

# De l'ethnopharmacologie aux résultats en laboratoire : différence signifie-t-elle inapplicabilité ?

**Michel Sauvain**

Unité de Recherche R043 "Pharmacochimie des Substances Naturelles" de l'IRD  
Faculté de Pharmacie 35, chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex 4 - France

## Résumé

Depuis 1992, notre groupe de recherche (composé de chercheurs boliviens et français) travaille sur la problématique de l'évaluation de l'activité pharmacologique de plantes utilisées en médecine traditionnelle dans différentes ethnies de Bolivie (Chacobo, Mosekene, Alteños et Tacanas). Les espèces sélectionnées ont été criblées contre le paludisme *in vitro* et sur l'animal. Plus de 200 espèces différentes ont été évaluées et seulement un faible pourcentage d'entre elles a montré une forte corrélation entre l'usage et les résultats biologiques.

Ces contradictions peuvent être expliquées suivant plusieurs angles de vue : la plante médicinale est censée alléger des symptômes qui sont plus ou moins reliés à une atteinte palustre, les critères de choix des plantes à tester doivent être discutés. Des traitements successifs sont fréquemment administrés jusqu'à ce que le patient soit guéri, ces traitements peuvent avoir ainsi un effet synergique qu'il sera difficile de démêler par la suite. La manière traditionnelle de préparer et d'administrer la plante médicinale ne peut pas être toujours prise en compte par le test de criblage qui doit répondre à une certaine standardisation pour être réalisable en laboratoire. L'absence d'activité sur l'animal peut être reliée à des taux d'absorption, de métabolisation différents de l'animal à l'homme. Le rôle de l'immunité acquise chez l'homme est difficilement pris en compte par les modèles animaux, etc. La validité et la justesse des tests de criblage conçus pour mettre en évidence une activité antipaludique d'extraits de plantes seront discutées.

La malaria ou paludisme ravage les pays tropicaux. Cette maladie est la troisième cause de mortalité mondiale avec deux à trois millions de victimes par an essentiellement en Afrique (Trigg et col., 1998). Les plantes médicinales sont généralement les seules armes que possèdent les populations touchées pour lutter contre elle, les remèdes végétaux étant proposés le plus souvent pour réduire l'ampleur des symptômes.

À partir des travaux que réalisent l'IRD et ses partenaires en Bolivie, nous nous proposons de dégager les pistes méthodologiques permettant de valider l'efficacité des remèdes antipaludiques. Cette démonstration s'appuiera sur les données pharmacologiques et cliniques de deux composés antimalariques majeurs d'origine naturelle, la quinine et l'artémisinine.

## Paludisme en Bolivie

La Bolivie est située au centre du continent sud américain entre 10° et 23° de latitude sud. Sa superficie est de 1.098.581 km<sup>2</sup> (environ huit millions d'habitants). Les régions basses de la Bolivie sont at-

teintes par le paludisme, la population touchée ayant augmenté de 700 % entre 1981 et 1999. Le nombre de cas recensés par an est actuellement de plus de 70 000 cas (MSPS, 1998). Cette statistique ne couvre que partiellement la réalité dans les zones touchées qui restent difficiles d'accès pour les services de santé.

Les trois groupes amérindiens avec lesquels nous avons travaillé vivent dans des zones représentatives des trois écosystèmes où se développe le paludisme :

Les Chacobo vivent en zone amazonienne avec une transmission du paludisme toute l'année, deux espèces plasmodiales sont impliquées : *Plasmodium falciparum* et *P. vivax* ;

Les Alteños vivent dans des zones de vallée aride (département de Cochabamba), la transmission ne se fait que durant la saison des pluies de décembre à mars, 2 500 cas de paludisme sont reportés par an dans cette région, tous à *Plasmodium vivax* ;

Les Mosekene vivent sur le piémont andin caractérisé par une végétation tropicale humide d'altitude, la transmission du paludisme est ici intermédiaire entre celles rencontrées en Amazonie et dans les vallées sèches.



## Critères de sélection des plantes médicinales supposées antipaludiques

Nous avons établi trois types de critères pour sélectionner les plantes. Ils sont classés par ordre décroissant d'importance :

### Paludisme

La notion de paludisme a été intégrée récemment dans la médecine traditionnelle des groupes étudiés. Les dispensaires éduquent les populations aux risques du paludisme depuis une cinquantaine d'années.

### Fièvres

Les fièvres peuvent être d'étiologies diverses. Le fait que les praticiens soient conscients de la régularité des accès et leur apparition saisonnière est un critère complémentaire de choix des plantes à évaluer.

Atteintes de l'appareil digestif (vomissements, hépatomégalie, etc)  
Le paludisme chronique entraîne des atteintes particulières de l'appareil digestif dont le gonflement du foie ou hépatomégalie qui se note surtout chez l'enfant après une exposition répétée à la maladie.

## Critères pharmacologiques de tri des plantes bioactives

Deux méthodes ont été utilisées dans ces études *in vitro*, l'une économique est basée sur l'utilisation de deux doses permettant de situer l'intérêt de l'activité constatée, l'autre nécessitant au minimum quatre doses croissantes espacées d'un log de concentration permet d'établir une CI50, critère plus fin d'observation de l'activité. Le choix des concentrations de test est basé sur l'activité *in vitro* des extraits alcooliques de quinquina (CI50 inférieure au 1 µg/ml) et de ceux d'*Artemisia annua* Linné (CI50 de l'ordre de quelques µg/ml) et de celle *in vivo* de l'extrait alcoolique de quinquina (100 mg/kg/J pendant 4 jours). L'activité est appréciée suivant une échelle décrite dans le tableau 1.

## Activité antipaludique des plantes sélectionnées à partir des pharmacopées de trois ethnies boliviennes

Chacobos (Muñoz et col., 2000)

Quatre plantes ont été relevées comme antipaludiques, deux d'entre elles sont actives *in vivo*. Douze plantes sont utilisées contre les symptômes du paludisme, 50% se sont avérées actives.

Mosetene (Muñoz et col., 2000)

Deux plantes sont présumées antipaludiques, aucune n'est active *in vivo*. Quinze plantes sont utilisées contre les symptômes du paludisme, 50% sont actives.

Alteños (Muñoz et col., 2000)

Une plante antipaludique est inactive sur l'animal. Sur vingt plantes utilisées contre les symptômes du paludisme, 50 % sont actives.

Les plantes médicinales pour lesquelles nous proposons une étude complémentaire sont actives sur le paludisme expérimental de la souris. On peut constater qu'environ la moitié des plantes utilisées dans les trois ethnies sont actives. Mais il est nécessaire de nuancer le propos. En effet, si la sélection se limite aux plantes possédant des activités comparables à celles des extraits de référence, seules quatre plantes de la Pharmacopée Chacobo et une plante de celle des Mosetene peuvent être sélectionnées pour des études complémentaires, soit 10 % des plantes médicinales présumées antipaludiques. La corrélation entre les activités mesurées chez l'animal et sur les modèles cellulaires est indispensable pour la poursuite des travaux en particulier l'isolement du ou des principes actifs. C'est également un élément permettant de distinguer une activité parasiticide d'autres activités comme une action immunomodulatrice ou antipyrétique.

## Facteurs qui peuvent avoir une influence sur les résultats

La traduction en termes médicaux modernes de la nosologie traditionnelle du paludisme est une étape préalable indispensable à la sélection des plantes. L'étude attentive des indications traditionnelles peut donner une chance supplémentaire à un usage qui n'est pas confirmé pharmacologiquement par les essais courants. Par exemple, la fréquence élevée du report d'un usage peut encourager à approfondir l'étude de l'activité antipaludique d'une plante médicinale avec des méthodes adaptées. En effet, dans nos études comme dans beaucoup d'autres, les extraits ont été standardisés pour permettre une répétabilité des essais en vue d'une comparaison des activités entre elles. L'autre méthode consisterait à reproduire les conditions exactes de chaque préparation traditionnelle afin d'en évaluer l'activité.

En Bolivie, la prévalence du paludisme est différente d'une région à l'autre, le type de transmission varie également continue ou saisonnière. L'immunité acquise est par conséquent différente d'une population à l'autre, d'un âge à l'autre et l'efficacité des remèdes végétaux peut donc être variable. Les tests pharmacologiques les plus couramment utilisés ne sont pas forcément pertinents pour mesurer cette modulation de l'activité.



Deux exemples permettront d'illustrer l'intérêt de suivre la méthodologie des préparations traditionnelles :

### Association de plantes et synergie d'activité

Dans la pharmacopée Mosekene, deux plantes sont utilisées en association contre le paludisme : *Tesseria integrifolia* Ruiz et Pavon et *Hymenachane donacifolia* Beauv. À la préparation sont ajoutés des œufs de termites. Les deux plantes testées séparément dans nos essais présentent une activité antipaludique à des degrés divers. Dans quelle mesure cette «chimie combinatoire» peut-elle améliorer le résultat des plantes testées indépendamment ? Quelle pourrait être la méthodologie efficace qui permettrait d'évaluer ces combinaisons ?

### Convergence d'usages et de modes d'utilisation

*Geissospermum* spp est un genre très utilisé contre le paludisme en Amazonie brésilienne (Brandao et col., 1992), dans les Guyanes (Grenand et col., 1987), en Bolivie. Il s'agit donc d'une convergence d'usages. Les espèces du genre *Geissospermum* peuvent cohabiter dans un même écosystème (arbres de la forêt primaire) et sont souvent confondues par les tradipraticiens. Nous avons relevé son utilisation comme antipaludique chez les Chacobo (*Geissospermum leave* (Vell.) Miers) et nous l'avons testé. Elle s'est avérée active *in vivo* mais également toxique. Ce genre a été étudié chimiquement.

Deux types de composés ont été décrits :

- des alcaloïdes indoliques dimères de type geissospermine qui sont connus pour leur cytotoxicité auxquels on pourrait attribuer en toute hypothèse la mortalité des animaux ;
- des alcaloïdes indoliques monomères dont la flavopéireine dont le dérivé réduit a été montré actif *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* (Wright et col., 1996). La principale caractéristique chimique de ce dernier composé est la présence d'un ammonium quaternaire qui assure son extraction préférentielle en milieu aqueux. On pourrait donc reprendre l'étude de l'activité antipaludique du genre en testant l'activité de la décoction ou de la macération alcoolique prises par voie orale, préparations traditionnelles décrites dans les pharmacopées. Si ces préparations s'avèrent plus actives que toxiques, il serait également intéressant de doser la flavopéireine dans ces dernières.

### L'extrait brut d'écorce de quinquina est pharmacologiquement et cliniquement actif

La quinine est toujours le composé antipaludique majeur prescrit dans les cas les plus graves de paludisme résistant aux autres anti-

paludiques. L'extrait éthanolique de quinquina d'où est extraite la quinine, a une CI50 de 0,2 µg/ml sur *Plasmodium falciparum in vitro*. La dose efficace 50 de l'extrait brut sur des souris infectées par *Plasmodium berghei* est de 100 mg/kg/J durant 4 jours (test de Peters).

La concentration de quinine est de 5% dans les écorces de quinquinas sauvages (*Cinchona calisaya* Wedd.). L'extraction par l'eau chaude des écorces de quinquina donne un rendement en quinine de 3% et l'extraction par l'éthanol a un rendement de 5%.

Le traitement classique de la crise de paludisme est la prise de 1,5 gramme de quinine par jour durant 7 jours.

L'absorption de la décoction de 50 grammes d'écorce de quinquina dans un demi-litre d'eau pendant une journée correspond à la dose nécessaire pour soigner la maladie. Toutes les données ethnopharmacologiques sont donc réunies pour affirmer que l'administration orale d'une préparation médicinale d'écorces de quinquina doit pouvoir guérir un accès palustre de la même manière qu'un traitement au sulfate de quinine.

### *Artemisia annua* L., plante médicinale chinoise est-elle réellement une plante antipaludique ?

Le principe actif du Qinghao (*Artemisia annua* L.), l'artémisinine est plus actif que la molécule de référence, la chloroquine (Meshnik et col., 1996).

Dans la préparation traditionnelle (Klayman, 1985) on fait bouillir environ 20 grammes de feuilles dans un litre d'eau, cette extraction correspond théoriquement à l'extraction de 100 mg d'artémisinine, la concentration maximale du principe actif dans les variétés les plus riches étant de 0.5%. L'artémisinine cristallisée est insoluble dans l'eau.

Pour soigner 50% des patients, il est nécessaire d'absorber par voie orale, 5 grammes d'artémisinine durant trois jours (Chinese Cooperative Research Group, 1982), dose qu'il apparaît impossible d'atteindre avec l'absorption de la préparation traditionnelle.

### Discussion

Les contradictions que recèle le cas d'*Artemisia annua* sont fascinantes. Il s'agit d'une plante médicinale utilisée depuis deux mille ans contre les fièvres palustres. Cette plante contient l'un des plus puissants antipaludiques de la pharmacopée actuelle, l'artémisinine avec une activité *in vitro* parmi les plus fortes, de l'ordre de la nanomole. La structure chimique de ce composé, une sesquiterpène



lactone avec un pont endopéroxyde, est unique en chimie des substances naturelles. Le mécanisme d'action est lui-même probablement très différent de ceux proposés pour les autres classes d'antipaludiques. A l'inverse, sa biodisponibilité dès qu'il est extrait de la plante est médiocre du fait d'une absence de solubilité dans l'eau, les doses nécessaires pour traiter un patient sont très importantes sans commune mesure avec ce que l'on peut espérer extraire de la poignée de feuilles qui servent à la préparation de la tisane traditionnelle. Ces faits contradictoires ont déjà fait l'objet soit d'études tentant de mettre en avant le rôle de substances synergiques (Elford et col., 1987 ; Chen Liu et col., 1992 ; Agtmael et col., 1999) soit des déclarations de scientifiques de renom sur le hasard qui aurait conduit à la découverte de l'artémisinine (Meshnik, 1998) et dont l'activité antipaludique serait sans rapport avec l'usage médicinal de la plante. Nous nous penchons bien volontiers sur l'expérimentation menée par une organisation non gouvernementale, ANAMED, soutenue scientifiquement par l'Université de Tübingen en Allemagne qui a tenté récemment de démontrer l'activité sur le paludisme humain d'une préparation traditionnelle d'*Artemisia annua* en zone de forte endémie palustre en République démocratique du Congo (Mueller et col., 2001). Cette étude démontre que l'eau chaude extrait 40% de l'artémisinine contenue dans les feuilles d'une variété riche d'*Artemisia annua*. L'essai «clinique» décrit dans l'article montrerait une baisse importante de la parasitémie des sujets traités (48 sujets) et une diminution des symptômes du paludisme. Cette étude considérée par ces auteurs comme préliminaire mériterait d'être reprise en suivant les bonnes pratiques des essais cliniques d'antipaludiques (Rogier et col., 2001). On peut constater que la plupart des essais cliniques conduits avec des plantes médicinales souffrent de fortes carences méthodologiques. Toutefois, cette voie de recherche clinique sur les plantes médicinales antipaludiques (PMAP) mérite d'être encouragée comme le fait actuellement l'OMS en soutenant la formation d'un réseau de scientifiques sur cette question (RITAM ou "Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods"). Ce réseau se propose de répondre aux questions essentielles que nous avons tenté d'aborder à travers notre expérience en Bolivie : les traitements avec les PMAP fonctionnent-ils ? Quel type de recherche doit on faire pour développer l'usage des PMAP comme des traitements effectifs et acceptables ? Quelles procédures éthiques et légales doit-on accomplir et comment ?

## Références

- BRANDAO M.G.L., GRANDI T.S.M., ROCHA E.M.M., SAWYER D.R., KRETTLI A.U. (1992) Survey of Medicinal plants used as antimalarials in Amazon, *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 175-182
- CHEN LIU K. C-S., YANG S.L., ROBERTS M.F., ELFORD B.C., PHILLIPSON J.D. (1992) Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures, *Plant Cell Reports*, 11, 637-640.
- Chinese Cooperative Research Group on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials (1982) Clinical Studies on the treatment of Malaria with qinghaosu and its derivatives, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2, 45-50.
- ELFORD B.C., ROBERTS M.F., PHILLIPSON J.D., WILSON R.J.M. (1987) Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 434-436.
- GRELAND P., MORETTI C., JACQUEMIN H. (1987) *Pharmacopées traditionnelles en Guyane*, Paris, Editions de l'IRD (ex ORSTOM), 569 p.
- KLAYMAN D.L. (1985) Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China, *Science*, 228, 1049-1054.
- MESHNIK S. (1998) From Quinine to Qinghaosu : Historical Perspectives, in W. SHERMAN (Ed) *Malaria : Parasite Biology, Pathology and Protection*, Washington DC., ASM Press.
- MESHNIK S.R., TAYLOR T.E., KAMCHONWONGPAISAN S. (1996) Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides : from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy, *Microbiological Reviews*, 60, 301-315.
- MUELLER M.S., KARHAGOMBA I.B., HIRT H.M., WEMARKOR E., LI S.M., HEIDE L. (2001) The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects, soumis pour publication à *Tropical Doctor*.
- MINISTERIO DE SALUD Y PREVISION SOCIAL. Dirección general de epidemiología. Unidad de Enfermedades transmitidas por vectores. Servicio Nacional de Control de la malaria (1998) *Plan Nacional descentralizado, integrado y participativo dirigido a reducir la morbilidad y prevenir la mortalidad por malaria en Bolivia. Periodo 1998 - 2002*. Document ronéoté, La Paz.
- MUÑOZ V., SAUVAIN M., BOURDY G., CALLAPA J., BERGERON S., I. ROJAS I., BRAVO J.A., BALDERRAMA L., ORTIZ B., GIMENEZ A., DEHARO E. (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 127-137.
- MUÑOZ V., SAUVAIN M., BOURDY G., CALLAPA J., ROJAS I., L. VARGAS L., TAE A., DEHARO E. (2000) The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 139-155.
- MUÑOZ V., SAUVAIN M., BOURDY G., ARRAZOLA S., CALLAPA J., RUIZ G., CHOQUE J., DEHARO E. (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 123-131.



ROGIER C., HENRY M-C., SPIEGEL A. (2001) Diagnostic des accès palustre en zone d'endémie : bases théoriques et implications pratiques, *Médecine Tropicale*, sous presse.

TRIGG PI, KONDRACHINE AV (1998) The Current Global Malaria Situation, in SHERMAN IW (Ed.) *Malaria, Parasite, Biology, Pathogenesis and Protection*, Washington, ASM Press, pp 11-22.

VAN AGTMAEL M.A., GUPTA V., VAN DER WÖSTEN T.H., RUTTEN J.-P.B., VAN BOXTEL C.J. (1999) Grapefruit juice increases the bioavailability of artemether, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 405-410.

WRIGHT C.W., PHILLIPSON J.D., AWE S.O., KIRBY G.C., WARHUST D.C., QUETIN-LECLERCQ J., ANGENOT L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydrium bases, *Phytotherapy Research*, 10, 361-363.

**Tableau I.** Echelle d'activité permettant d'évaluer les activités d'extraits de plantes sur les modèles expérimentaux du paludisme, *in vitro* sur la schizogonie erythrocytaire de *Plasmodium falciparum* et *in vivo* sur le modèle murin de paludisme expérimental (test suppressif de Peters)

Concentrations	% d'inhibition	Activité
<u>1re méthode d'évaluation <i>in vitro</i></u>		
10 µg/ml	90%	très bonne
10 µg/ml	50%	bonne
100 µg/ml	90%	moyenne
100 µg/ml	50%	faible
<u>2e méthode d'évaluation <i>in vitro</i></u>		
CI50	< 5 µg/ml	très bonne
	5 < x < 10 µg/ml	bonne
	>10 µg/ml	faible
<u>Méthode d'évaluation <i>in vivo</i></u>		
1000 mg/kg/J	> 50 %	modérée
idem	< 50 %	inactive
500 mg/kg/J	> 50 %	modérée
250 mg/kg/J	> 50 %	bonne
100 mg/kg/J	> 50 %	excellente

# From ethnopharmacology to laboratory results: does discrepancy mean irrelevancy?

Michel Sauvain

Unité de Recherche R043 "Pharmacochimie des Substances Naturelles" de l'IRD  
Faculté de Pharmacie 35 chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex 4 - France

## Abstract

Since 1992, our research team (a combination of Bolivian and French researchers) is working on the problematic of the evaluation of the biological activity of plants used traditionally in different Bolivian ethnias (Chacobo, Mosekene, Alteños, Tacana). Species retained have been screened against malaria, *in vitro* and on the animal. More than 200 different species have been evaluated, and only a weak percentage did show a strong correlation between uses and biological results. These discrepancies can be explained by different considerations:

Firstly, the difficulties related with the interpretation of the traditional use of plants, generally presented as useful for alleviate different symptoms, more or less related with a malarial attack. The criterium to select the plant has to be discussed. Also, different successive treatments are administered to the patient until he cures. Synergism effects could be responsible for the antimalarial activity and the method to study this type of effect has to be invented.

Then, the traditional way of using medicinal plant (preparation, administration) cannot always be taken into account in the screening test performed in the laboratory: therefore the *in vivo* inactivity of extracts may be correlated with the way of administration, having a strong perturbing effect on the absorption rate, delivery process, metabolism process. The laboratory tests have difficulties to measure the part of acquired human immunity, etc. The validity and accuracy of the antimalarial screening test aimed to evidence antimalarial agents from plant extract will be discussed.

Malaria ravages the tropical countries. This disease is the third cause of world mortality with two in three million victims a year essentially in Africa. Healing plants are generally the only weapons which possess the populations touched to fight against it, plant remedies being proposed mostly to reduce the dimension of the symptoms.

From the works that IRD realize in Bolivia with his partners, we suggest the methodological tracks allowing to validate the efficiency of antimalarial remedies. This demonstration will lean on the pharmacological and clinical data of two natural antimalarial compounds, quinine and artemisinin.

## Malaria in Bolivia

Bolivia is situated in the center of the American south continent between 10 ° and 23 ° of south latitude. The surface is 1.098.581 km<sup>2</sup> (8.000.000 of inhabitants). The low regions of Bolivia are affected

by malaria, the touched population having increased by 700% between 1981 and 1999. The number of cases listed a year is at present more than 70 000 cases. This statistics covers only partially the reality in touched zones which remain difficult of access for health services.

The three Amerindian groups with whom we worked live in representative zones of the three ecosystems where develops the malaria:

Chacobo lives in Amazonian zone with a transmission of the malaria all year long, two species are involved: *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* ;

Alteños lives in zones of dry valley (Cochabamba's Department), the transmission is made only during rainy season from December till March, 2 500 cases of malaria are put back a year in this region, all due to *Plasmodium vivax* ;

Mosekene lives on the oriental Andes characterized by a wet tropical vegetation of height, the transmission of the malaria is here intermediate among those met in Amazonia and in dry valleys.



## Type of criteria to select supposed antimalarial medicinal plants

We established three type of criteria to select plants. They are classified in descending order by importance:

### Malaria

The notion of malaria was integrated recently into the traditional medicine of the groups studied. Health centers educate the populations at the risks of the malaria since about fifty years

### Fevers

The fevers can be of different origins, the fact that healers are conscious of the regularity of the accesses and their seasonal appearance is an additional criterion of choice of plants for testing

### Infringements of the digestive system (vomits, hepatomegalia, etc.)

The chronic malaria pulls particular infringements of the digestive system among which the inflation of the liver or hepatomegalia which notes especially at the child's after an repeated exposure to the disease.

## Pharmacological criteria of sorting active plants

Two methods were used in these *in vitro* studies, the one economic is based on the use of two doses allowing to place the interest of the noticed activity, the other one requiring at least four increasing doses spaced out by a log of concentration allows to establish a IC50, finer criterion of observation of the activity. The choice of the concentrations of test is based on the *in vitro* activity of the alcoholic extracts of *Cinchona* (IC50 lower than one  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) and of those of *Artemisia annua* (CI50 of the order of some  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) and of that *in vivo* of the alcoholic extract of *Cinchona* (100 mg / kg / D during 4 Days). The activity is appreciated according to a scale described in the table 1.

## Antimalarial activities of the plants selected from the pharmacopoeias of three Bolivian ethnic groups

### Chacobo (Muñoz and col., 2000)

Four plants were found as antimalarial, two of them are active *in vivo*. Twelve plants are used against the symptoms of the malaria, 50 % turned out active

### Mosetene (Muñoz and col., 2000)

Two plants are presumed antimalarial, any is active *in vivo*. Fifteen plants are used against the symptoms of the malaria, 50% are active.

### Alteños (Muñoz et col., 2000)

An antimalarial plant is inactive on the animal. On twenty plants used against the symptoms of the malaria, 50% are active.

Healing plants for which we propose a follow-up study are active on the experimental malaria of the mouse. One can notice that about half of the plants used in three ethnic groups are active. But it's necessary to qualify the comment. Indeed if the choice limits itself to plants possessing activities comparable to those of reference extracts, only four Chacobo plants and a Mosetene plant can be selected for follow-up studies. Thoses plants represent 10% of the presumed antimalarial healing plants. The correlation between the activities measured into the animal and on the cellular models is indispensable for the pursuit of the works in particular for the isolation of one or several active principles. It is also an element allowing to distinguish a parasiticide activity the other activities as the immunomodulatory or febrifugal action.

## Factors which can have an influence on the results

The translation in modern medical terms of the traditional medicine is a preliminary stage indispensable to the selection of plants. The attentive study of the traditional medical use can give a supplementary chance to a plant activity which is not confirmed pharmacologically by current assays. For example, the high frequency of the report of a use can encourage to deepen the study of the antimalarial activity of a medicinal plant with adapted methods. Indeed, in our studies as in many of the others, extracts were standardized to allow a comparison of the activities among them. The other method would consist in reproducing the exact conditions of every traditional preparation to estimate the activity of it.

In Bolivia, importance of the malaria is different from a region in the other one, the type of transmission varies also continuous or seasonal. The acquired immunity is consequently different from a population in the other one, from an age to the other one and the efficiency of plant remedies can so be variable. The pharmacological tests most usually used are not necessarily relevant to measure this modulation of the activity. Two examples will allow to illustrate the interest to follow the methodology of the traditional preparations:

## Associations of plants and synergy of activity

In the Mosetene pharmacopoeia, two plants are used in association against malaria: *Tesseria integrifolia* Ruiz and Pavon and *Hymenachane donacifolia* Beauv. In the preparation some termit

eggs are added. Both plants tested separately in our assays present an antimalarial activity in different degrees. In what measure can this «combinatorial chemistry» improve the result of plants tested independently? What could be the effective experimental method which would allow to estimate these combinations?

### Convergence of manners and modes of use

*Geissospermum* spp is a genus very used in Brazil Amazonian (Brandao and col., 1992), in the three Guyana (Grenand and col., 1987) and in Bolivia against malaria. It is so about a convergence of uses. The species of the genus *Geissospermum* live in the same ecosystem (trees of the primary forest) and are often confused by healers. We found the use as antimalarial to Chacobos (*Geissospermum* leave (Vell.) Miers) and we tested it. It turned out active *in vivo* but also toxic. This genus was studied chemically. Two types of compounds were described:

- dimeric indol alkaloids of geissospermine type which are known for their toxicity to which one can attribute in any hypothesis to the mortality of animals;
- indol monomeric alkaloids like flavopereirin among whom the reduced by-product of which was shown active *in vitro* on *Plasmodium falciparum* (Wright and col., 1996). The main chemical characteristic of this last compound is the presence of a quaternary ammonium which assures its preferential extraction in aqueous medium. One could so resume the study of the antimalarial activity of the genus by testing the activity of the decoction or the alcoholic extract taken by oral way, traditional preparations described in pharmacopoeias. If these preparations turn out more active than toxic, it will be also interesting to measure flavopereirin content in these last ones.

### The raw extract of *Cinchona* bark is pharmacologically and clinically bioactive

The quinine is always the major antimalarial compound prescribed in the most grave cases of malaria resisting to other antimalarials. The ethanolic extract of *Cinchona* where from is extracted quinine, has a IC50 of 0,2 µg / ml on *in vitro Plasmodium falciparum* model. The effective dose 50 of the raw extract on mice infected by *Plasmodium berghei* is 100 mg / kg / J for 4 days (test of Peters).

The concentration of quinine is 5% in the barks of wild *Cinchona* (*Cinchona calisaya* Wedd.). The extraction by warm water of the *Cinchona* barks gives a return in quinine of 3% and the extraction by ethanol has a return on 5%.

The classic treatment of the malaria attack is the grip of 1,5 grams of quinine a day for 7 days. The absorption of the decoction of 50 grams of *Cinchona* bark in a half-liter of water during a day corresponds to the necessary dose to cure the disease.



*Des sources du savoir aux médicaments du futur — From the sources of knowledge to the medicines of the future*

All the ethnopharmacological data are so gathered to assert that the oral administration of a medicinal preparation of barks of *Cinchona* should be able to cure an malarial access in the same way as a treatment with quinine sulfate.

### *Artemisia annua*, medicinal Chinese plant is really an antimalarial plant?

The active principle of Qinghao (*Artemisia annua* L.), artemisinin is more active than the reference molecule chloroquine (Meshnik and col., 1996).

In the traditional preparation (Klayman, 1985) one boils about 20 grams of leaves in a liter of water, this extraction corresponds in theory to the extraction of 100 mg of artemisinin, the maximal concentration of the active principle in the richest variety being 0.5%. The crystallized artemisinin is insoluble in water.

To cure 50% of the patients, it is necessary to absorb by oral way, 5 grams of artemisinin for three days (Chinese Cooperative Research Group, 1982), measures that it seems impossible to achieve with the absorption of the traditional preparation.

### Discussion

The contradictions which conceals the case of *Artemisia annua* L. are fascinating. It is about a medicinal plant used since two thousands years against malaria. This plant contains one of the most powerful antimalarial of the current pharmacopoeia, the artemisinin with an *in vitro* activity among the strongest of the order of a nanomole. The chemical structure of this compound, a sesquiterpen lactone with a bridge endoperoxyde is unique in chemistry of natural substances. The mechanism of action seems itself very different from those proposed for the other classes of antimalarials. On the contrary, the bioavailability as soon as it is extracted from the plant is very poor due to its insolubility in water, the necessary doses to treat a patient are very important without common measures with what one can hope to extract from the small amount of leaves which are of use to the preparation of the traditional herbal tea. These contradictory facts have already made the object of studies trying to advance the role of synergic substances (Elford and col., 1987; Chen Liu and col., 1992; Agtmael and col., 1999) or statements of scientists of good name on the fate which would have led to the discovery of the compound artemisinin (Meshnik, 1998) and the antimalarial activity of which would be without report with the medicinal use of the plant. We bend very gladly over the clinical observation led by a non-governmental organisation, ANAMED supported scientifically by university of Tübingen in Germany which tried recently to demonstrate the activity on the human malaria of an *Artemisia annua* L. traditional preparation in zone of strong endemic malaria in Democratic Republic of Congo (Mueller and col.,



2001). This study demonstrates that the warm water extracts 40 % of artemisinin contained in the leaves of a rich variety of *Artemisia annua* L. The clinical observation show important decline of parasitaemia of the treated patients (48 treated subjects) and a decrease of the symptoms of malaria. This study considered by these authors as preliminary would deserve to be resumed by following the good practices of the antimalarial clinical assays (Rogier and coll., 2001). One can notice that most of the clinical trials led with healing plants suffer strong methodological deficiencies. However this way of clinical research on antimalarial healing plants (AHP) deserves to be encouraged. WHO already support the forming of scientists' network on this question (RITAM or "Research Initiative one Traditionnal Antimalarial Methods"). This network suggests answering the essential questions that we have to try to land through our experience in Bolivia: do treatments with the AHP work? What research type should to one do to develop the use of the AHP as actual and acceptable treatments? What ethical and legal procedures should one carry out and how?

## References

- BRANDAO M.G.L., GRANDI T.S.M., ROCHA E.M.M., SAWYER D.R., KRETTLI A.U. (1992) Survey of Medicinal plants used as antimalarials in Amazon, *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 175-182
- CHEN LIU K. C.-S., YANG S.L., ROBERTS M.F., ELFORD B.C., PHILIPPSON J.D. (1992) Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures, *Plant Cell Reports*, 11, 637-640.
- Chinese Cooperative Research Group on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials (1982) Clinical Studies on the treatment of Malaria with qinghaosu and its derivatives, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2, 45-50.
- ELFORD B.C., ROBERTS M.F., PHILLIPSON J.D., WILSON R.J.M. (1987) Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 434-436.
- GRENAND P., MORETTI C., JACQUEMIN H. (1987) *Pharmacopées traditionnelles en Guyane*, Paris, Editions de l'IRD (ex ORSTOM), 569 p.
- KLAYMAN D.L. (1985) Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China, *Science*, 228, 1049-1054.
- MESHNIK S. (1998) From Quinine to Qinghaosu : Historical Perspectives, in W. SHERMAN (Ed) *Malaria : Parasite Biology, Pathology and Protection*, Washington DC., ASM Press.
- MESHNIK SR., TAYLOR T.E., KAMCHONWONGPAISAN S. (1996) Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy, *Microbiological Reviews*, 60, 301-315.
- MINISTERIO DE SALUD Y PREVISION SOCIAL. Dirección general de epidemiología. Unidad de Enfermedades transmitidas por vectores. Servicio Nacional de Control de la malaria (1998) *Plan Nacional descentralizado, integrado y participativo dirigido a reducir la morbilidad y prevenir la mortalidad por malaria en Bolivia. Periodo 1998 - 2002*, Document ronéoté, La Paz.
- MUELLER MS., KARHAGOMBA I.B., HIRT H.M., WEMARKOR E., LI S.M., HEIDE L. (2001) The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics : agricultural, chemical and clinical aspects, submitted to *Tropical Doctor*.
- MUÑOZ V., SAUVAIN M., BOURDY G., CALLAPA J., BERGERON S., I. ROJAS I., BRAVO J.A., BALDERRAMA L., ORTIZ B., GIMENEZ A., DEHARO E. (2000) A search for natural bioactives compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 127-137.
- MUÑOZ V., SAUVAIN M., BOURDY G., CALLAPA J., ROJAS I., L. VARGAS L., TAE A., DEHARO E. (2000) The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 139-155.
- MUÑOZ V., M. SAUVAIN M., BOURDY G., ARRAZOLA S., CALLAPA J., RUIZ G., CHOQUE J., DEHARO E. (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 123-131.
- ROGIER C., HENRY M.-C., SPIEGEL A. (2001) Diagnostic des accès palustre en zone d'endémie : bases théoriques et implications pratiques, *Médecine Tropicale*, in press
- TRIGG P.I., KONDRACHINE A.V. (1998) The Current Global Malaria Situation, in SHERMAN IW (ed.), *Malaria : Parasite, Biology, Pathogenesis and Protection*, Washington, ASM Press, pp 11-22.
- VAN AGTMAEL M.A., GUPTA V., VAN DER WÖSTEN T.H., RUTTEN J.-P.B., VAN BOXTEL C.J. (1999) Grapefruit juice increases the bioavailability of artemether, *European Journal of clinical Pharmacology*, 55, 405-410.
- WRIGHT C.W., PHILLIPSON J.D., AWE S.O., KIRBY G.C., WARHUST D.C., QUETIN-LECLERCQ J., ANGENOT L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydrium bases, *Phytotherapy Research*, 10, 361-363.



**Table 1.** Scale of activity allowing to estimate the activities of plant extracts on experimental malarial models, *in vitro* on *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizogonia and *in vivo* on the murin model of malaria (test of Peters)

Concentration	Inhibition %	Activity
<i>1st in vitro method</i>		
10 µg/ml	90%	Very good
10 µg/ml	50%	Good
100 µg/ml	90%	Moderate
100 µg/ml	50%	Poor
<i>2nd in vitro method</i>		
IC 50	< 5 µg/ml	Very
	5 < x < 10 µg/ml	Good
	>10 µg/ml	Poor
<i>in vivo method</i>		
1000 mg/kg/J	> 50 %	Moderate
idem	< 50 %	Inactive
500 mg/kg/J	> 50 %	Moderate
250 mg/kg/J	> 50 %	Good
100 mg/kg/J	> 50 %	Very good