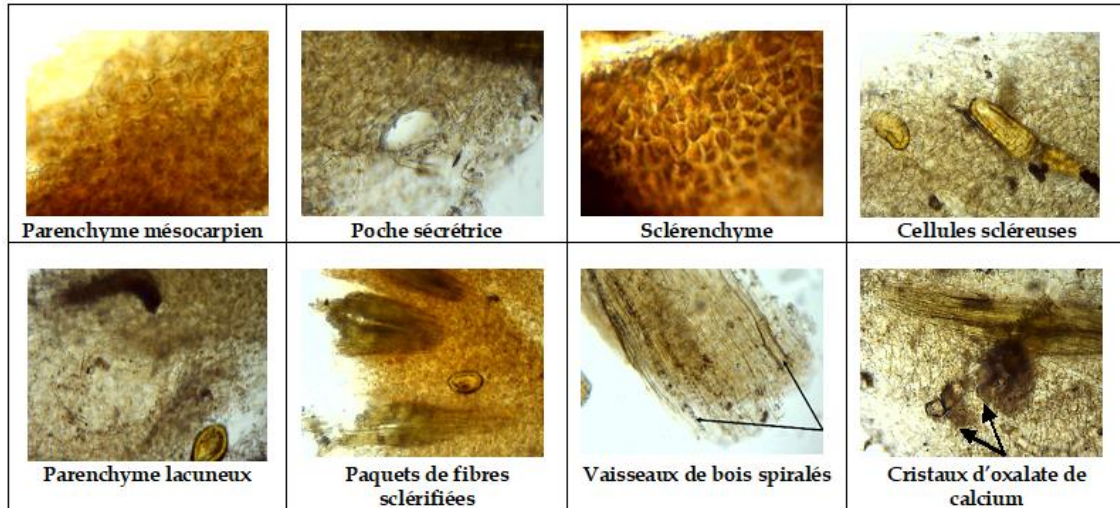


Figure 4 : Coupe transversale du mésocarpe du fruit (Gx 40).

La coupe transversale de la graine montre la présence, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une cuticule épaisse suivie de l'hypoderme constitué

de cellules parenchymateuses formant des méats et d'un albumen central aux cellules allongées (Figure 5).

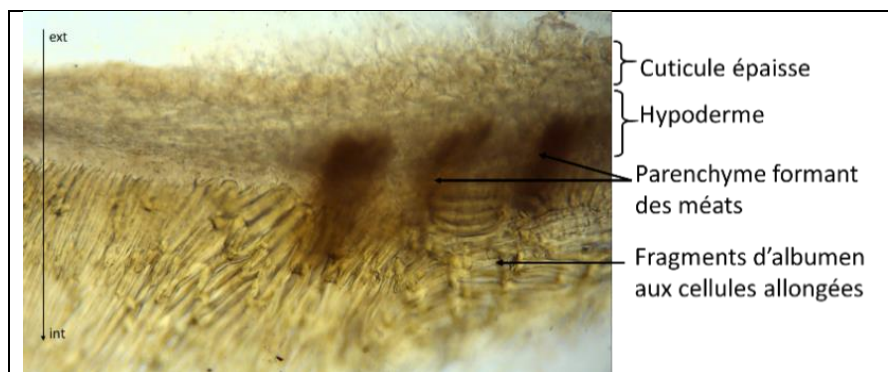


Figure 5 : Coupe transversale de la graine (Gx40).

L'équipe de Osuala au Nigeria a également retrouvé des cellules parenchymateuses dans l'étude microscopique de poudre de graines ; ils ont également rapporté la présence de cellules scléreuses et de cristaux d'oxalate de calcium (Osuala et al., 2018).

L'analyse de l'extrait aqueux de fruit a permis de retrouver les éléments caractéristiques de la pulpe identifiés dans les coupes transversales, à savoir des paquets de fibres sclérifiées, des têtes de poils sécrétant des gouttelettes de liquide, des fragments de parenchyme, d'épicarpe et de mésocarpe, des cristaux d'oxalate de calcium et des vaisseaux de bois spiralés (éléments du hile de la pulpe). On retrouve également des gouttelettes d'huile disséminées dans le champ (Figure 6).

2. *Activité antiplasmodiale in vivo:*

L'administration des extraits au bout de 6 jours a effectivement réduit la parasitémie des animaux infectés par le *Plasmodium berghei* avec un effet significativement prononcé avec l'extrait de péricarpe dosé à 10 mg/kg/jour comparativement au témoin.

A partir du 4^{ème} jour de traitement l'élimination du parasite était plus importante avec l'extrait de péricarpe dosé à 10 mg/kg/jour (60,7 à 95,4 %) comparativement à la pulpe dosée à 2mg/kg/jour (29,4 à 48,2 %) et le péricarpe dosé à 2mg/kg/jour (9,6 à 30,4 %).

La cinétique de neutralisation du parasite du 4^{ème} jour à la fin du traitement de l'extrait de péricarpe dosé à 10 mg/kg/jour (60,7 à 95,4 %) était similaire aux substances de références utilisées à hauteur de 98,9 à 100% pour la chloroquine et 81 à 100% pour l'artéméther 12mg/kg/jour.

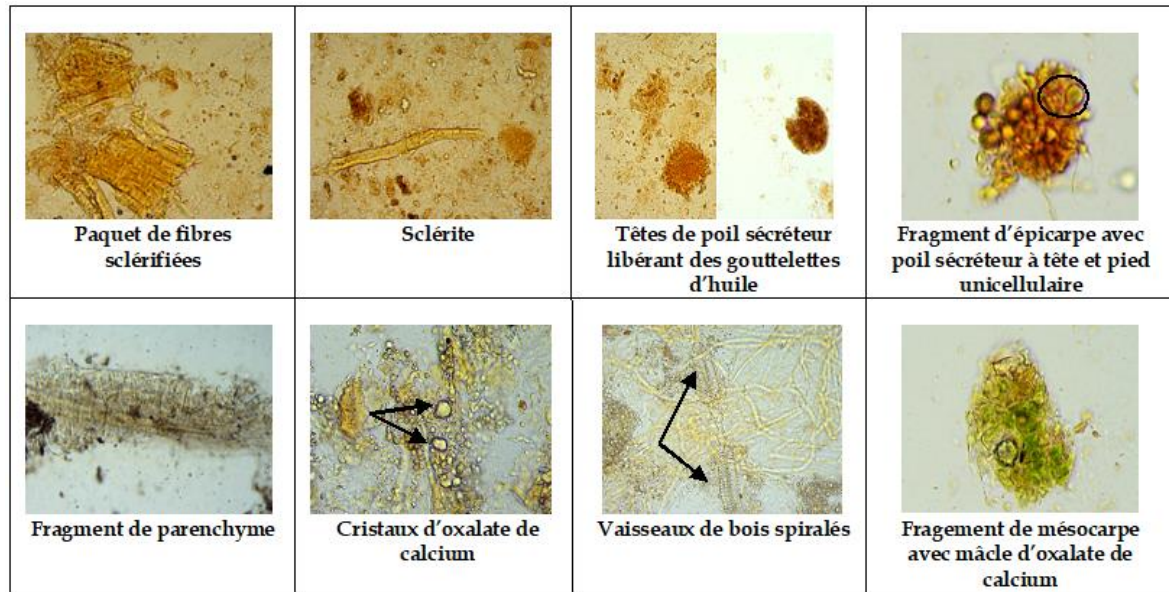


Figure 6 : Analyse microscopique de l'extrait aqueux du fruit (Gx 40).

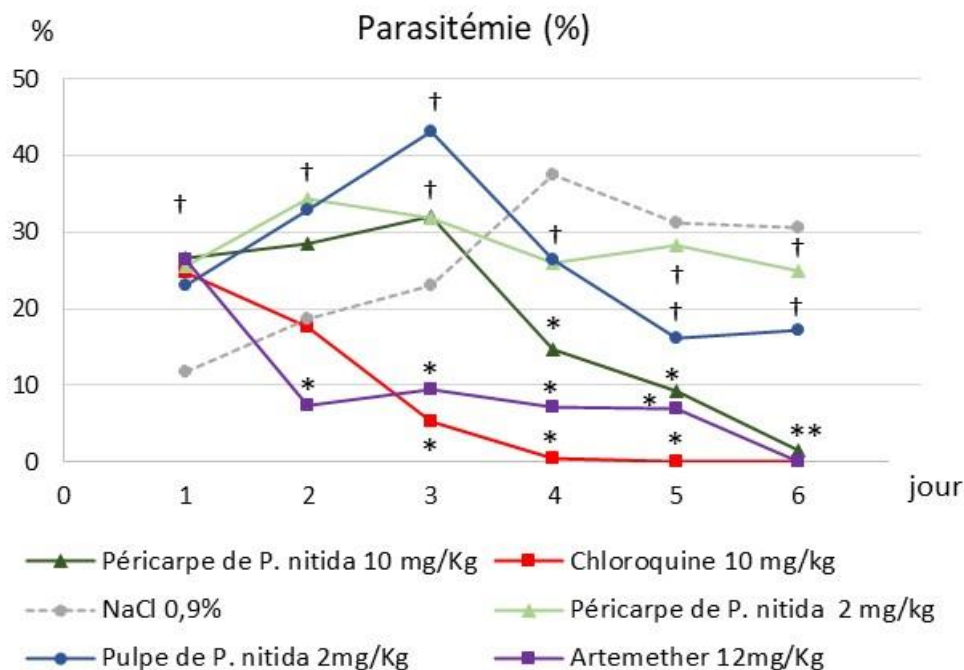


Figure 7 : Evaluation pilote in vivo d'extraits de pulpe et de péricarpe de *P. nitida* chez la Souris infectée par *P. berghei*.

Nos résultats (Tableau 1) sont semblables à ceux obtenus par l'équipe de Idowu qui ont montré dans leurs travaux portant sur l'activité antiplasmodiale in vivo et impacts toxiques de l'extrait de chaux d'une combinaison de *Picalima nitida*, *Alstonia boonei* et *Gongronema*, une inhibition du *Plasmodium berghei* avoisinant 80,97

%, 83,84 % et 86,16 % respectivement aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg (Idowu, 2015). Ces mêmes pourcentages d'inhibition du parasite ont été obtenu dans notre étude à une dose faible soit 20 à 80 fois plus bas avec l'extrait de péricarpe sans combinaison à 10 mg/kg/jour (60,7 à 95,4 %).

Tableau 1 : Réduction de la parasitémie par les extraits de pulpe et de péricarpe de *P. nitida* chez la souris infectée par *P. berghei* : parasitémie (%).

Jour	Molécules de référence		Extraits (codes) de <i>P. nitida</i>			NaCl (0,9 %)
	Chloroquine 10 mg/kg	Artemether 12 mg/kg	Pulpe (L9-AF) 2 mg/kg	Péricarpe (L9-EC) 2 mg/kg	Péricarpe (L9-EC) 10 mg/kg	
J1	1,13 %	0,56 %	0,98 %	1,19 %	1,29 %	11,6 %
J2	5,9 %	60,7 %	0,77 %	0,84 %	0,52 %	18,6 %
J3	77,3 %	59,1 %	0,87 %	0,38 %	0,39 %	23,0 %
J4	98,9 %	81,0 %	29,4 %	30,4 %	60,7 %	37,4 %
J5	100 %	100 %	48,2 %	9,6 %	70,6 %	31,3 %
J6	100 %	100 %	43,8 %	18,3 %	95,4 %	30,6 %

Quant aux investigations de Okokon, le même effet suppressif du parasite a été observé à 70,4% cette fois ci avec les graines de l'extrait éthanolique de *Picralima nitida* à 70mg/kg/jour (Okokon, 2007).

Concernant le survi des animaux, 14 jours après l'arrêt du traitement avec l'extrait de péricarpe à 10 mg/kg/jour, aucun décès n'a été observé avec les animaux. A l'opposé deux souris sont mortes dans chaque lot qui recevaient les extraits de la pulpe et du péricarpe à 2mg/kg/jour au 6ème

jour de traitement. La dose faible de 2mg/kg/jour utilisée ne pouvant pas s'opposer à la recrudescence de la parasitémie chez ces animaux pourrait expliquer ce constat observé.

Ces différents résultats montrent clairement que *Picralima nitida* est doué d'un potentiel antiplasmodiale et l'extrait du péricarpe de cette plante efficace aux faibles doses est prometteur comme candidat phytomédicament pour lutter contre le paludisme.

Conclusion

Bien connue en médecine traditionnelle d'Afrique occidentale, *Picralima nitida* est souvent décrite pour son utilisation dans la prise en charge du diabète. L'espèce est également citée, comme de nombreuses autres Apocynaceae, en thérapeutique antipaludique. Les écorces de tiges ou de tronc, les racines et les graines sont les organes les plus utilisés et aussi les plus étudiés. Concernant la pulpe du fruit, elle n'a été que très peu étudiée. L'analyse microscopique de la pulpe montre bien la présence des éléments caractéristiques identifiés dans la coupe transversale du fruit et son extrait aqueux possède une bonne activité antiplasmodiale. Cette plante pourrait donc être un bon candidat pour le

développement de Médicament Traditionnel Amélioré (MTA) pour le traitement du paludisme.

Conflit d'intérêt

Nous déclarons que ce travail ne fait l'objet d'aucun conflit d'intérêt.

Remerciement

Nous tenons à remercier l'Université Paris-Saclay grâce à laquelle nous avons pu bénéficier d'une formation sur la micrographie des différents organes de plantes, le PASRES qui a bien voulu nous accompagner dans le projet d'investigations des plantes et recettes à base de plantes, en vue de garantir la sécurité alimentaire des populations, et enfin les tradipraticiens, très impliqués lors de nos enquêtes ethnobotaniques.

Références

Akoua-Koffi C., Guessennd N., Gbonon V., Faye-Kette A.Y.H., Dosso M., 2004. Methicillin resistant of *Staphylococcus aureus* in Abidjan (1998-2001): A new hospital problem. *Médecines et Maladies Infectieuses*. 34 : 132-136.

Akoubet O.A., 2021. Etude ethnobotanique, chimique et activités pharmacologiques de plantes et recettes antimalariques de Côte d'Ivoire. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Université Paris-saclay, 233p.

Fox Ramos A.E., Le Pogam P., Charlotte Alcover C., Otogo N'Nang E., Cauchie G., Hazni H., et al., 2019. Collected tandem mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. *Scientific Data*, 6(1),15. DOI: 10.1038/s41597-019-0028-3.

Guillemot D., Maugendre P., Vhauvin S.T.C., 2004. Consommation des antibiotiques en France. *BEH*. 3233: 141-147.

- Hamet R., 1951.** Sur une drogue remarquable de l'Afrique tropicale, le "*Picralima nitida*" (Stapf) Th. et H. Durand. *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale*. 31(347-348), 465-485.
- Idowu E.T., Ajaegbu H.C.N, Omotayo A.I, Aina O., Otubanjo O.A., 2015.** In vivo anti-plasmodial activities and toxic impacts of lime extract of a combination of *Picralima nitida*, *Alstonia boonei* and *Gongronema latifolium* in mice infected with Chloroquine-sensitive *Plasmodium berghei*. *African Health Sciences*. 15(4), December 2015.
- Kaboré Z.I., Millogo/Koné, 1997.** Étude antibactérienne in vitro d'extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) vis-à-vis de *Escherichia coli* Entéropathogène, Sérotype 0127, *Revue Pharmacopée et Médecine Traditionnelles Africaines*.9, 17-23.
- Kapadia G.J., Angerhofer C.K., Ansa-Asamoah R., 1993.** Akuammine: An antimalarial indolemonoterpene alkaloid of *Picralima nitida* seeds. *Planta Medica*, 59(6), 565-566.
- Louhimies S., 2002.** Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *ATLA*, 30, 217-219.
- Louppe D., Brink M., Cobbinah J.R., Chauvet M., Siemonsma J.S., 2008.** Ressources végétales de l'Afrique tropicale : Bois d'oeuvre , 7(1).
- Nazar N., Goyder D.J., Clarkson J.J., Mahmood T., Chase M.W., 2013.** The taxonomy and systematics of Apocynaceae: Where we stand in 2012. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), 482-490.
- Noedl H., 2008.** Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359, 2619-2620.
- Okokon J.E., Antia B.S., Igboasoyi A.C., Essien E.E., Mbagwu H.O.C., 2007.** Evaluation of antiplasmodial activity of ethanolic seed extract of *Picralima nitida*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 464-467.
- Okunji C.O., Iwu M.M., Ito Y., Smith P.L., 2005.** Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-zone-refining countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 28, 775-783.
- Osuala N., Inya-Agha S.I., Odoh U.E., Ezeugwu C.O., Ohadoma S.C., 2018.** Pharmacognostic studies on the seeds of *Picralima nitida* Stapf (Apocynaceae). *International Journal of Pharmacy*, 109, 548-563.
- Peters, W., Portus, J.H. and Robinson, B.L., 1975.** The chemotherapy of rodent malaria, XXII, The value of drugresistant strains of *Plasmodium berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Annals Trop. Med. Parasitol*, 69, 155-171.
- Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, 2017.** Groupe recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des RPC 2007, consulté en mai 2019, accessible à : <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>.
- WHO, 2012.** Résultats du projet ACIDI/OMS-AFRO-questionnaire de la consultation de fin de projet rempli par les pays, 2012.