



Évaluation de l'effet insecticide de l'extrait acétonique des feuilles séchées de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) chez les adultes de *Anopheles gambiae*, Maroua (Cameroun)

Pierre SAOTOING^{1*}, Fernand-Nestor Fohouo TCHUENGUEM², Amadou DAWÉ¹
et Célestine NGATARANG¹

¹Université de Maroua, Ecole Normale Supérieure, Département des Sciences de la Vie et de la Terre,
Maroua, Cameroun.

²Université de Maroua, Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie, Maroua, Cameroun.

³Université de Ngaoundéré, Faculté des Sciences, Département des Sciences Biologiques,
Ngaoundéré, Cameroun.

*Auteur correspondant, E-mail: psaotoing@gmail.com, Tél. : (237) 96 02 89 78 / (237) 79 27 26 26

RÉSUMÉ

L'efficacité de l'extrait acétonique des feuilles de *Calotropis procera* a été évaluée sur les adultes de *Anopheles gambiae* de la ville de Maroua (Cameroun) par la méthode de la moustiquaire imprégnée. La poudre des feuilles de cette plante a été extraite à l'acétone et diluée à l'hexane à des concentrations suivantes : 8,45mg ; 23,35mg, 42,25mg ; 59,15mg et 84,5mg pour imprégner une surface de moustiquaire de 1,69 cm². Les parcelles de moustiquaire imprégnées sont fixées à la base des cônes calqués sur le modèle des cônes-OMS. Après 24 heures d'exposition, nous avons obtenu 100% de mortalité des moustiques aux concentrations 59,15mg et 84,5mg. La concentration létale 50 (CL₅₀) est de 3,03 g/m² et l'heure létale 50 (HL₅₀) est de 7 h 31 min 17s. Toutefois, ces valeurs de CL₅₀ et HL₅₀ sont très élevées comparativement à la Moustiquaire Imprégnée (MILDA) de l'Insecticide Deltaméthrine (55 mg/m²) qui est à Longue Durée d'Action et efficace à la CL₅₀ de 2,30 x 10⁻⁴ g/m² et HL₅₀ de 2h11mn13s. Ce qui signifie que la moustiquaire-MILDA est plus efficace que l'extrait des feuilles de *Calotropis procera*.

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: *Calotropis procera*, effet insecticide, moustiquaire imprégnée, *Anopheles gambiae*, Maroua, Cameroun.

INTRODUCTION

Malgré les avancées scientifiques, le paludisme continue de sévir dans toute l'Afrique intertropicale où selon de récentes estimations, 219 millions de cas de paludisme et 660 000 décès associés ont été recensés en 2010 (OMS, 2012). Pour lutter contre ce fléau, l'OMS a mis en place de nouvelles stratégies. L'une des méthodes les plus

adéquates repose en grande partie sur le contrôle des vecteurs adultes impliqués dans la transmission du paludisme. Les moyens de lutte anti-vectorielle utilisent entre autres les moustiquaires imprégnées et les pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides de synthèse. La lutte anti-vectorielle par le Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane (DDT) et la dieldrine contre les moustiques au Cameroun

a connu deux grandes périodes. La première qui allait de 1952 à 1962 visait l'éradication du paludisme. La seconde avait débuté dans les années 1980 avec le développement de la protection individuelle par l'utilisation des moustiquaires imprégnées (Carnevale et Mouchet, 2000). Jusqu'en 1956, les opérations furent basées sur les désinfections par le DDT à raison de 2 g/m². En 1957, la dieldrine a été introduite avec une rémanence annuelle à 0,6 g/m² (Carnevale et Mouchet, 2000). Cependant, l'utilisation abusive de ces insecticides a entraîné la résistance des insectes (Chol et al., 2003). De plus, ces composés sont des véritables polluants de l'environnement car ne se dégradent pas facilement (Aquino et al., 2004). Ils entraînent également des effets neurologiques et l'intoxication des organismes non ciblés (Chol et al., 2003). Malgré les méthodes diversifiées de lutte contre les agents vecteurs, le paludisme reste et demeure à l'heure actuelle, un problème majeur de santé publique (OMS, 2012). Devant ces difficultés que rencontre le Programme National de Lutte contre le paludisme, il serait aussi nécessaire de rechercher et d'améliorer parallèlement l'utilisation des insecticides naturels qui, tout en étant aussi actifs, sont biodégradables et bien connus par les communautés locales (Njan et al., 2007 ; Saotoing, 2005). Les travaux antérieurs ont montré que certaines plantes contiennent dans leurs organes (feuilles, fruits, fleurs...) des substances qui ont des propriétés acaricides, insecticides, bactéricides et fongicides (Pamo et al., 2004). Ces plantes à large spectre d'action pourraient être utilisées comme insecticides de remplacement (Brahim et al., 2006). Des études menées par Kerharo et Adams (1974) ont montré que les extraits de feuilles de *Caloropis procera* possèdent un puissant pouvoir insecticide contre les larves de *Culex quinquefasciatus*. L'objectif du présent travail est d'évaluer l'effet insecticide des feuilles de *Caloropis procera* dans la lutte anti-vectorielle à travers le modèle des cônes-OMS.

MATERIEL ET METHODES

Présentation du site d'étude

L'étude a été menée à Maroua, chef-lieu de la Région de l'Extrême-Nord du Cameroun. Maroua est une ville d'environ 400 000 d'habitants selon le recensement de 2005 qui s'étire sur les rives du Mayo-Kalialo. Le climat, de type soudano-sahélien, est caractérisé par une saison des pluies très courte qui alterne avec une saison sèche relativement longue selon les années (Suchel, 1987). La pluviométrie est globalement d'environ 865 mm d'eau par an. La température est d'environ 35 °C avec une valeur maximale de 45 °C (avril-mai) et une valeur minimale de 25 °C (décembre-janvier) (Yann, 2000I). La végétation est constituée de steppes à épineux sahéliennes (Boulais, 1984).

Methodologie

Prélèvement des larves

Les larves d'anophèles ont été prélevées dans un gîte larvaire permanent localisé au quartier populaire dit « Pont-Vert ». La récolte des larves s'est faite à l'aide d'une louche à manche en émail. Les larves ont ensuite été transportées au laboratoire dans un récipient adéquat contenant l'eau de gîte. Les larves d'anophèles sont facilement reconnaissables parmi les autres larves d'insectes à partir de leur position parallèle à la surface de l'eau.

Élevage des larves d'anophèle

Le développement des larves jusqu'au stade adulte s'est déroulé au laboratoire de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) de Maroua. Les larves récoltées directement dans les gîtes sont transférées dans de grands plateaux en métal. Elles sont nourries par la poudre nutritive constituée de crevettes et de biscuits écrasés à quantité égale. Une pincée de ce mélange, correspondant à 3 g, est aspergée à la surface de l'eau tous les deux jours. L'eau des plateaux est remplacée également tous les deux jours par l'eau de gîte d'un volume de 400 ml. Le remplacement de l'eau de gîte permet d'éviter la pollution qui proviendrait de la poudre nutritive. Deux à trois jours après

l'introduction des larves dans les grands plateaux, nous notons l'apparition des nymphes. Les nymphes sont ensuite retirées des plateaux à l'aide d'une pipette à poire et mises dans des verres transparents contenant de l'eau du gîte. Ces verres sont ensuite placés à l'intérieur des cages faites de tulle moustiquaire. Trois à cinq jours après l'introduction des nymphes dans les cages, apparaissent des moustiques adultes. La nutrition des anophèles adultes s'est faite par une solution de saccharose 10% placée à l'intérieur de chaque cage dans une boîte de pétri. En plus, un repas de sang de lapin leur était administré tous les 2 jours afin d'éviter le biais de faim des résultats qui devrait provenir de l'insuffisance alimentaire des moustiques adultes. Les tests ont lieu trois jours après l'émergence des anophèles. Le test est répété trois fois pour chaque concentration.

Matériel végétal

Récolte du matériel végétal

Les feuilles de *Calotropis procera* ont été récoltées au Marché Comice de Maroua. Elles ont été séchées au laboratoire pendant une semaine à la température ambiante. Ensuite, elles ont été triturées à l'aide d'un mortier et le broyat tamisé pour obtenir une poudre.

Extraction

250 g de poudre des feuilles de *Calotropis procera* a été pesée à l'aide d'une balance électronique de marque GM-300P et macérée dans 2 litres d'acétone pendant 48 heures. Le mélange a ensuite été filtré à l'aide du coton hydrophile placé dans un entonnoir. Le tourteau obtenu a été ré-extrait dans les mêmes conditions. Le filtrat obtenu a été concentré sous un évaporateur rotatif et l'extrait d'aspect verdoyant et pâteux ainsi obtenu a permis la réalisation des tests insecticides. Le rendement de l'extrait a été calculé par la formule suivante:

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de l'extrait obtenu}}{\text{masse totale de poudre}} \times 100$$

Imprégnation des parcelles de moustiquaire

Des gammes de concentrations plus ou moins proches par rapport aux normes ont été choisies pour nos tests. Ainsi, nous avons opté pour 0,5 g/m² ; 1,5 g/m² ; 2,5 g/m² ; 3,5 g/m² et 5 g/m² comme concentrations-tests. Les cônes que nous avons utilisés pour les tests ont été fabriqués sous le modèle des cônes-O.M.S. Chaque cône est recouvert en dessous par la moustiquaire imprégnée et bouché au-dessus par un morceau de coton hydrophile. Nous avons coupé des morceaux carrés de 13 cm de côté. Les surfaces des cônes étant très réduites par rapport aux superficies (m²) utilisés industriellement, nous avons utilisé une similitude afin de déterminer les masses d'extraits proportionnelles à la surface d'un cône. Pour une surface de 0,0169 m², il faut un volume de 2 ml de solvant organique. À l'aide d'une pipette, 2 ml d'hexane sont prélevés et versés dans une boîte de pétri contenant la masse d'extrait correspondant à une concentration donnée. Après dissolution complète, la parcelle de moustiquaire correspondant à la surface nécessaire pour la base du cône y est trempée. Les parcelles de moustiquaire imprégnée sont laissées au séchage à température ambiante pendant 1 heure afin de laisser l'extrait adhérer sur la moustiquaire et faire évaporer complètement l'hexane.

Effet insecticide de l'extrait contre *Anopheles gambiae*

Les moustiquaires imprégnées sont fixées sous les cônes à l'aide d'un ruban adhésif. Au total, 7 cônes ont été utilisés dont 5 réservés pour les différentes concentrations (0,5 g/m² ; 1,5 g/m² ; 2,5 g/m² ; 3,5 g/m² ; 5 g/m²) et 2 autres comme cônes-témoins. Parmi les cônes témoins, un est doté de la moustiquaire imprégnée de Deltaméthrine 55 mg/m² qui est la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide à Longue Durée d'Action (MILDA), habituellement et actuellement distribuée par le gouvernement aux populations. Cette moustiquaire est donc considérée comme témoin positif. Le dernier cône-témoin est habillé d'une moustiquaire ordinaire simple sans substance afin

d'apprécier les conditions expérimentales de vie des moustiques. Après la répartition des cônes et la fixation des moustiquaires imprégnées, 30 moustiques non sexés sont introduits dans chaque cône à l'aide d'un aspirateur à insectes. L'ouverture des cônes est refermée par le coton hydrophile et les cônes contenant les moustiques sont suspendus au laboratoire à l'aide d'une ficelle pour permettre une bonne aération. L'efficacité de l'extrait est mesurée d'après leur effet knockdown (*kd*) au bout de 3 minutes. Puis, les observations ont continué toutes les 30 minutes pendant 12 heures. Le dispositif expérimental est laissé jusqu'à 24 heures d'observation. Le nombre de moustiques choqués ou morts a été enregistré. Les concentrations létales 50 (CL_{50}) et l'heure létale 50 (HL_{50}) ont été calculées selon Finney (1971).

Analyse des données

Les méthodes d'analyse de variance (ANOVA) ont été utilisées. Les valeurs sont séparées par l'utilisation du test de Student-Newman-Keuls. Microsoft Office Excell a servi pour réaliser les graphiques.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendement de l'extraction

A partir de 250 g de poudre de feuilles de *Calotropis procera*, nous avons obtenu une masse de 11,62 g de l'extrait, soit un rendement de 4,6%. Selon Azevodo et al. (2002) l'écologie d'une plante a une influence quantitative sur la synthèse de ses métabolites secondaires.

Effet de l'extrait de feuilles de *Calotropis procera* sur *Anopheles gambiae*

L'expérience menée nous révèle que le témoin à la moustiquaire non imprégnée a présenté un taux de mortalité de 7% après 24 heures d'exposition. Cette faible mortalité serait liée aux facteurs intrinsèques des moustiques à savoir l'état de santé, faim, traumatisme. De la Figure 1, il ressort que le taux de mortalité des anophèles augmente avec la durée d'exposition et la concentration en extrait. La plus petite concentration (0,5

g/m²) devient efficace à partir d'une heure et induit 37% de mortalité après 24 heures d'exposition. Les concentrations 1,5 et 2,5 g/m² ont tué respectivement 50 et 67% de moustiques en 24 heures d'exposition. La concentration 3,5 g/m² a provoqué 100% de mortalité des moustiques à la 24^{ème} tandis que celle de 5 g/m² a induit 100% à la 12^{ème} heure. Le témoin au MILDA a un taux de mortalité très élevé atteignant 100% de mortalité avant la 2^{ème} heure d'exposition. Ceci confirme le puissant effet insecticide du pyréthroïde (Deltaméthrine) chez les moustiques (Figure 1). Ansari et al. (2000) ont également présenté une évolution similaire entre le taux de mortalité et la concentration après leurs travaux sur l'activité larvicide et répulsive de l'huile essentielle de *Dalbergia sissoo* Roxb sur *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* et *Culex quinquefasciatus*. L'activité insecticide serait donc due à des cardénolides (Calotropine, Calotropagénine, Uscharine, Uscharidine, Calotoxine, Uzarigénine, Acide - 19 -calotropine, Proceroside, substances toxiques, présentes sur presque toutes les parties de la plante de *Calotropis procera* (Erdman, 1983). Ces substances se retrouvent dans toutes les parties de la plante ou dans l'extrait à l'acétone soluble dans l'hexane traduisant ainsi la présence des huiles non volatiles (riche en acides gras). Toutefois, il convient de noter que l'activité insecticide des extraits de plantes varie en fonction de l'espèce, de la partie de la plante utilisée pour l'extraction, le mode d'extraction, la répartition géographique de la plante et les méthodes utilisées pour l'évaluation des tests (Sukumar et al., 1991).

Évaluation de la concentration létale 50 (CL_{50}) et de l'heure létale 50 (HL_{50})

Les CL_{50} et HL_{50} obtenues sont consignées dans le Tableau 1. Il ressort de ce tableau que *C. procera* présente une CL_{50} de 3,03 g/m² tandis que la moustiquaire imprégnée d'insecticide à longue durée d'action (MILDA) a une CL_{50} de $2,30 \times 10^{-4}$ g/m². Ce qui signifie que MILDA est de loin plus efficace que l'extrait de *C. procera*. Ce qui paraît normal dans la mesure où l'extrait

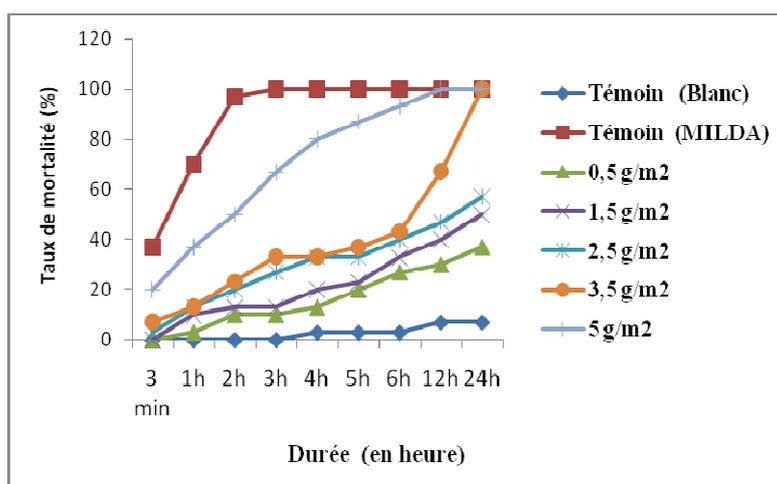


Figure 1 : Taux de mortalité en fonction du temps à différentes concentrations chez *Anopheles gambiae*.

Tableau 1 : Concentration létale (CL₅₀) et Heure létale 50 (HL₅₀) de *Calotropis procera* et MILDA.

Insecticides	CL ₅₀ (g/m ²)	HL ₅₀
<i>Calotropis procera</i>	3,03 ^c	7h31mn48s ^a
MILDA	2,30 x10 ^{-4a}	2 hours 52 mn 28 s ^c

Les valeurs suivies par des lettres différentes sur la même colonne, sont significativement différentes au seuil de 5%. Très hautement significatif (p≤0,001). Très significatif (p≤0,01).

acétonique des feuilles de *C. procera* comporterait des impuretés de nature à influencer les résultats, comparativement au MILDA qui n'est constitué que de la deltaméthrine, substance bien purifiée. Des études menées au Mali à base de l'extrait éthéré des feuilles de *C. procera* chez les larves d'anophèles ont révélé que cette plante possède une forte activité larvicide avec une CL₅₀ de 372,5 µg /mL (Dahafolo, 2009). Les tests biologiques effectués au Cameroun selon une méthodologie inspirée du protocole standard de l'OMS ont révélé que les huiles essentielles de certaines plantes locales possèdent également de remarquables propriétés larvicides chez *Anopheles gambiae*, notamment les cas de *C. citratus*, *T. vulgaris*, *O. gratissimum* et *O. canum* qui ont induit 100% de mortalité des larves de stade 4 de A.

gambiae à des concentrations respectives de 100 ppm, 200 ppm, 350 ppm et 400 ppm (Tchoumboung et al., 2009). Le Tableau 1 montre également que l'heure létale de l'extrait acétonique des feuilles de *C. procera* est de 7 h 31 min17s tandis que celle de MILDA est de 2 hours 52 mn 28 s. Saotoing (2005) a mené une étude similaire sur l'efficacité de six huiles essentielles extraites des plantes locales du Nord-Cameroun chez *Anopheles gambiae* Giles 1902 et a trouvé des HL₅₀ comprises entre 6 h 36 mn 36 s (*Ocimum canum*) et 14 h 22 mn 10 s (*Eucalyptus camaldulensis*).

Conclusion

Le présent travail a montré que l'extrait acétonique des feuilles de *Calotropis procera* possède des propriétés insecticides sur

Anopheles gambiae de la ville de Maroua. Les concentrations les plus élevées ont entraîné des plus grands taux de mortalité. Les résultats de ces investigations ont permis de montrer l'existence des moyens locaux pour mener à bien une lutte contre les insectes nuisibles au Cameroun. L'extrait de feuilles de *Calotropis procera* présenterait plusieurs avantages tels que sa disponibilité, sa proximité, son abondance, son efficacité, son faible coût, voire sa tolérance de toxicité pour l'Homme et l'environnement. La vulgarisation des vertus de cette espèce végétale pourrait constituer une solution dans les programmes de lutte antivectorielle afin de réduire la transmission du paludisme et toutes les autres maladies transmises par les moustiques. Cependant, les molécules actives sur les moustiques et la toxicité de cette plante pour l'Homme et l'environnement restent à déterminer.

REMERCIEMENTS

Les auteurs de cet article présentent leur sincère reconnaissance aux responsables de laboratoire de l'IRAD de Maroua, au Chef de Département de Chimie organique de l'ENS de Maroua qui a facilité le travail en nous permettant d'utiliser les matériels de son laboratoire. Nos remerciements vont également à la haute hiérarchie de l'Université de Maroua pour avoir contribué financièrement à la réalisation de ce projet.

REFERENCES

- Ansari MA, Vasudevan P, Tandon M, Razdan RK. 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresour. Technol.*, **71**: 267-271.
- Aquino M, Fyfe M, MacDougall L, Remple V. 2004. West Nile virus in British Columbia. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**: 1499-1501.
- Azevodo N, Campos I, Ferreira H, Portes D, Seraphin J, Realino de Paula J, Santos S, Feerri P. 2002. Essential oil chemotype in *Hyptis suaveolens* from Brazilian cerrado. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**: 205-216.
- Boutrais J. 1984. *Le Nord du Cameroun : des Hommes, une Région*. Edition de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-mer: Paris ; 121-143.
- Brahim A, Saadia O, Fouad M, Saadia M. 2006. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques. *Agron. Soc. Environ.*, **10**(2) : 67-71.
- Carnevale P, Mouchet J. 2000. La lutte antivectorielle au Cameroun. Passé-présent-avenir. Réflexions. *Bull Soc Pathol Exot*, **94**(2): 202-209.
- Chol WI, Lee EH, Chol BR, Park H. 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Hortic. Entomol.*, **96**: 1479-1484.
- Dahafolo Koné. 2009. Étude de la Phytochimie et des activités larvicide, anticholinestérasique et antioxydante des extraits de quatre plantes du Mali : *Acacia nilotica* Guill. et Perr. (Mimosaceae), *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. (Asclepiadaceae), *Euphorbia sudanica* A. Chev (Euphorbiaceae) et *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Bamako, Mali, P.123.
- Finney DJ. 1971. *Probit Analysis* (3rd edn). Cambridge University Press: Cambridge; 333.
- Gillies MT, Coetzee. 1987. The Anophelinae of Africa South Sahara (Ethiopian) Zoogeographical region. South Afr. Inst. Med. Research: Johannesburg; 343p.
- IRAD. 2005. Rapport annuel d'activités, IRAD, 376p.
- Nikiema WPR. 2005. Propriétés pharmacochimiques de *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) récolté au Mali : Etude préclinique des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines. Thèse de

- Doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali, 162.
- Njan Nloga AM, Saotoing P, Tchouankeu JC, Messi J. 2007. Effect of Essential Oils of Six Local Plants Used Insecticide on Adults of *Anopheles gambiae* Giles 1902. Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Ngaoundéré. *Cameroun Journal of Entomology*, **4**(6): 444-450.
- OMS. 1992. Relevé épidémiologique hebdomadaire n° 22, mai-juin.
- Saotoing P. 2005. Diversités culicidienne dans la partie septentrionale du Cameroun et effet des huiles essentielles sur les adultes d'*Anopheles gambiae* Giles 1902, Thèse de Doctorat, Université de Yaoundé I Cameroun, p. 119p.
- Suchel JB. 1987. Les climats du Cameroun, Thèse de Doctorat, Université St. Etienne, France, 1186p.
- Sukumar K, Perich MN, Boobar LR. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **7**: 210-237.
- Tchoumboungang F, Jazet DPM, Sameza ML, Nkouaya Mbanjo EG, Tiako Fotso GB, Amvam Zollo PH, Menut C. 2009. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(1): 77-84.
- Yann L. 2000. Climatologie. In *Atlas de la Province de l'Extrême-Nord Cameroun*, Seignobes C, Iyebi-Mandjek O (eds). IRD. MINREST: Paris; 27-33.