

METHODES DE PRESELECTION DES PLANTES FEBRIFUGES DE LA FLORE MALGACHE EN VUE DE LA RECHERCHE DE LEUR ACTIVITE ANTIPALUDEENNE

par

J.L. RAKOTOAMBOA, C.R. RAHANTANIRINA, R. ANDRIANTSIFERANA,
J.P. LEPERS, P. COULANGES, J. LE BRAS

Actuellement, le paludisme est la principale endémie de Madagascar et préoccupe le Ministère de la Santé par sa prévalence. Il doit sévir depuis fort longtemps car dans les régions isolées, les populations continuent de se soigner avec des plantes.

Compte-tenu de sa recrudescence, du coût de plus en plus élevé des antipaludéens de synthèse, de l'apparition et du développement des pharmacorésistances, il est logique sinon très normal qu'à Madagascar où la richesse de la flore est bien connue, la recherche d'anti-paludéens à partir des plantes médicinales soit entreprise.

Nous rapportons dans ce travail, notre démarche pour une présélection systématique des plantes médicinales malgaches.

I. — COLLECTE D'INFORMATIONS

1. REÇOUPEMENT BIBLIOGRAPHIQUE:

Les documents bibliographiques se rapportant à la pharmacopée traditionnelle malagasy évoquent rarement le paludisme mais relatent surtout des plantes fébrifuges. Comme ce fait pourrait provenir de l'interprétation du Malagasy, nous avons jugé prudent de prendre en considération pour notre étude, toutes les plantes fébrifuges en plus de celles préconisées spécifiquement contre le paludisme. Nous avons ainsi recensé 160 plantes appartenant à 136 genres et à 63 familles qui peuvent être classées, suivant les réputations en trois catégories :

- les fébrifuges,
- les adjuvantes de la quinine,
- celles indiquées contre le paludisme.

Les familles les plus représentées sont classées dans le Tableau 1.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé ces données à la lumière des pharmacopées des îles de l'Océan Indien et de pays africains (Centrafrique, Gabon, Mali, Rwanda, Sénégal ...).

Nous avons constaté une certaine analogie, tant sur les genres botaniques que sur les modes de préparation des drogues (décoction, infusion, inhalation).

Ces recouplements bibliographiques ont permis d'établir une première liste de plantes.

TABLEAU I

Principales familles botaniques malagasy renfermant des plantes fébrifuges et anti-paludéennes.

Familles	Nombre d'espèce réputées
Composées	21
Légumineuses	16
Rubiacées	12
Ménispermacées	8
Euphorbiacées	7
Lauracées	4
Liliacées	4
Acanthacées	4
Anacardiacées	3
Bignoniacées	3
Bombacacées	3
Hypéricacées	3
Labiées	3
Méliacées	3
Pipéracées	3
Verbénacées	3

2. ENQUETES ETHNOBOTANIQUES:

Afin de réactualiser les données précédentes, le Département d'Ethnobotanique du C.N.R.P. entreprend des enquêtes sur la médecine et la pharmacopée traditionnelles. Pour respecter l'unité socio-culturelle et l'homogénéité bioclimatique, les investigations sont réalisées par région. Jusqu'à présent, seules les régions de l'Alaotra et de l'Ambongo-Boina ont été explorées.

Les résultats, bien qu'encore limités, corroborent les données de la littérature.

3. DONNEES CHIMIOTAXONOMIQUES:

La chimiotaxonomie permet de relever quelques familles botaniques qui comptent des espèces renfermant une activité antipaludéenne. Elles peuvent guider pour compléter la liste établie par les méthodes précédentes.

Les Eucinchonées (Rubiacées) qui ont donné la quinine, comptent 7 espèces réputées fébrifuges. Sur les 51 espèces recensées à Madagascar, 33 sont endémiques et méritent d'être examinées.

Dans les composées, *Artemisia annua*, connue originellement en Chine populaire a donné le *Gingaoshu* ou artémisine, un sesquiterpène lactone. Les genres voisins devraient être passés en revue.

Les **Simarubacées** sont susceptibles de contenir des quassinoïdes. Mais l'activité antipaludéenne de cette famille moléculaire est limitée par sa toxicité, qui est en relation avec son large domaine d'activités pharmacologiques. A Madagascar, un des cinq genres de cette famille a connu une grande réputation. Nous nous proposons de les tester tous.

Les **Méliacées** comptent certaines espèces contenant des limonoïdes, qui sont actifs contre le paludisme (38).

Les **Labiées** ont livré des coléones et des rolyéanones qui sont anti-paludéennes (32).

4. APPROCHE CHIMIOANALOGIQUE:

Les molécules douées d'activité antipaludéenne sont actuellement connues.

Bon nombre de plantes de Madagascar ont été étudiées chimiquement. Il serait intéressant de passer en revue les molécules qu'elles renferment, au cas où certaines structures s'apparenteraient à celles des antipaludéens.

II — PRESELECTION DES PLANTES

La combinaison des informations précédentes nous a conduit à une liste de plantes, classées en fonction de leur probabilité d'efficacité.

Mais l'imprécision de certains critères de sélection, (le terme fébrifuge par exemple), d'une part, et la grande spécificité sélective du *Plasmodium*, d'autre part, nous obligent à une vérification systématique de leur présumée activité anti-paludéenne.

Nous nous proposons donc de tester un nombre maximal de plantes avec un minimum de dépenses, dans un minimum de temps.

Nous avons adapté certaines méthodologies connues et avons mené conjointement des tests présélectifs *in vitro* et *in vivo*.

Notre problème majeur a été d'obtenir le matériel végétal, du fait de la dispersion des espèces recherchées dans toute l'île.

1. PREPARATION DES EXTRAITS:

Après séchage à l'ombre à la température ambiante, les parties de la plante indiquées comme drogue sont broyées. Ensuite :

— les plantes sélectionnées par enquêtes sont préparées selon la méthode empirique indiquée : 100 g de broyat sont mis à décocter dans 1 litre d'eau distillée pendant une heure. Après filtration, l'opération est répétée une deuxième fois. L'ensemble des filtrats est ensuite centrifugé à 4000 t/mn pendant 15 mn afin d'éliminer les grosses particules, avant d'être lyophilisé.

— les plantes choisies par chimiotaxonomie et chimioanalogie sont traitées selon les familles chimiques escomptées.

2. TESTS PRELIMINAIRES DE SELECTION:

Pour ce premier tri, nous travaillons avec une dose unique, relativement forte, pour chaque extrait :

Test	Dose	Extrait
<i>in vivo</i>	0,5 g/Kg/administration	Lyophilisat
	0,1 g/Kg/administration	Extraits chimiques
<i>in vitro</i>	0,75 mg/ml	Lyophilisat
	0,1 mg/ml	Extraits chimiques

Tout extrait ayant une activité partielle (30 p. 100 d'inhibition) ou totale *in vivo* et/ou *in vitro* sera ensuite soumis au test de confirmation effet/dose.

a) Test préliminaire *in vivo*

Nous avons utilisé le modèle souris blanche — *Plasmodium berghei* (souche NK 65).

Nous avons adopté le «four day test» de W. PETERS que nous avons légèrement modifié comme suit :

Chaque souris reçoit par voie I.V. caudale 10^6 hématies parasitées à J2. A J0 les souris ayant une parasitémie comprise entre 0,1 à 0,9 p. 100 sont sélectionnées. La lecture microscopique se fait sur la frange du frottis mince. Dix champs par frottis sont lus. Un champ contient par estimation 200 hématies. Six souris servent de témoins, chaque extract est administré à un lot de 5 souris.

Par un gavage journalier, effectué de J0 à J3, chaque souris reçoit 0,2 ml d'extract. Le frottis final est fait à J4.

Pour chaque lot, nous avons fait la moyenne finale et avons évalué l'indice de croissance.

$$\text{Indice de croissance Pcr} = \frac{\text{Moyenne de parasitémie à J4}}{\text{Moyenne de parasitémie initiale J0}}$$

Ensuite, nous avons évalué le pourcentage de croissance par rapport aux témoins :

$$\text{Pourcentage de croissance Pcr} = \frac{\text{Indice de croissance de chaque lot}}{\text{Indice de croissance du lot témoin}} \times 100$$

Enfin, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de chaque lot :

$$\text{Pourcentage d'inhibition Pi} = 100 - \text{Pcr}$$

Malgré le travail supplémentaire de présélection des souris inoculées, cette méthode a l'avantage de permettre une meilleure appréciation de l'activité partielle éventuelle de l'extrait.

En effet, comme il s'agit encore d'un extrait brut, le principe actif pourrait être en qualité infime (du fait de sa teneur réelle dans l'extrait total, ou bien par défaut de solubilité dans l'eau). Par ailleurs, la posologie adoptée pourrait être inadéquate. L'extrait pourrait être mal absorbé aussi, ou le principe actif rapidement métabolisé.

D'autre part, par rapport à la méthode de W. PETERS, le test retardé de deux jours s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance plasmodiale.

b) Test préliminaire *in vitro*

Nous avons adopté le semi-microtest isotopique de J. LE BRAS et al. en utilisant des souches isolées et mélangées de *Plasmodium falciparum* prélevées de malades, et un pool de sérum AB.

Les produits à tester étant préalablement déposés stérilement dans les plaques, ce test consiste à cultiver des *Plasmodium falciparum* pendant 48 heures à 37° C dans un milieu enrichi en CO₂ et appauvri en O₂ (une étuve gazée à 5 p. 100 de CO₂ et à 5 p. 100 d'O₂). La suspension finale de la culture doit contenir 2,5 p. 100 d'hématies parasitées (à parasitème supérieure ou égale à 0,05 p. 100), 87,75 p. 100 de RPMI tamponné de bicarbonate de sodium et d'H.E.P.E.S. et 9,75 p. 100 de sérum AB.

Chaque cupule de la plaque de culture (boîte multiple Nunclon delta 13124 — 143982) reçoit 0,7 ml de cette suspension. A la 18^e heure, nous ajoutons dans chaque cupule 20 microlitres d'une suspension d'hypoxanthine à 20 microcuries/ml préalablement préparée stérilement avec le milieu de congélation. Après la collecte cellulaire, la lecture isotopique est effectuée.

Les lyophilisats, repris en suspension aqueuse avec de l'eau bidistillée à raison de 2,5 ml/ml, puis filtrés stérilement sur des filtres de 0,22 µ, sont déposés préalablement dans les cupules à raison de 0,21 ml par cupule. Les plaques sont ensuite séchées sous hotte à flux laminaire pendant une semaine avant leur utilisation.

Pour les plantes sélectionnées par chimiotaxonomie ou par chimioanalogie traitées spécifiquement avec des solvants organiques appropriés, les extraits sont remis en suspension comme suit:

1,12 mg d'extrait est mis dans 0,2 ml d'éthanol absolu ajouté d'une goutte de diméthylsulfoxyde (solvant organique non toxique pour la culture), sous agitation ultrasonique pendant 10 mn. Il est ensuite repris avec 10 ml de milieu de culture (RPMI tamponné) et filtré stérilement. L'éthanol s'évapore par la suite et ce mélange drogue-milieu de culture à une dose de 0,1 mg/ml après l'addition de sérum AB convenable sera tout de suite utilisé.

Chaque fois, nous répartissons 4 extraits différents par plaque. 5 cupules par extrait et 4 cupules témoins. A chaque lot ou série de tests effectués, une plaque de chloroquine à doses croissantes est utilisée parallèlement pour apprécier et contrôler la réponse plasmodiale.

3. RESULTATS ET COMMENTAIRES

Ces tests préliminaires de présélection ne sont pas achevés. À présent 140 plantes ont été testées simultanément *in vitro* et *in vivo*. Les résultats sont récapitulés dans les deux tableaux suivants:

TABLEAU II

Résultats préliminaires du test *in vivo* de 140 plantes

Doses : — 0,5 g/Kg pour les lyophilisats — 0,1 g/Kg pour les autres extraits

Nombre d'extraits	Pourcentage d'inhibition
102	< 10 %
25	10 — 30 %
11	30 — 60 %
2	60 — 80 %
0	80 — 100 %

TABLEAU III

Résultats préliminaires du test *in vitro* de 140 plantes

Doses : — 0,75 mg/ml pour les lyophilisats — 0,1 mg/ml pour les autres extraits

Nombre d'extraits	Pourcentage d'inhibition
40	< 10 %
20	10 — 30 %
30	30 — 60 %
40	60 — 80 %
10	80 — 100 %

— Deux plantes ont une inhibition *in vivo* (60 à 80 p. 100) et *in vitro* (60 à 100 p. 100). Elles passeront incessamment aux tests de confirmation effet-dose.

— Beaucoup d'extraits présentent une forte inhibition *in vitro* alors que la plupart ne sont pas efficaces *in vivo*.

Les résultats obtenus *in vitro* ne doivent pas surprendre : tout produit ayant une toxicité banale est susceptible d'inhiber la croissance plasmodiale. Les plantes qui présentent une activité dans ces conditions seront ultérieurement soumises à un test de confirmation effet-dose. Les extraits ayant une droite de régression d'inhibition à forte pente passeront ensuite le test *in vivo* par voie S.C.

13 plantes ont une inhibition partielle (30 à 80 p. 100) *in vivo*. Elles seront soumises au test de confirmation effet-dose. Celles dont la droite de régression d'inhibition aura une pente assez forte, seront sélectionnées.

Enfin les plantes qui paraissent partiellement actives *in vivo* mais totalement inactives *in vitro* feront l'objet d'une étude particulière. Au cas où leurs métabolites seraient actifs, nous envisageons de les faire ingérer par des lapins, de recueillir le sérum de ceux-ci pour l'utiliser à la place du sérum AB pour la culture.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADJANOHOUN E.J., AKE ASSI L., AHMED ALI, — Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques aux Comores. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Rapport présenté à l'A.C.C.T., 1982.
2. ADJANOHOUN E.J., AKE ASSI L., FLORET J.J., GUINKO S., KOUMAREM, AMYI A.M.R., RAYNAL J. — Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Mali. A.C.C.T., 1980.
3. ADJANOHOUN E.J. et all. — Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (îles Maurice et Rodrigues). A.C.C.T., 1983.
4. ANDRE R., BAILLEUL F., DELAVEAU P., PARIS R.R., JACQUEMIN H. — Etude chimique du *Denais fragrans* Gaertn — Plantes médicinales et phytothérapie, 1976, tome X, N° 2, 110-118.
5. BARON A. — Compendium des plantes malgaches — Notes, Reconn. Explor. 1900-1905.
6. BOITEAU P. — Introduction à l'étude des plantes fébrifuges de la flore malgache Bull. Soc. Path. Exot. 1937, tome XXX, N° 8.
7. BOITEAU P. — Précis de matière médicale malgache, 1979, Tananarive.
8. BOST R. — Pharmacopée malgache — Mémoire de l'Inst. Scientifique de Madagascar, série B, 1961, tome X, fasc. 2, 2^e note.
9. BRUCE-CHWATT L.J., BLACK R.H., CRAIG J., CANFIELD, CLYDE D.F., PETERS W., WERNSDORFER W.H. — Chemotherapy of malaria, second edition, WHO 1981.
10. CHINA COOPERATIVE RESEARCH GROUP ON QINGHAOSU AND ITS DERIVATIVES AS ANTIMALARIALS. — Chemical studies on Qinghaosu (Artemisinine) — Journal of traditional Chinese medicine 2 (1): 3-9, 1982.
11. DANDOUAU B. — Les Mpisikidy — Bull. Acad. Malg. Tananarive, 1913, 11.
12. DANDOUAU B. — Médicaments et charmes que l'on trouvait à acheter sur les marchés du temps d'Andrianampoinimerina — Bull. Acad. Malg. Tananarive, 1913, 11.
13. DANDOUAU B. — Ody et Fanafody — Bull. Acad. Malg. Tananarive, 1913, 11.
14. DARUTY C. — Plantes médicinales de l'île Maurice et des pays intertropicaux 1886.
15. DEBRAY M., JACQUEMIN M., RAZAFINDRAMBAO R. — Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar, 1971.
16. DESCHEEMAEKER A. Sj. — Ravimaitso, 1975.
17. DUBOIS H.M.S.J. — La monographie du Betsileo, 1050-1051.
18. GIRARD. G. — La santé publique et ses problèmes à Madagascar entre les deux guerres mondiales 1917-1940. Bull. Acad. Malg., 1964, 42, 1-13.
19. G.U.H.M., WARHURST D.C., PETERS W. — Rapid action of qinghaosu and related drugs on incorporation of 3 [H] isoleucine by *Plesmodium falciparum* in vitro. Biochemical Pharmacology, vol. 32 n° 17, pp 2463-2466, 1983.

20. HAROLD N. MOLDENKE — *Flore de Madagascar et des Comores*: 174^e famille, 1956.
21. HUMBERT H. — *Flore de Madagascar et des Comores*: 66^e famille, 1954.
22. JACQUEMIN H. — *Plantes médicinales de l'île Sainte Marie* — Publ. ORSTOM 1971.
23. JING-BO JIANG WING-BO GUO, GUO-QIAO LI YUN CHEUNG KONG — Antimalarial activity of mefloquine and Qinghaosu — *The Lancet*, August 1982, 285-288.
24. KERHARO — Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales et toxiques de la pharmacopée sénégalaise traditionnelle — Thèse de Grade de Docteur d'Etat, 15 Déc. 1971.
25. KERHARO — *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle*: Plantes médicinales et toxiques, 1974.
26. LAMBERTON — Flore de Madagascar — *Bulletin économique de Madagascar*, 1911-1912.
27. LE BRAS J. — *Plasmodium falciparum*: culture *in vitro* et application à l'étude de l'activité des schizontocides. Thèse de doctorat d'état ès sciences pharmaceutiques 1984.
28. MATTHEW O., ABATAN, MODUPE J. MAKINDE — Screening *Azadirachta indica* and *Pisum sativum* for possible antimalarial activities — *Journal of ethnopharmacology*, 17 (1986) 35-93.
29. PARKER — *Malagasy materia medica* — *Antananarivo Annual*, 1875-1876.
30. PERNET R. — Les plantes médicinales malgaches — *Mémoire de l'Inst. Scient. de Madagascar*, série B, 1959, tome IX.
31. PERNET R. — Les plantes médicinales malgaches: catalogues de nos connaissances chimiques et pharmacologiques — *Mémoire de l'Inst. Scient. de Madagascar*, série B, 1957, tome VIII.
32. PERNET R. — *Pharmacopée de Madagascar* — Publ. ORSTOM, 1957.
33. PERRIER DE LA BATHIE H. — *Flore de Madagascar et des Comores*: 119^e famille, 1952.
34. PNUD/BANQUE MONDIALE/OMS. — Extrait de: Recherche sur les maladies tropicales TDR: Paludisme, chapitre 2, septième rapport du programme 1er Janvier 1983 — 31 Décembre 1984.
35. POLÓNSKY J. — Quassinoïd Bitter Principles II — *Fortschritte der chemie organischer Naturstoffe*, 1985.
36. RAKOTO-RATSIMAMANGA — *Eléments de la pharmacopée malagasy*, 1969, tome 1.
37. RAYNAL J., TROUPIN G. et SITAP. — *Flora et médecine traditionnelle*, Mission d'étude 1978 au Rwanda.
38. RAMANDIMILAHATRA R. — Paludisme et contact colonial à Madagascar. 1896-1906 — *Mémoire d'Histoire*, 1980.

39. RAUL D'OLIVEIRA FEIJAO — **Medicina pelas plantas**, 7. A Edição, 1954.
40. SCHMITT J.P. — Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar 1971.
41. SUDARATANA ROCHANAKIJ, YODHATHAI THEBTARANONT, CHAVI YENJAI YOUNG YUTH YUTHAVONG. — Nimbolide, a constituent of *Azadirachta indica*, inhibits *Plasmodium falciparum* in culture — **The Southeast Asian journal of Tropical Medicine and Public Health**, Mars 1985, Vol. 16 n° 1.