

Conception d'un médicament antimalarique à base de plantes issues de la médecine traditionnelle

Guy Balansard

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée 27, bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 5

Résumé

La méthodologie adoptée a pour objet de valider des remèdes utilisés en médecine traditionnelle et de valoriser des plantes pouvant faire l'objet d'un développement.

Elle comporte trois phases :

1. Enquêtes ethnobotaniques qui sont dans un premier temps généralistes et dans un deuxième temps ciblées sur la plante sélectionnée,
2. Etudes phytochimiques, pharmacologiques et toxicologiques,
3. Développement d'un médicament, suivant le modèle des autorisations de mise sur le marché des médicaments à base de plantes (Cahier de l'agence, n°3) comportant un dossier pharmaceutique, une étude toxicologique à court terme et après acceptation par un comité d'éthique, une étude clinique.

Notre propos est de présenter une approche méthodologique dont l'objectif est de valider des usages traditionnels et de valoriser des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

L'exemple choisi est celui des remèdes traditionnels utilisés dans le traitement du paludisme et l'objectif est de préparer un médicament à partir d'une plante utilisée en médecine traditionnelle.

Le travail que nous présentons est le fruit d'une collaboration entre les Facultés de Pharmacie et de Médecine de Bamako et de Marseille.

Pourquoi le choix de Bamako ? Parce que la gestion de la médecine traditionnelle est structurée de manière exemplaire.

La démarche que nous avons adoptée est une démarche ethnopharmacologique et le but a été de préparer un médicament destiné aux pays en voie de développement c'est à dire qui diminue parallèlement la parasitémie et la symptomatologie et qui présente une qualité pharmaceutique tout en utilisant une formulation simple permettant d'être produit à un coût compatible avec les faibles moyens pouvant être consacrés à la santé.

Le travail s'est déroulé en 3 phases :

Les enquêtes : elles ont été au nombre de 3 et ont alterné avec les études phytochimique et pharmacologique.

Les études phytochimiques et pharmacologiques

La conception d'un médicament établi suivant la procédure des AMM allégées correspondant au Cahier de l'Agence n°3 avec un dossier pharmaceutique complet et une étude toxicologique à court terme.

Enquêtes

Il existe au Mali une organisation centralisée à Bamako, le Département de Médecine Traditionnelle (DMT), dirigé par le professeur A. Keita.

Ce département dépend de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) ; il a sous sa responsabilité 8 centres régionaux de médecine traditionnelle et en particulier ceux de Kolokani, Sikasso et Bandiagara où les enquêtes ont été réalisées.

Trois enquêtes successives alternant avec des travaux de laboratoire ont permis de faire le choix de la plante qui fait l'objet d'un développement.

La première enquête a été réalisée auprès des thérapeutes traditionnels exerçant à Bamako.

Elle concernait les plantes qu'ils utilisent pour combattre les affections fébriles et a permis de recenser 19 espèces parmi lesquelles les plus utilisées sont *Mitragyna inermis* et *Nauclea latifolia*, souvent associées dans les préparations traditionnelles, et *Trichilia roka*.

Ces 3 espèces ainsi que *Glinus oppositifolius*, qui fait l'unanimité dans le traitement des affections fébriles au nord du Mali, ont été retenues pour la suite de nos travaux.

Des essais préliminaires réalisés sur des extraits aqueux, méthanolique et chloroformique de ces 4 espèces ont permis de ne retenir que *Mitragyna*, *Nauclea* et *Glinus*.



Une deuxième enquête a été diligentée pour confirmer et compléter les renseignements sur le mode de préparation traditionnelle de *Nauclea* et *Mitragyna*. Cette deuxième enquête a été conduite dans 2 centres régionaux de médecine traditionnelle à Kolokani et à Sikasso.

Dans plus de la moitié des cas, *Mitragyna inermis* feuilles et *Nauclea latifolia* écorces sont associées et sont utilisées sous forme de macéré et plus fréquemment de décocté. La forme d'utilisation est généralement la voie orale ou le bain corporel. La durée du traitement varie de 2 à 7 jours selon les guérisseurs. Certains déconseillent le décocté aqueux chez la femme enceinte.

Au terme de cette deuxième enquête nous avons réalisé une étude phytochimique et pharmacologique sur ces 2 espèces ainsi que sur *Glinus* et avons pu établir que l'activité antiplasmodiale de *Nauclea* et *Mitragyna* est due à des alcaloïdes et celle de *Glinus* à des saponosides.

Une étude de mutagénèse *in vitro* et *in vivo* réalisée sur l'extrait alcaloïdique de *Nauclea* et *Mitragyna* et sur l'extrait saponique de *Glinus* a permis d'établir que les alcaloïdes de *Nauclea latifolia* présentent une action mutagène *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, malgré l'intérêt de *Glinus oppositifolius*, la faible densité des gîtes naturels au Mali rendait difficile, dans un premier temps, le développement d'un médicament antipaludique à base de cette plante.

C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de poursuivre le développement avec les feuilles de *Mitragyna inermis* dont les alcaloïdes avaient montré lors de travaux précédents une activité cholérétique et l'absence de toxicité hépatique.

Mitragyna inermis

Les alcaloïdes de *Mitragyna* sont composés en majorité de dérivés oxindoliques, tetra et pentacycliques.

Nous avons isolé les alcaloïdes totaux, séparés différentes fractions et isolé spéciophylline et iso rynchophylline. Nous n'avons pas trouvé de différence d'action significative entre les alcaloïdes isolés, les fractions alcaloïdiques et les alcaloïdes totaux.

Nous avons donc poursuivi nos travaux sur les alcaloïdes totaux en mettant au point une méthode de dosage permettant d'évaluer les alcaloïdes totaux dans les feuilles, dans les préparations traditionnelles et dans l'extrait que nous devons mettre au point pour poursuivre le développement.

Il se posait alors 2 questions :

La première était de savoir si les alcaloïdes normalement insolubles dans l'eau se solubiliseraient dans les préparations traditionnelles et la seconde était de doser les alcaloïdes dans les préparations pour déterminer la posologie à utiliser.

Cela a justifié une troisième enquête réalisée à Kolokani et à Bandiagara au cours de laquelle nous avons ciblé des tradipraticiens qui n'utilisaient que *Mitragyna inermis* et qui ont accepté de réaliser la préparation du remède traditionnel en notre présence.



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

Nous avons noté la quantité de plante utilisée, le mode de préparation, le pH des liquides, le volume et le nombre de prises, la durée du traitement ainsi que la symptomatologie présentée par les malades qui consultaient.

Les préparations ont été récupérées et les alcaloïdes dosés. La solubilisation des alcaloïdes a été observée et due soit à un pH très acide soit à des préparations faisant appel à une fermentation.

Conception d'un médicament en suivant la procédure des AMM allégées correspondant au Cahier de l'Agence n°3

Nous avons en premier lieu préparé un lot pilote d'extrait hydro-alcoolique de feuilles permettant d'extraire une majorité de molécules hydrosolubles et d'un degré alcoolique suffisant pour extraire les alcaloïdes. Cet extrait a fait l'objet d'une étude pharmacologique avec détermination de l'activité antiplasmodiale et d'une étude toxicologique à court terme sur 28 jours avec des doses correspondant à la posologie à utiliser en thérapeutique et à 10 fois la posologie.

L'étude du comportement, les paramètres biologiques et l'étude anatomo-pathologique des différents organes réalisée au bout de 28 jours n'ont révélé aucune anomalie.

Dès lors la mise en forme galénique du produit fini pouvait être envisagée et s'est orientée sur la forme comprimé permettant une meilleure stabilité en milieu tropical.

Les dossiers pharmaceutique, pharmacologique et toxicologique vont être soumis au comité d'éthique de Bamako et dès lors les études cliniques prévues dans 2 villages proches de Bamako seront réalisées sous la responsabilité des professeurs Doumbo, Bamako et Delmont, Marseille.



Conception of an antimalaria medicinal product from plants used in traditional medicine

Guy Balansard

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée 27, bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 5

Abstract

The methodology adopted aims at validating remedies used in traditional medicine and enhancing plants open for development.

The process is three-staged:

1. Ethnobotanical surveys, first with a general scope and then targeting the plant selected;
2. Phytochemical, pharmacological and toxicological studies;
3. Development of a drug, following the procedure to obtain permission to market a herbal medicinal product (cf. Cahier published by Agence Française no. 3) including a pharmaceutical dossier, a short-term toxicological study and, after being authorised by an ethics committee, a clinical study.

The purpose of this paper is to submit a procedure aiming at validating traditional practice and enhancing plants used in traditional medicine.

The example selected is the case of traditional remedies used for the treatment of malaria, and the objective is to prepare a medicinal product from a plant used in traditional medicine.

The work we report about is the result of scientific cooperation between Faculté de Médecine et de Pharmacie in Bamako, Mali and Marseilles, France.

Why did we select Bamako, Mali?

Because the way traditional medicine is structured and managed can be considered as exemplary.

The approach we have adopted is ethnopharmacological; the aim was to prepare a medicinal product for emergent countries, i.e. a product reducing both parasitaemia and symptomatology, and featuring pharmaceutical qualities while having a simple composition, so that production could be envisaged at a cost adapted to the modest financial means that can be earmarked for health care.

Research work developed in 3 stages:

Inquiries : a total of three inquiries were conducted, in alternation with pharmacological and phytochemical studies.

Pharmacological and phytochemical studies

Designing a medicinal product following the recommendations of full market approval (FMA in abridged form), corresponding to the Cahier de l'Agence n°3, on a basis of a comprehensive pharmaceutical assessment dossier and a short-term toxicological study.

Inquiries

There is in Bamako, Mali, a central organisation called Département de Médecine Traditionnelle (Department for Traditional Medical Practice - DMI), headed by Prof. A. KEITA.

This department is a division of Institut National de Recherche en Santé Publique (National Institute of Research for Public Health - INRSP); in charge of 8 regional centres for traditional medical practice, in particular those in Kolokani, Sikasso and Bandiagara, where the inquiries were carried out.

Three consecutive inquiries, in alternation with laboratory tests, made it possible to select the plant to be developed.

The first inquiry was carried out with traditional practitioners working in Bamako.

It focussed on plants that they use to treat feverish diseases and permitted the identification of 19 species, among which the most widely used are *Mitragyna inermis* and *Nauclea latifolia* – which are often combined in traditional preparations – and *Trichilia roka*.

These 3 species, as well as *Glinus oppositifolius*, which is used universally in the treatment of feverish affections in Northern Mali, were selected for further research.

Preliminary tests carried out on aqueous, methanolic and chloroformic extracts of these 4 species led to keeping only *Mitragyna*, *Nauclea* and *Glinus*.

A second inquiry was conducted to confirm and complement the information collected about the traditional mode of preparation



applied to *Nauclea* and *Mitragyna*. This second inquiry was carried out in 2 regional centres for traditional medical practice in Kolokani and Sikasso.

In more than half of the cases, the *Mitragyna inermis* leaves and the *Nauclea latifolia* bark are associated and used as a maceration and - more frequently - as a decoction. The product is generally absorbed per os or in a bath. The duration of the treatment is generally 2 to 7 days according to the healers. Some of them recommend not to use the aqueous decoction with pregnant women.

At the end of this second inquiry, we carried out a phytochemical and pharmacological study on these 2 species and on *Glinus*, and we could establish that the antiplasmodic action of *Nauclea* and *Mitragyna* is due to alkaloids and that of *Glinus* to saponosides. A study of in vitro and in vivo mutagenesis carried out on the alkaloidal extract of *Nauclea* and *Mitragyna*, and on the saponic extract of *Glinus* permitted to establish that the alkaloids in *Nauclea latifolia* have an in vitro and in vivo mutagenic action.

Moreover, in spite of the advantage offered by *Glinus oppositifolius*, the low density of biotopes in Mali made it difficult, at the beginning, to develop an anti-malaria medicine from this plant. This is the reason why we decided to go on with our work using the leaves of *Mitragyna inermis*, whose alkaloids had shown, on the occasion of precedent research, that they have a choleric action and do not have any hepatic toxicity.

Mitragyna inermis

The *Mitragyna* alkaloids are mainly composed of oxindolic, tetra- and pentacyclic derivatives.

We isolated all the alkaloids, separated various fractions and isolated speciophyllin and iso-rhynchophyllin. We did not establish any significant difference in activity between the isolated alkaloids, the alkaloidal fractions and the complete alkaloids.

Therefore we went on with our experimentation on total alkaloids by setting up a dosage method permitting to evaluate all the alkaloids in the leaves, both in the traditional preparations and in the extract that we had to prepare to be able to go on with the operation.

We then had to answer two questions:

The first one was to determine whether the alkaloids which are unsoluble in water in normal conditions would dissolve in traditional preparations, and the second one was to measure out the alkaloids in the preparations to set the posology to be used.

This is why we initiated a third inquiry that was carried out in Kolokani and Bandiagara, in the course of which we identified traditional practitioners who used only *Mitragyna inermis* and who accepted to prepare the traditional remedy in our presence.



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

We recorded the quantity of plant used, the preparation mode, the pH of fluids, the volume and quantity of samples, the duration of the treatment and the set of symptoms presented by the patients consulting the healer.

The preparations were stored and the alkaloids were dosed. The solubilisation process of alkaloids was observed and was assigned to either a highly acid pH, or to preparations requiring fermentation.

Development of a medicine following the abridged FMA procedure as described in Cahier de l'Agence no. 3.

First we prepared a pilot batch of hydro-alcoholic leaf extract enabling us to withdraw a majority of water-soluble molecules and having an ethanolic degree high enough to extract alkaloids.

This extract was submitted to a pharmacological study to establish the anti-plasmodic action, and a short term 28-days toxicological study with doses corresponding to the posology that should be used in therapy and to 10 times the standard posology.

The observation of the behaviour, the biological data and the anatomical and pathological study of various organs carried out after 28 days did not reveal any anomaly.

From there on, the galenic preparation of the finished product could be envisaged; it was decided that it would be developed in the form of a tablet, which offers a better stability in a tropical environment. The pharmaceutical, pharmacological and toxicological dossiers will be submitted to the ethics committee in Bamako; the clinical studies to be conducted in 2 villages close to Bamako will then be carried out under the supervision of Pr. Doumbo in Bamako, Mali and Pr. Delmont in Marseille, France.

