

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Unités de Formation et de Recherche Pharmaceutiques

Année 2000

N°

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMALARIQUE IN VITRO ET IN VIVO DE PLANTES ET DE MOLECULES ANTIPARASITAIRES ISSUES DE LA FLORE BOLIVIENNE

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Montpellier I

Ecole Doctorale : Parasitologie

Formation Doctorale :

Discipline : 50

N° de Section du CNU : 41

Spécialité : Sciences Biologiques

par

Victoria Muñoz Ortiz

(Enseignant-Chercheur de l'Université de La Paz, Bolivie)

soutenue le

Jury: M. Jean-Pierre Dedet, Professeur, Université de Montpellier 1
M. Eric Deharo, Chargé de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement
M. Ogobara Doumbo, Professeur, Université du Mali, Rapporteur
Mme Ginette Jaureguiberry, Directeur de Recherche, MNHN, Rapporteur
Mme M. Mallie, Professeur, Université de Montpellier I
M. M. Sauvain, Chargé de Recherche, IRD, co-Directeur de thèse
M. A. Valentin, M.C.U., Université de Montpellier I, co-Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Président : Professeur Alain UZIEL

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M	ANDARY	Claude	Botanique et Cryptogamie
M.	AUDRAN	Michel	Physique et Biophysique
M.	BALI	Jean-Pierre	Biochimie générale et Clinique
M.	BASTIDE	Jean-Marie	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	BERLAN	Jacques	Hématologie
M.	BONNE	Claude	Physiologie
M.	BONNET	Pierre	Chimie Organique
M.	BONTOUX	Jean	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	BOUDEVILLE	Philippe	Chimie Générale et Minérale
Mme	BRES	Janine	Pharmacocinétique
M.	CABANIS	Jean-Claude	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CANO	Jean-Paul	Toxicologie
Mme	CASSANAS	Geneviève	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
M.	CASTEL	Jean	Chimie Thérapeutique
M.	CHANAL	Jean-Louis	Physique et Biophysique
M.	CHAPAT	Jean-Pierre	Chimie Organique
M.	CROS	Gérard	Pharmacologie
M.	DELARBRE	Jean-Louis	Physique Moléculaire et Structurale
M.	DELONCA	Henri	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DOREE	Marcel	Biologie Cellulaire
M.	ESCALE	Roger	Chimie Organique
Mlle	FABRE	Huguette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	FULCRAND	Pierre	Chimie Thérapeutique
M.	GALLEYRAND	Jean-Claude	Physique et Biophysique
M.	GELIS	Christian	Physique et Biophysique
M.	GIAIMIS	Jean	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	GORENFLOT	André	Biologie Cellulaire et Moléculaire

.../...

M.	GRASSY	Gérard	Chimie Organique
M.	GRIMMONPREZ	Louis	Biochimie Générale et Clinique
Mlle	HANSEL	Sylvie	Pharmacie Clinique
M.	JACOB	Maurice	Pharmacie Galénique
Mme	JULLIEN	Magali	Milieux denses et matériaux
Mme	MAILLOLS	Hélène	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MALLIE	Michèle	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	MANDROU	Bernadette	Chimie Analytique
M.	MAURY	Luc	Physique Moléculaire et Structurale
M.	MICHEL	Allain	Pharmacologie
M.	MODAT	Guy	Physiologie
Mme	MONLEAUD	Jacqueline	Droit et Economie de la Santé
M.	PAU	Bernard	Immunologie
M.	PELLECUER	Jacques	Pharmacognosie
Mme	PICOT	Bernadette	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	RAMBAUD	André	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	ROBBE	Yves	Chimie Organique
M.	ROSSI	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	ROUSSEL	Jean-Louis	Botanique et Cryptogamie
M.	SERRANO	Jean-Jacques	Pharmacologie
Mme	SIMEON DE BUOCHBERG	Michèle	Bactériologie et Virologie
Mlle	SOLERE	Maryse	Biochimie Générale et Clinique
M.	TEROL	Alain	Chimie Générale et Minérale

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Président : Professeur Alain UZIEL

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

MAITRES DE CONFERENCES

M.	ALBEROLA	Serge	Chimie Générale et Minérale
Mme	ARTIS	Anne-Marie	Chimie Thérapeutique
Mlle	AZAY	Jacqueline	Pharmacologie
M.	BATAILLE	Bernard	Pharmacie Galénique
M.	BEGEL	Michel	Didactique Physiologie
Mme	BEGU	Sylvie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	BELON	Charles	Biochimie Générale et clinique
M.	BERGE	Gilbert	Chimie Thérapeutique
Mme	BILAK	Estelle	Bactériologie et Virologie
M.	BLACHE	Yves	Chimie Organique
M.	BLAISE	Alain	Chimie Analytique et Bromatologie
Mlle	BLANCHIN	Marie-Dominique	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	BOMPART	Jacques	Chimie Organique
M.	BOUDARD	Frédéric	Immunologie
Mme	BOURRET	Evelyne	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	BRESSOLLE	Françoise	Pharmacocinétique
Mme	CABANIS	Marie-Thérèse	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CARCY	Bernard	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	CASADEBAIG	Jacqueline	Pharmacie Galénique
Mme	CASELLAS	Claude	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
Mme	CASTEX	Françoise	Immunologie
Mme	CHARLOT	Colette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	CHAUVET	Alain	Chimie Générale et Minérale
Mlle	CHOQUET	Armelle	Toxicologie
Mme	COCIGLIO	Marylène	Pharmacologie
Mlle	COHEN	Pascale	Immunologie
M.	COOPER	Jean-François	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	COSSON	Laurence	Botanique et Cryptogamie
M.	COUDANE	Jean	Chimie des Matériaux
M.	CRASSOUS	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	CUQ	Pierre	Toxicologie
M.	DARMANADEN	Roland	Chimie Thérapeutique
M.	DEVOISSELLE	Jean-Marie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DURU	Christian	Pharmacie Galénique
Mlle	DUSART	Ghislaine	Bactériologie et Virologie
M.	ENGEL	Robert	Chimie des Matériaux
Mlle	ENJALBERT	Françoise	Botanique et Cryptogamie

M.	EVARD	Alexandre	Toxicologie
Mme	FABREGUE	Eliane	Physique Industrielle et traitement de l'Information
Mlle	FENET	Hélène	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	FLORAC	Marie-Elisabeth	Botanique et Cryptogamie
Mme	FOURCROY	Stella	Physiologie
Mme	FOURNAJOUX	Josyane	Physique et Biophysique
M.	GAGNE	Didier	Biochimie Générale et Clinique
M.	GARREAU	Henri	Chimie des Matériaux
Mme	GOZE	Catherine	Chimie Thérapeutique
M.	GRIS	Jean-Philippe	Hématologie
Mme	GUIBAL	Jacqueline	Immunologie
Mme	GUIBERT	Marie-Sophie	Physique et Biophysique
Mme	GUIDICELLI	Claudette	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme	ILLES	Suzanne	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	JEANJEAN	Bernard	Chimie Générale et Minérale
Mme	LACOSTE	Anne-Marie	Bactériologie et Virologie
M.	LAGET	Jean-Pierre	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	LARROQUE	Michel	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	LASSERRE	Yves	Pharmacie Galénique
Mlle	LAURENT	Florence	Pharmacologie
Mme	LIUTKUS	Martine	Pharmacologie
Mme	MARION	Chantal	Pharmacognosie
Mme	MENAGE	Karina	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	MESTRES	Jean-Paul	Chimie Analytique
Mme	MESTRES	Gilberte	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	MILHAVET	Jean-Claude	Chimie Organique
Mme	MÜLLER	Agnès	Physiologie
Mme	NIELLOUD	Françoise	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	NURIT	Josiane	Chimie Générale et Minérale
M.	PELISSIER	Yves	Pharmacognosie
M.	PERSONNE	Christian	Bactériologie et Virologie
Mme	PHAM	Tuyet Nga	Physique et Biophysique
M.	POUCHERET	Patrick	Pharmacologie
M.	PRECIGOUT	Eric	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	RAMBAUD	Joëlle	Chimie Générale et Minérale
Mlle	RAPIOR	Sylvie	Botanique et Cryptogamie
M.	RASCOL	Jean-Pierre	Botanique et Cryptogamie
M.	RAYNAUD	Eric	Biochimie
M.	SABATIER	Robert	Physique Moléculaire et Structurale
Mme	SALHI	Sharon	Immunologie
Mme	SOULIE	Marie-Louise	Biochimie générale et Clinique
Mme	SUSPLUGAS	Claudine	Pharmacognosie
M.	SUSPLUGAS	Paul	Pharmacognosie
M.	TEISSEDE	Pierre-Louis	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	VALENTIN	Alexis	Parasitologie et Mycologie Médicale
Mlle	VIAN	Laurence	Toxicologie
Mlle	VIE	Marie-Thérèse	Physique et Biophysique

A mes Parents,

Pour votre encouragements, pour leur amour, je vous remercie.

A Carlos, à mes enfants : Carlitos, Vickycita et Olivia,

Pour votre patience de tous les jours, pour tout. Merci.

A ma famille,

A Monsieur le Professeur J.-M. BASTIDE,

Vous m'avez fait confiance de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, vos conseils m'ont été toujours fructueux, je vous remercie et je vous assure de ma respectueuse reconnaissance.

A Madame le Docteur G. JAUREGUIBERRY,

Je vous remercie pour avoir accepté de juger mon travail et d'être l'un des rapporteurs, pour la précieuse disponibilité dont vous avez fait preuve. Veuillez trouver ici l'assurance de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur O. DOUMBO,

Je suis très honorée de vous compter comme un des rapporteurs. Je vous remercie pour la précieuse disponibilité dont vous avez fait preuve. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur M. SAUVAIN,

Vous avez toujours manifesté un profond intérêt pour le travail effectué au sein du laboratoire, et plus particulièrement pour ce travail de thèse, me permettant ainsi de pouvoir travailler dans les meilleures conditions possibles. Sa rigueur scientifique et ses connaissances approfondies en Pharmacognosie et en Parasitologie ont été pour moi un exemple. Soyez ici remercié très sincèrement et assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur A. VALENTIN,

Vous avez permis la réalisation de ce travail et j'ai pu apprécier votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre patience et votre aide très précieuse. Je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma gratitude pour votre confiance.

A Madame le Professeur M. MALLIE,

Merci de vos conseils. Soyez assurée de toute ma reconnaissance pour votre sympathie, votre gentillesse et pour votre aide.

A Monsieur le Professeur J.P. DEDET,

Vous avez accepté de participer à ce jury et je vous en remercie. Je suis très honorée par votre présence. Veuillez trouver ici l'expression de ma considération la plus sincère.

A Monsieur le Docteur E. DEHARO,

Chercheur parasitologue de l'IRD, vous avez su orienter ce travail, vos conseils pertinents et votre appui sans faille m'ont permis de le terminer. Les qualités scientifiques et humaines manifestées lors de ces années passées à travailler ensemble nous ont permis de découvrir en vous collaborateur extrêmement estimé et apprécié.

A Madame le docteur G. BOURDY,

Amoureuse de la nature et des plantes, dont ses contributions importantes dans le domaine de l'Ethnopharmacologie a été importante dans ce travail. Soyez assurée de trouver ici l'expression de mon respect et de ma grande estime.

A vous tous

A mes compagnons de travail et de laboratoire pour leur appui et leur amitié : Françoise, Jacky, Jorgia, Mustofa, Hervé. Qu'ils soient assurés ici de l'expression de ma profonde reconnaissance.

L'IRD, Institut Français de Recherche pour le Développement. Sans l'appui de cet institut, notre travail n'aurait pu voir le jour. Que l'IRD soit ici sincèrement remercié pour, non seulement l'appui financier et scientifique fourni lors de cette thèse, mais aussi pour le travail exemplaire de coopération développé en Bolivie, qui permet de contribuer au développement scientifique de ce pays.

L'UMSA (Universidad Mayor de San Andres), qu'elle soit ici remerciée pour l'appui donné aux travaux de recherche conduits au sein de sa structure, en espérant que mon travail puisse servir dans un futur proche au rayonnement institutionnel et à celui des autorités.

Nous tenons également à remercier tous les organismes qui permirent que cette thèse s'effectue dans les meilleures conditions possibles, en particulier au Fonama, et l'IFS pour l'appui financier manifesté et particulièrement au groupe ethnique Chacobo pour la confiance déposé aux chercheurs et la transmission de ses savoirs.

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION ET RAPPELS FONDAMENTAUX**A. PALUDISME**

1. Cycle évolutif des <i>Plasmodium</i> adaptés à l'homme	11
1.1. Cycle chez l'homme	14
1.1.1. Cycle exo-érythrocytaire	14
1.1.2. Cycle érythrocytaire	14
1.2. Cycle chez le vecteur	17
2. Répartition géographique	18
2.1. Le paludisme dans le monde	18
2.2. Le paludisme en Bolivie	19
3. Lutte antipaludique et résistance aux traitements	23
3.1. Stratégies successives de lutte	23
3.2. Chimiorésistance	25
3.3. Les mécanismes de résistance	28

B. ANTIPALUDIQUES D'ORIGINE VEGETALE 29

1. Substances naturelles introduites en thérapeutique	29
1.1. Quinquina	30
a) Situation géographique	31
b) Étude chimique	31
c) Propriétés	32
1.1.1. Quinine	32
a) Structure	33
b) Relation structure-activité	33
c) Mécanisme d'action	34
d) Activité antiparasitaire	35
e) Usages cliniques	35
1.1.2. Quinidine	37
1.1.3. Cinchonidine	37
1.1.4. Quinimax®	38
1.2. <i>Artemisia annua</i>	38
a) Situation géographique	39
b) Différentes espèces	39
c) Ses propriétés	40
d) Étude chimique de la plante	40
1.2.1. Artémisinine	40
a) Structure	41
b) Relation structure-activité	41
c) Mécanisme d'action	42
d) Activité antiparasitaire	43
e) Problème de recrudescence	44
f) Résistance	45
g) Usages cliniques	45
1.2.2. Dihydroartémisinine	46
1.2.3. Artéméther	47
1.2.4. Artééther	49

1.2.5. Artélinatate ou acide artélinique	50
1.2.6. Artésunatate ou acide artésuniquique	51
2. Recherche de nouveaux antipaludiques d'origine végétale	54
2.1. Criblage de plantes	54
2.2. Alcaloïdes	55
2.2.1. Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques	58
2.2.2. Naphthylisoquinoléines	60
2.2.3. Alcaloïdes aporphiniques	60
2.2.4. Autres alcaloïdes	62
2.3. Terpènes	65
2.4. Quassinoides	68
2.5. Quinones	70
2.6. Autres métabolites antipaludiques	70
2.7. Plantes synergisant, potentialisant et antagonisant l'effet de drogues conventionnelles	75
2.7.1. Tétrandrine	75
2.7.2. Phaéanthine	76
2.7.3. Flavones	76
2.7.4. Alcaloïdes des quinquinas	77
2.7.5. Plantes et composés malgaches	78
2.7.6. L'ajoène	80
2.7.7. La berbamine	80
2.7.8. <i>Nectandra salicifolia</i>	81
2.7.9. <i>Salacia kraussi</i>	81

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A. ETUDES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET ISOLEMENT DE LA (-) -ROEMREFIDINE	86
1. Ethnobotanique / ethnopharmacologie	86
2. Ethnobotanique appliquée à une ethnie: les Chacobos	87
2.1. Description de la région d'étude	88
3. Méthodologie de terrain	89
3.1. Parcelle permanente et enquêtes	89
3.2. Collecte dans différents sites écologiques	90
4. Utilisation des plantes par les Chacobos	90
5. Critères de sélection des plantes qui ont été soumises à l'étude	91
5.1. Utilisation traditionnelle	91
5.2. Critères bibliographiques généraux, données collectées sur ordinateur (NAPRALERT, MEDLINE et autres) et citation dans les pharmacopées ou les inventaires nationaux ou régionaux	92
5.3. Critères d'approvisionnement	92
6. Extraits végétaux	93
6.1. Monographies des plantes sélectionnées	94-109
6.2. Préparation des extraits bruts	110
7. <i>Sparattanthelium amazonum</i> Martius	110
7.1. Revue de la Famille des <i>Hernandiaceae</i>	110
7.2. Description botanique et classification	111

7.3. Utilisation médicinale de <i>Sparattanthelium amazonum</i>	112
8. Isolement de la (-)-roemréfidine	112
B. MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET DES PRODUITS PURIFIES	
1. Souches de <i>Plasmodium</i> utilisées	113
2. Culture in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>	114
3. Synchronisation	115
3.1. Concentration des formes jeunes: synchronisation au D-sorbitol	115
3.2. Concentration des formes âgées par flottation	116
4. Microméthode radioisotopique	117
5. Méthode visuelle	118
6. Test de potentialisation	119
6.1. Isobogrammes	120
6.1.1. Interprétation d'un isobogramme	120
6.1.2. Index de potentialisation du pouvoir schizonticide de la chloroquine "activity enhancement index" ou AEI	121
7. Test de perméabilité membranaire	121
8. Le test suppressif de 4 jours	123
9. Évaluation de la toxicité cellulaire <i>in vitro</i> au moyen de la méthode à la Sulforhodamine B (SRB)	123
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
Article 1. The search of natural bioactive compounds in Bolivia. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used Traditionally by the Chacobo. <i>J. Ethnopharmacol.</i> . 69:127-137 (2000).	127
Article 2. Antimalarial activity and cytotoxicity of (-) Roemrefidine isolated from the stem bark of <i>Sparattanthelium amazonum</i> , <i>Planta Medica</i> . 65 : 1-2 (1999).	132
Article 3. In vitro antimalarial activity and chloroquine potentiating action of some aporphine alkaloids (2000)	134
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
CHAPITRE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par un protozoaire du genre *Plasmodium* et transmise par un vecteur du genre *Anophèle*. Elle est actuellement et sans aucun doute, une des maladies transmissibles responsable de la plus grande morbidité au monde. Le nombre de pertes humaines, les incapacités de travail ainsi que le coût des programmes de contrôle et de traitements médicaux sont énormes. Aucune guerre dans l'histoire n'a provoqué autant de préjudices à l'humanité.

Le problème aggravant une situation dévastatrice est l'apparition rapide de souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux différents antipaludéens courants ainsi que le développement chez les moustiques vecteurs de résistances aux insecticides.

Dans l'attente de la mise en place de nouvelles campagnes de lutte antivectorielle et de la mise au point d'un vaccin efficace et bon marché, la seule alternative de contrôle de cette parasitose reste le développement de médicaments.

Une des plus grandes avancées dans le traitement de la malaria a été la découverte, par les indigènes d'Amérique du sud, de l'utilisation de l'écorce du quinquina pour combattre les fièvres (**Kelner 1999**).

La thérapeutique antimalarique a progressé lentement jusqu'à la fin des années 30. Des recherches réalisées simultanément en Allemagne (**Mietsch et al., 1930**), aux États-Unis (**Coatney 1963 ; Wiselogle 1946**) et en France (**Schneider 1951**) ont permis la synthèse de la mépacrine, de la quinacrine, de la primaquine, des biguanides et surtout des amino-4-quinoléines.

Cette dernière famille de médicaments dont le plus utilisé est la chloroquine, remarquable par son innocuité et son efficacité, a révolutionné le traitement du paludisme, dans les années 1940 à 1950. La chloroquine a été utilisée en traitement de masse de même qu'en prophylaxie et sa distribution a été associée à la lutte systématique contre les vecteurs du paludisme par pulvérisation de D.D.T. (dichloro-diphényl-trichloroéthane, insecticide organochloré).

Dans les années 60, la communauté scientifique était persuadée que ces traitements allaient permettre l'éradication du paludisme. Malheureusement, alors que le

problème semblait être en régression dans de nombreux pays, des cas de résistance à la chloroquine étaient rapportés en Asie (**Farinaud et al., 1954**) et en Amérique latine (**Moore et al., 1961; Young et al., 1971**). Aujourd'hui, la résistance a une extension mondiale.

Tout cela stimula donc la recherche de nouvelles molécules antipaludiques soit par synthèse ou soit par extraction à partir de sources végétales. Au cours des 40 dernières années, la recherche de nouvelles drogues, menée notamment par l'Institut de Recherche Walter Reed de l'armée américaine a conduit à tester plus de 300.000 composés susceptibles d'agir sur les souches de *Plasmodium falciparum* à partir de noyaux connus, comme les dérivés arylméthanol, donnant notamment naissance à la méfloquine en 1971 (**Ohnmacht et al., 1971**) et à l'halofantrine en 1972 (**Colwell et al., 1972**).

D'autre part, l'herboristerie traditionnelle est le fournisseur de composés incontournables comme la quinine qui est encore actuellement au premier plan de la thérapeutique dans les cas de polychimiorésistances. Il en est de même pour l'artémisinine, extraite du Qinghao (*Artemisia annua*) de la pharmacopée chinoise, qui constitue un outil majeur du traitement antimalarique, même si elle présente une demi-vie très courte qui contrebalance sa très grande rapidité d'action (**Vial et al., 1994**).

Une alternative à la découverte de nouvelles molécules actives est la recherche de molécules susceptibles d'inverser la résistance de *Plasmodium* à l'égard de molécules utilisées classiquement en thérapeutique. Cette nouvelle démarche s'applique également dans le cadre de la prévention de la résistance et constitue une tendance récente dans la chimiothérapie de la malaria (**Peters 1990**). Par exemple, les antagonistes des canaux calciques (**Kyle et al., 1990**), certains antidépresseurs tricycliques synthétiques, (**Bitonti et al., 1988**), certains antihistaminiques (**Basco et al., 1991a**), certains anticancéreux (**Basco et al., 1994c**) et certains composés de plantes (**Rasoanaivo et al., 1994, 1998**) ont permis la réversion de la résistance à la chloroquine in vitro.

Par ailleurs, l'association de molécules synergiques reste le moyen le plus satisfaisant de retarder l'émergence de résistance. Actuellement il y a cependant peu de données sur l'activité potentialisatrice, sur la chloroquine, de composés issus de végétaux.

Nos travaux se sont intéressés à cet aspect, dans le cadre des recherches de nouvelles molécules d'origine naturelle, possédant une activité antiparasitaire et potentialisatrice présumée sur le paludisme, la leishmaniose et la maladie de Chagas. Ces recherches ont été menées à l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude à La Paz (I.B.B.A. Faculté de Médecine de L'Université Mayor de San Andrés) en collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D. anciennement ORSTOM) en Bolivie, ainsi qu'au laboratoire d'Immunologie et Parasitologie du Professeur Jean Marie Bastide de la Faculté de Pharmacie de L'Université de Montpellier I.

Les plantes qui ont fait l'objet de notre étude, sont issues de la pharmacopée traditionnelle d'Amazonie Bolivienne où vivent différents groupes ethniques qui connaissent bien leur environnement naturel. À travers un travail multidisciplinaire, nous avons évalué l'activité antipaludique de centaines de plantes utilisées par différents groupes ethniques comme les Chacobos (**Muñoz et al., 2000**).

Dans le premier chapitre de ce travail, nous présentons un rappel sur le paludisme, une revue des principales classes d'antiparasitaires d'origine végétale, actifs sur cette maladie, est ensuite développée. Nous y présentons également l'ethnie Chacobo ainsi qu'une révision de la famille des Hernandiacees.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons notre approche méthodologique.

Un troisième chapitre est consacré à la présentation et discussion de nos résultats obtenus à partir :

- D'études effectuées sur les plantes présumées antiparasitaires sélectionnées à partir des pharmacopées traditionnelles des populations de la région d'Alto Ivon (Chacobos) (**Muñoz et al., 2000**) ;

- D'études par fractionnement biodirigé d'une des plantes les plus actives utilisée en médecine traditionnelle, *Sparattanthelium amazonum* Martius (Hernandiaceae). Cette étape a conduit à l'obtention et l'identification d'un alcaloïde de type aporphinique: la roemréfidine qui a fait l'objet d'une étude antimalarique in vitro et in vivo et d'une étude de cytotoxicité. (**Muñoz et al., 1999**);

- D'études de douze alcaloïdes analogues. Leur activité antimalarique intrinsèque a été évaluée in vitro ainsi que l'activité de leur association avec la chloroquine par la méthode des isobogrammes (**Muñoz et al., 2000**).

Ce travail veut être une contribution à la rationalisation des connaissances traditionnelles sur les plantes médicinales en vue de l'intégration de ce savoir dans les systèmes de santé des pays en voie de développement.

RAPPELS FONDAMENTAUX

A. PALUDISME

Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* appartenant à la famille des Sporozoaires et à l'ordre des Haemosporidae et transmis par un moustique, l'anophèle femelle.

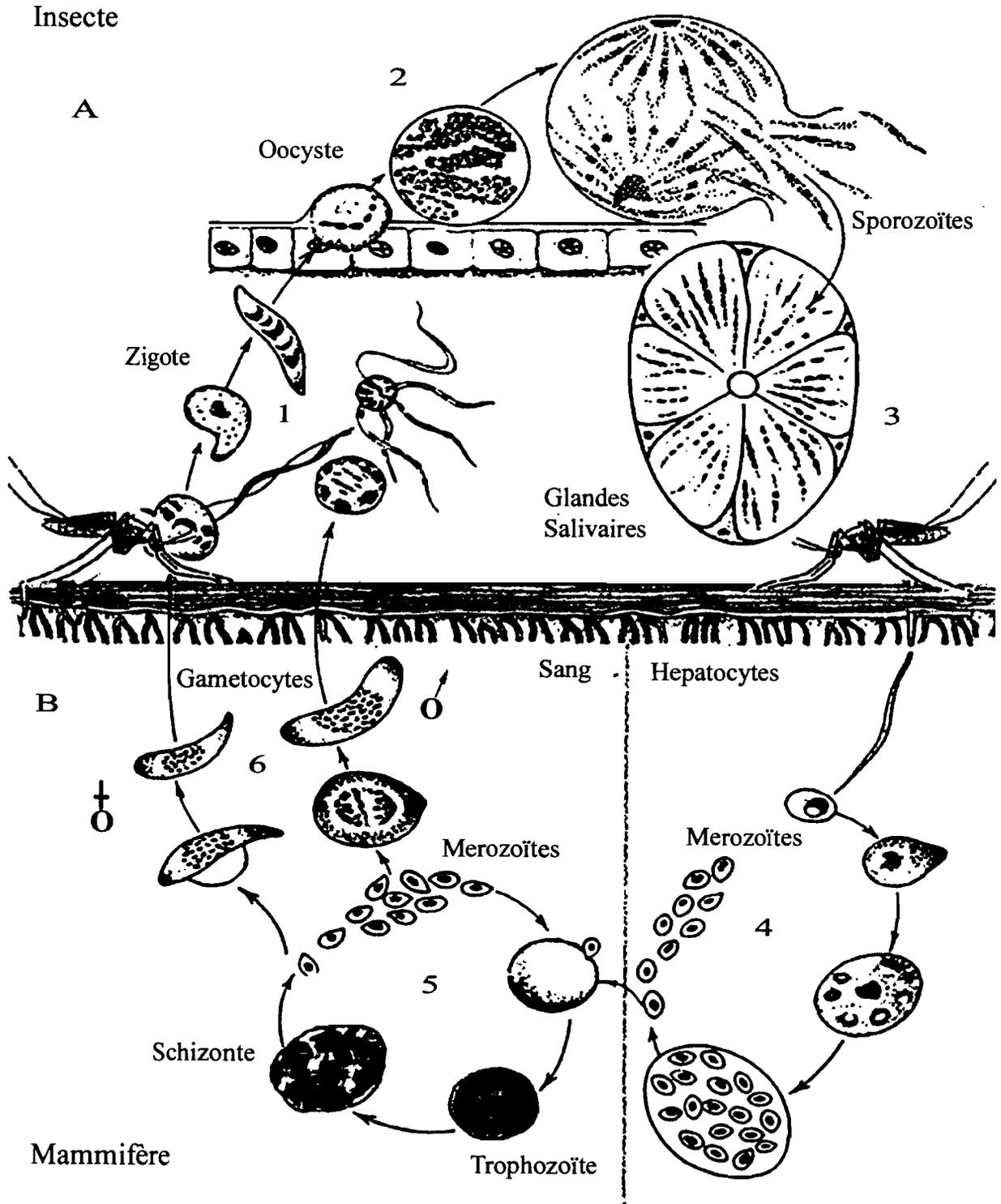
Le paludisme est responsable de symptomatologies variées, dont le principal signe est une fièvre intermittente, liée à l'éclatement des corps en rosaces, qui libère dans le torrent circulatoire des métabolites parasitaires dont le pigment malarique ou hemozoïne qui se comporte comme une substance pyrogène. La fièvre est accompagnée de céphalées et d'une sudation intense en fin d'épisode fébrile. Une anémie est présente et résulte avant tout de la lyse des hématies parasitées. Une splénomégalie et une hépatomégalie sont habituelles au bout d'un certain temps d'évolution, elles témoignent d'une hyperactivité et de la congestion de ces organes. Le tableau clinique est superposable pour les quatre espèces de *Plasmodium* responsables des paludismes humains (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax*). Seul *P. falciparum* donne des accès pernicioeux ou neuropaludismes qui entraînent un taux de mortalité compris entre 20 et 50% même si le malade reçoit des soins de qualités dans un centre de réanimation intensive (**Warell, 1992**).

1. CYCLE EVOLUTIF DES *PLASMODIUM* ADAPTES À L'HOMME

Parmi plus de 100 espèces de *Plasmodium* répertoriées, seules 4 sont rencontrées chez l'homme : *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* et une autre espèce commune à l'homme et au singe : *P. malariae*. Ces 4 espèces plasmodiales présentent un cycle évolutif similaire comportant peu de différences d'une espèce à l'autre. Deux hôtes successifs (**Figure N°1**) sont nécessaires à l'accomplissement du cycle : l'homme, hôte intermédiaire hébergeant la

multiplication asexuée ou schizogonie du parasite et le moustique, hôte définitif chez lequel s'effectue la multiplication sexuée ou sporogonie.

FIGURE 1 : CYCLE EVOLUTIF DES *PLASMODIUM* ADAPTES A L'HOMME



1.1. Cycle chez l'homme

Le cycle chez l'homme comporte deux étapes qui sont toutes les deux des multiplications asexuées ou schizogonies. La première se déroule dans les hépatocytes (schizogonies exoérythrocytaires) et la seconde dans les hématies (schizogonies érythrocytaires).

1.1.1. Cycle exo-érythrocytaire (Fig. 1-C)

Au cours de la piqûre, le moustique femelle infesté injecte avec sa salive des centaines de sporozoïtes qui ne restent dans la circulation sanguine qu'une demi-heure. Ils gagnent rapidement toutes les cellules de l'organisme, seuls ceux qui pénètrent dans les hépatocytes via les cellules de Kupffer poursuivront le cycle. Néanmoins, cette étape n'est peut-être pas nécessaire ; en effet il a été démontré que les sporozoïtes pouvaient infecter directement des hépatocytes in vitro (**Mazier et al., 1984**).

Une série de divisions nucléaires puis cytoplasmiques assure la formation des schizontes exoérythrocytaires, l'éclatement de l'hépatocyte hôte libéré de nombreux mérozoïtes: 10000 (*P. falciparum*), 30000 (*P. vivax*) dans la circulation sanguine. Le laps de temps écoulé entre la piqûre infestante et l'apparition des mérozoïtes dans les érythrocytes est la période prépatente. Sa durée moyenne dépend de l'espèce plasmodiale : 5,5 jours dans le cas de *P. falciparum* à 15 jours pour *P. malariae*. Dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*, un stade intra hépatocytaire particulier au niveau du foie a été identifié, le stade hypnozoïte. Il s'agit d'une forme uninuclée qui reste au repos pendant des périodes

variables pour ensuite reprendre le cycle intrahépatique, ce qui s'exprime par des rechutes cliniques.

1.1.2. Cycle érythrocytaire (Fig.1-A)

Dans le sang s'effectue le cycle asexué érythrocytaire qui est la seule partie symptomatique de la maladie. Les mérozoïtes libérés dans le sang après la rupture de l'hépatocyte vont immédiatement envahir les érythrocytes. Le processus de pénétration fait intervenir une série d'étapes complexes qui dure 30 secondes à une minute. Les mérozoïtes vont se fixer à la surface de l'hématie sur des récepteurs spécifiques puis pénétrer dans l'érythrocyte. Ces récepteurs sont des glycophorines et en particulier l'acide sialique (**Jakobsen et al., 1998**). Des études initiées il y a deux décades environ, ont établi que la glycoprotéine membranaire de l'érythrocyte portant les épitopes antigéniques Fya, Fyb et Fy6 du groupe sanguin Duffy est un récepteur crucial pour les mérozoïtes de *P. vivax* et de *P. knowlesi* (**Barnwell et al., 1998**). Le mérozoïte se réoriente ensuite pour présenter son pôle apical et déverse le contenu des organites apicaux, micronèmes et rhoptries. La membrane de l'hématie s'invagine. Une fois le parasite à l'intérieur du globule rouge, l'anneau se referme, la membrane érythrocytaire retrouve sa continuité et le parasite se retrouve alors dans une vacuole: la vacuole parasitophore. Les granules denses du mérozoïte excrètent leur contenu. Une hypothèse postule la persistance d'un canal parasitophore allant de la vacuole parasitaire à la membrane externe de l'hématie, ce qui permettrait des échanges directs entre le parasite et le plasma (**Pouvelle et al., 1991**). Plusieurs antigènes parasitaires jouent un rôle important dans la pénétration. Quatre protéines ont été décrites à ce jour sur la superficie des mérozoïtes de *P. falciparum*, et sont

appelées Merozoïte Surface Protein, MSP -1 (**Miller et al., 1993**), MSP-2 (**Clark et al., 1989**), MSP-3 (**Oeuvray et al., 1994**) et MSP - 4 (**Marshall et al., 1997**)

Le mérozoïte se différencie alors en une forme appelée anneau (ring) comportant, après fixation et coloration sur frottis mince, une bande étroite cytoplasmique, circulaire, entourant une vacuole et un noyau foncé donnant à ce stade la forme caractéristique d'une bague à chaton. Le parasite se développe en même temps que la vacuole se résorbe et qu'apparaissent dans le cytoplasme des grains de pigments résultant de la dégradation de l'hémoglobine grâce à des protéases spécifiques. La digestion de l'hémoglobine altérée conduit à la production d'hémozoïne (**Sherman 1968**) qui permet l'élimination par polymérisation, la ferriprotoporphyrine IX (**Chou et al., 1980**). C'est le stade trophozoïte.

Les trophozoïtes augmentent alors de taille (2 à 3 μm) et accroissent leur contenu en ADN, puis le noyau commence à se diviser. Cette division nucléaire se poursuit jusqu'à maturité du parasite, c'est la schizogonie. Après 3 à 5 divisions nucléaires successives, de 8 à 32 mérozoïtes selon les espèces vont s'individualiser et aboutir finalement à une forme caractéristique en rosace. La durée du cycle intraérythrocytaire varie selon les espèces de 48 heures (*P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*) à 72 heures (*P. malariae*). Après maturation des schizontes, il y a éclatement des hématies et libération des mérozoïtes qui peuvent infester d'autres hématies et recommencer un nouveau cycle. Chez le sujet impaludé, une synchronisation des cycles amène, 6 à 10 jours après le début de la phase sanguine (et des symptômes), à une périodicité des accès fébriles contemporains de la rupture des schizontes.

Après plusieurs cycles schizogoniques érythrocytaires, des stades pré sexués apparaissent: les gamétocytes (femelles) et gamétocytes (mâles). La nature précise du stimulus conduisant à la gamétogenèse est encore inconnue et le délai nécessaire et la

maturation des gamétocytes varie selon l'espèce (11 jours pour *P. falciparum*, 2 à 3 jours pour les autres espèces parasites de l'homme).

1.2. Cycle chez le vecteur (Fig. 1-B)

La poursuite du développement des formes sexuées ne peut s'accomplir qu'après leur ingestion par l'anophèle lors de son repas sanguin. Elles commencent alors leur cycle sporogonique. Les gamétocytes femelles s'échappent rapidement des globules rouges et se transforment en macrogamètes dans l'intestin moyen du moustique. Le noyau des gamétocytes mâles subit une série rapide de divisions nucléaires pour former 8 noyaux fils. Des prolongements filamenteux sortent du microgamétocyte (exflagellation). La fécondation du macrogamète s'effectue alors. Les noyaux fusionnent (amphimixie) pour former un oeuf diploïde: le zygote qui se transforme en une forme mobile appelée ookinète. Celui-ci traverse l'épithélium digestif de l'anophèle et va s'entourer d'une paroi épaisse et subir une méiose, le transformant en élément haploïde (oocyste). Le noyau subit alors de très nombreuses divisions à l'issue desquelles jusqu'à 10000 sporozoïtes vont s'échapper de l'oocyste. Ces sporozoïtes gagnent la lumière des glandes salivaires. Lors de la piqûre de l'anophèle, les sporozoïtes inoculés débiteront un nouveau cycle chez un nouvel individu (**Botello et al 1995**).

2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

2.1. Le paludisme dans le monde

Actuellement, la maladie est endémique dans près de 100 pays. Elle est présente sur le continent Africain, en Amérique du Sud et Centrale, en Asie, en Océanie, en Haïti, à Saint Domingue et en Turquie. Au début des années 90 on estimait que 300 à 500 millions de personnes présentaient chaque année les symptômes cliniques du paludisme et que la maladie faisait 1,5 à 2,7 millions de morts (**Foster et al., 1998**). La mortalité est retrouvée principalement en Afrique sub-saharienne, où l'on compte 90% du nombre total de victimes. Environ 2,6 milliards de personnes sont exposées aux risques d'infestation paludéenne, soit environ 55% de la population mondiale (**Spencer et al., 1986; Trigg et al., 1998**). La létalité du paludisme est très difficile à établir ; elle varie considérablement en fonction de facteurs épidémiologiques, de la génétique du parasite et des hôtes. La géographie physique, l'économie et les sociétés influent largement sur cette maladie. Le milieu naturel façonne les conditions de contamination, mais celles-ci peuvent être modifiées par l'activité humaine (urbanisation, travaux agricoles, migrations) mais également par des perturbations climatiques ou des catastrophes naturelles. La réceptivité individuelle et/ou familiale et la vulnérabilité en rapport avec un faible niveau socio-économique sont les deux principaux facteurs liés directement à l'hôte intermédiaire (**Carme 1995**). Le parasite intervient selon son degré de virulence et, vraisemblablement, l'importance du nombre d'inoculation (**Greenwood et al., 1991**). Son devenir dans l'organisme est tributaire du niveau de prémunition du sujet, lui même dépendant de l'importance et de la régularité de la transmission (**Carme 1995**).

2.2. Le 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 km² (8.232.881 d'habitants); et présente trois zones géographiques nettement distinctes

1. le bloc andin: correspond à la partie occidentale, occupe le tiers du pays avec une altitude ne descendant pas au-dessous de 3000 m. Les températures y sont basses et l'humidité relative incompatible avec la transmission palustre.

2. Les immenses plaines tropicales : comprennent les plaines amazoniennes basses et humides au nord où règnent pluies et fleuves en abondance, des températures compatibles avec la persistance de la transmission de la malaria tout au long de l'année et une flore et une faune exubérantes formant la forêt macrothermique, habitat du vecteur *Anopheles darlingi*.

Au sud, s'étendent les plaines sèches avec une pluviométrie faible, une végétation de type xérophile, de petits cours d'eau formant des retenues où vient s'abreuver le bétail. La transmission est de type saisonnier et le vecteur est *A. pseudopunctipennis*.

3. les vallées inter-andines: c'est une zone intermédiaire entre le bloc andin et les plaines basses qui s'échelonne entre 2500 et 300 m au-dessus du niveau de la mer. Le climat est compatible avec la transmission palustre puisque les températures oscillent entre 18° et 25°C ; idéal pour la biologie du vecteur *A. pseudopunctipennis*. La transmission est de type saisonnier (saison des pluies d'octobre à janvier) mais aussi en dehors de cette période puisque les fleuves forment d'innombrables gîtes à moustiques sur tout le front subandin.

La malaria à *P. falciparum* en Bolivie oscille entre 3 et 25% du total de la transmission nationale. C'est un vrai problème de santé publique dans les régions

amazoniennes comprenant les régions : Pando, Riberalta, Guayaramerín, Magdalena et une partie de Santa Cruz

La malaria à *P. vivax* en Bolivie est prédominante puisqu'elle représente entre 75 et 97% du problème global. Sa distribution, comprend les régions citées plus haut plus Cochabamba, La Paz, Chuquisaca, Tarija et Potosi (**Figure N°2**).

La zone d'endémie du paludisme en Bolivie couvre 75 % de la superficie du pays (821.346 Km²), englobant une population à risque de 3 millions d'habitants.

En 1997, 51.478 cas ont été rapportés, 46.097 (89.5%) correspondant à *P. vivax* et 5.381 (10.5%) à *P. falciparum* (Figure 2). En 1998, 74350 cas ont été signalés, ce qui montre que la situation épidémiologique de la malaria en Bolivie, actuellement est la plus critique des dernières quarante années (**MSPS, 1998**).

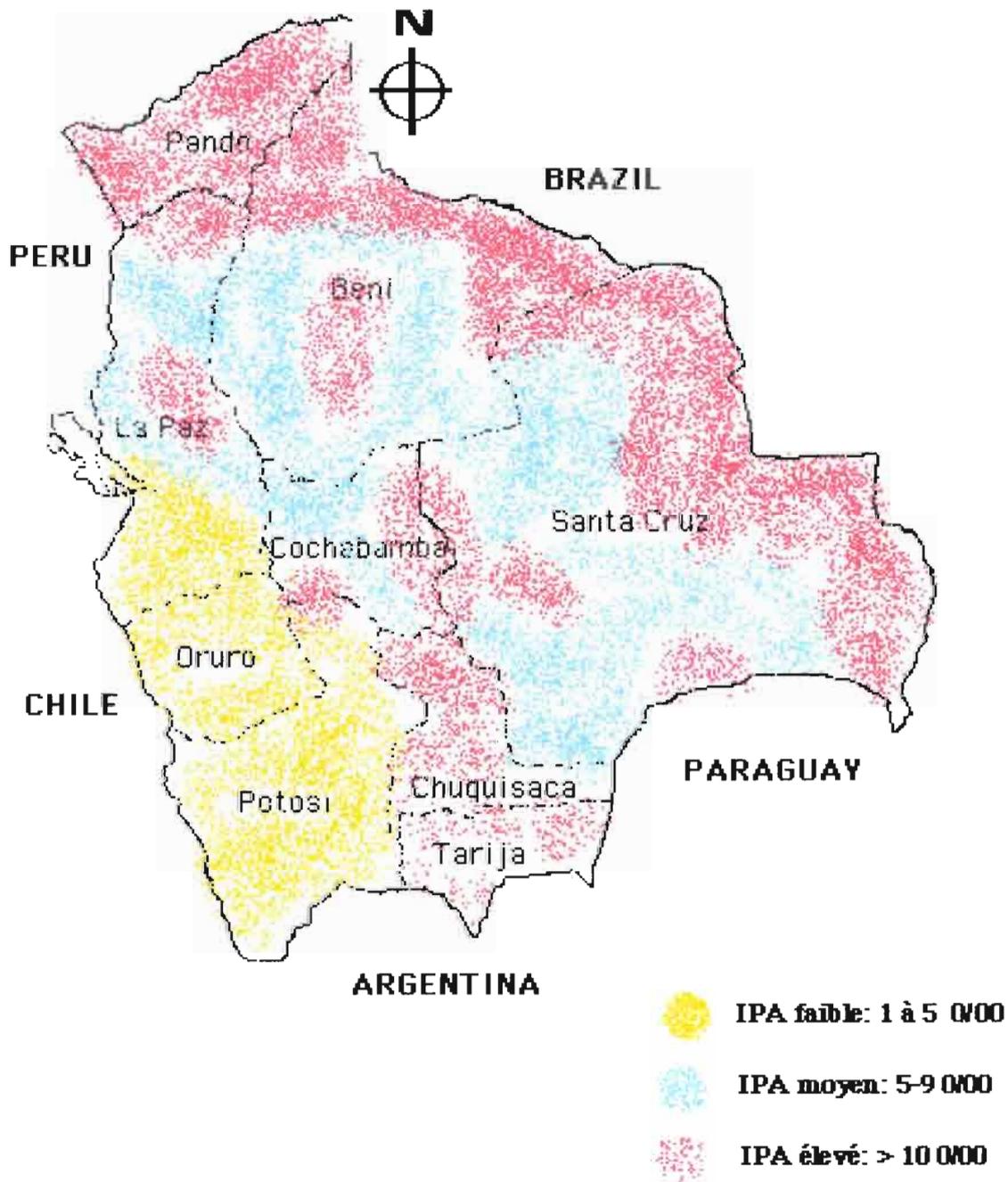
Les conditions socio-économiques désastreuses, les habitations précaires, les migrations constantes de populations en quête de travail, la précarité des méthodes de protection contre les vecteurs (appui financier limité du pouvoir central) sont autant de facteurs qui favorisent la transmission. De plus, l'automédication à des doses inadaptées ou encore, les durées de traitement insuffisantes, favorisent la recrudescence des cas et l'émergence de souches résistantes.

En 1997, dans le district de Santé de Riberalta 21 décès ont été déclarés, il est fort probable que la mortalité soit beaucoup plus élevée surtout dans les zones amazoniennes du Pando, mais les données chiffrées sont inexistantes (**MSPS, 1999**).

En Amérique Latine, des échecs au traitement par la chloroquine ont été reportés très tôt dans la littérature (**Mabertis, 1960, Moore et al., 1961, Wernsdorfer et al., 1980**). Au Brésil, où 70% de cas de malaria se concentrent dans les états Amazoniens de Rondônia et Pará, des cas de multirésistances sont décrits (**Couto et al., 1993**).

De même, en Bolivie, des cas de *P. falciparum* chloroquinorésistant, ont été relevés à Guayaramerín ville frontière avec l'état Brésilien de Rondônia (**Avila, 1993**).

FIGURE 2 : DISTRIBUTION DU PALUDISME EN BOLIVIE (1999)



3. LUTTE ANTIPALUDIQUE ET RESISTANCE AUX TRAITEMENTS

3.1. Stratégies successives de lutte

En mai 1955, la Huitième Assemblée Mondiale de la Santé, décide de lancer une campagne d'éradication mondiale du paludisme fondée sur l'utilisation à grande échelle du D.D.T., pour l'élimination des anophèles, et d'antipaludéens de synthèse pour le traitement de la maladie et l'élimination du parasite chez l'homme (Trigg et al., 1998). Des progrès considérables sont accomplis en quelques années. Mais l'apparition de la résistance des moustiques aux insecticides et les résistances des parasites aux principaux antipaludiques ont rendu caduc ce programme. Ces deux facteurs majeurs ont contribué à la détérioration de la situation du paludisme durant les vingt dernières années.

Dans les années 80, devant la détérioration de la situation, tous les organismes nationaux ou internationaux prônent une politique antipaludique plus modeste. Cette politique est limitée à une stratégie considérant l'éradication comme un but ultime et le contrôle de la maladie comme un objectif plus réaliste. En 1992 une conférence interministérielle sur le paludisme a adopté la déclaration mondiale sur la lutte antipaludique initiant une stratégie mondiale de lutte antipaludique. Cette stratégie a pour objectif de :

- i) prévenir la mortalité et de réduire la morbidité en assurant le diagnostic et le traitement du paludisme symptomatique,
- ii) d'abandonner la chimioprophylaxie de masse
- iii) contrôler, voire interrompre, la transmission par le recours à la lutte antivectorielle.

Ce combat contre l'anophèle doit se développer au niveau communautaire, dans les villages, entre autres par le recours à des moustiquaires imprégnées d'insecticides rémanents (pyréthrinoides). Néanmoins **Koffi et al., (1999)**, mettent en évidence des cas de résistance du moustique à la perméthrine et à la deltaméthrine.

Cette nouvelle stratégie suppose le renouvellement de l'arsenal thérapeutique qui devient progressivement défaillant. Aujourd'hui, les antipaludiques d'origine naturelle sont encore efficaces. Le quinquina et ses alcaloïdes demeurent des antipaludiques majeurs de l'urgence et de la gravité. Plus récemment le qinghaosu et ses dérivés (artémisinine, artéether, artésunate et artémether) ont été utilisés avec succès. De nombreuses recherches sont menées afin de sélectionner de nouvelles plantes susceptibles d'avoir une bonne activité antimonique et capable d'enrichir les capacités thérapeutiques (**Mukherjee 1991**).

Quant à l'immunoprévention, un vaccin polyvalent, la Spf66, qui associe des antigènes de sporozoïte et du stade érythrocytaire, a été élaboré en Colombie (**Patarroyo et al. 1988**). D'après les premiers essais, dans les régions endémiques d'Amérique et d'Afrique, des résultats encourageants ont été enregistrés, malheureusement **Nosten et al., (1996)** ont montré récemment l'inactivité de ce vaccin en clinique humaine.

Amador et al., (1992), ont décrit un vaccin antimérozoïte synthétique à partir de polymères de peptides qui a démontré un effet protecteur chez le singe.

L'idéal serait sans doute d'avoir un vaccin combiné qui inhiberait tous les stades. Cependant, la difficulté de produire un vaccin monovalent provient de la grande complexité antigénique des *Plasmodium*, (**Howard 1987**) et l'immunoprotection paraît irréalisable dans l'immédiat avant au moins dix ans (**Le Bras et al., 1998**).

Dans différents pays en voie de développement, les malades utilisent des préparations de plantes comme adjuvant du traitement à la chloroquine. Les termes classiques de synergisme, additivité, antagonisme, sont utilisés pour interpréter les

isobogrammes en fonction de la forme de la courbe : concave lorsqu'il y a potentialisation de l'action des deux drogues, convexe dans l'antagonisme; elle se confond avec la diagonale s'il y a additivité.

3.2. Chimiorésistance

La chloroquine, synthétisée en 1937 par les chimistes de Bayer et largement utilisée depuis 1947, était presque l'antimalarique idéal du fait de sa bonne activité, de sa tolérance et de son faible coût. La chloroquino-résistance de *Plasmodium falciparum* est apparue vers les années 60, simultanément dans deux foyers situés, l'un en Amérique, l'autre en Asie. A partir de cette date et progressivement jusqu'à 1985, *P. falciparum* est reconnu moins sensible (RI), résistant (RII) ou très résistant (RIII) à la chloroquine dans différentes zones endémiques (WHO, 1988). Les pays de zone endémique sont répartis en 3 groupes : le pays du groupe 1 où il n'y a pas de chloroquinorésistance rapportée à *P. falciparum* ; groupe 2 où une chloroquinorésistance est présente; les pays du groupe 3 où la prévalence de la chloroquinorésistance et de la multirésistance est élevée (Figure N°3).

Le problème de la chloroquinorésistance se complique encore par l'émergence de la chimiorésistance aux autres composés antipaludiques comme la quinine. Les premières infections résistantes à cette drogue ont été décrites en 1908 au Brésil dans la région de la haute Amazonie (Couto et al., 1908 ; Peters 1987). Cette résistance est d'évidence très lente à apparaître et limitée à l'Amazonie et aux jungles d'Asie du sud-est, reste le plus souvent circonscrite à ces zones (Le Bras et al., 1998).

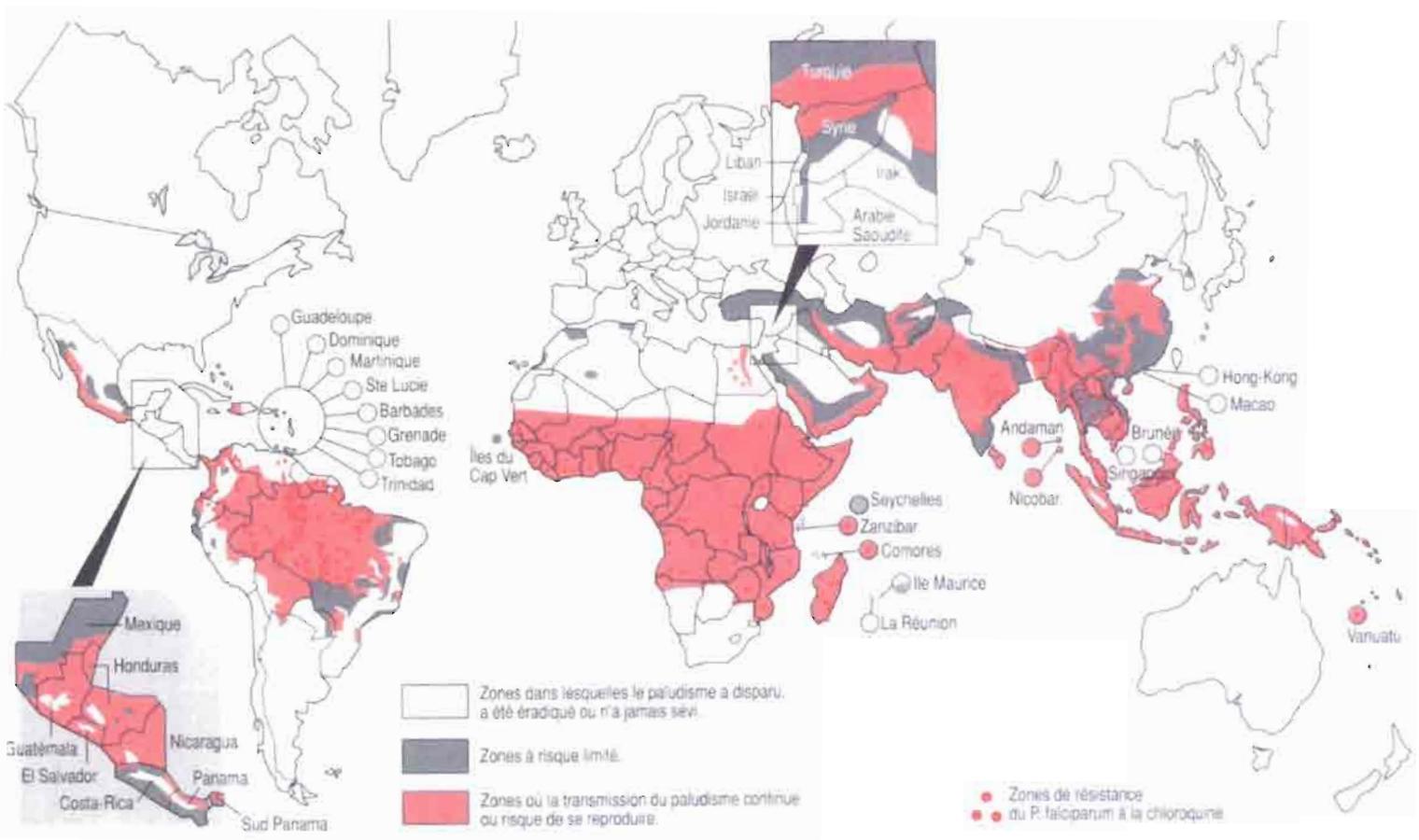
La résistance à l'amodiaquine a généralement suivi la chloroquinorésistance, en restant à une prévalence et à un niveau inférieur (Le Bras et al., 1986).

Les résistances à la pyriméthamine et au proguanil apparaissent très vite, en n'importe quel lieu, dès lors qu'ils sont utilisés pour la prophylaxie collective; elle peuvent être d'emblée d'un niveau très élevé, mais la diffusion régionale paraît très limitée. L'activité de la pyriméthamine en Indochine est quasi nulle, très diminuée en Amazonie et l'on observe une diminution rapide de son efficacité en Afrique. Une résistance croisée entre proguanil et pyriméthamine a été décrite (**Le Bras et al., 1998**).

La résistance à la méfloquine et à l'halofantrine a été associée à la surexpression du gène pfMDR1 (**Wilson 1993**). La méfloquino-résistance été décrite en Thaïlande et s'étend aux zones frontière de ce pays.

Ces dernières années, plusieurs cas de résistance de *P. vivax* à la chloroquine, à la primaquine ou à la méfloquine ont été signalés (**Savioli et Al., 1985 ; Rieckmann et al., 1989 ; Murphy et al., 1993**).

**FIGURE 3 : REPARTITION MONDIALE DU RESISTANCE A
PLASMODIUM FALCIPARUM (1997)**



3.3. Les mécanismes de résistance

La chloroquine est une base faible qui s'accumule dans la vacuole digestive du parasite selon un gradient de pH. Elle inhiberait la digestion de l'hémoglobine et la polymérisation de l'hème en hémosoïne non toxique pour le parasite (**Fitch, 1998**). Les autres amino-4-quinoléines et les amino-alcools agiraient aussi comme la chloroquine.

Différentes hypothèses expliquent le phénomène de la résistance, comme par exemple, la présence d'une perméase dans la membrane vacuolaire (**Warhurst, 1986, Krogstad et al., 1987**) en quantité supérieure pourrait expliquer l'augmentation de l'efflux de chloroquine. **Krogstad et al., (1987), Ginsburg (1988, 1990a)** imputent la résistance au pH vacuolaire plus alcalin chez *P. falciparum* chloroquinorésistant, due à la déficience des pompes à protons qui maintiennent en équilibre le pH vacuolaire.

Pour expliquer l'efflux de chloroquine une hypothèse a été avancée selon laquelle la chloroquine se lierait à une ou plusieurs glycoprotéines de transfert. Une glycoprotéine de 170 kDa (Pgp 170) a été identifiée dans les cellules résistantes. Le gène codant pour la glycoprotéine s'appelle gène MDR1 (multidrug resistant). Celui-ci induirait la formation de canaux dans la membrane de la vacuole digestive par laquelle est expulsée la chloroquine.

Chez des souches de *P. falciparum* multi-drug resistant, deux gènes MDR appelés Pfmdr-1 et Pfmdr-2 ont été identifiés. Une Pgp appelée Pgh-1, est codée par le gène Pfmdr-1 présent sur le chromosome 5. La participation d'un système MDR a également été mis en évidence dans la résistance à la méfloquine et à la quinine (**Roninson 1992**).

Su et al., (1997), Basco et al., (1999) pensent que le gène cg2 est lié à la résistance à la chloroquine qui code pour une protéine CG2 qui agirait par un mécanisme différent.

B. ANTIPALUDIQUES D'ORIGINE VÉGÉTALE

Depuis des millénaires, les plantes sont une source de médicaments, soit sous la forme de préparations traditionnelles ou comme principes actifs isolés (**Farnsworth et al., 1985a**). Aux États-Unis de 1959 à 1980, 25% des prescriptions dispensées par les pharmacies contenaient des extraits de plantes ou principes actifs préparés à partir de plantes (**Farnsworth et al., 1976 ; 1984**). En 1980, les consommateurs nord américains ont payé environ 8 milliards de dollars pour des prescriptions contenant des principes actifs issus de plantes (**Farnsworth et al., 1985b**). Par ailleurs, plus de 1 milliard de personnes vivent dans un état de pauvreté absolue et plus de 80% de la population mondiale s'appuient seulement sur un système de médecine traditionnelle, basée essentiellement sur l'utilisation de plantes médicinales (**Phillipson 1994**). L'O.M.S., qui depuis 1970 a fait un inventaire des plantes médicinales connues et utilisées dans 90 pays, en a dénombré environ 20.000 (**Vigneau 1985**).

La plupart des pays ont des ouvrages étendus sur la description de plantes médicinales. La Chine en particulier compte environ 230 monographies détaillées sur des plantes utilisées communément et pour chaque monographie est décrit : la pharmacologie, la toxicologie, ainsi que l'usage clinique et les effets secondaires (**Chang et al., 1986-1987**).

Il existe déjà plusieurs banques de données régionales ou autres sur les utilisations des plantes médicinales. L'une des plus riches et des plus importantes est NAPRALERT (raccourci pour Natural Products Alert) du College of Pharmacy, University of l'Illinois - Chicago – USA. Plus de 152 genres végétaux sont recensés actuellement dans ce programme de collecte de données comme ayant des vertus antipaludéennes (**Phillipson et al., 1994**).

De cette façon, on peut dire que la conjonction de la richesse de la nature et les connaissances traditionnelles des êtres humains peut aider la science moderne à concevoir de nouveaux médicaments (**Sauvain 1997**). La tendance, depuis quelques décennies, a été de simplifier le médicament le plus possible, c'est pourquoi un bon nombre d'entre eux sont constitués par une seule molécule chimique généralement de synthèse. Ce progrès scientifique a conduit pendant longtemps à une relative négligence de la médecine traditionnelle qui cependant connaît de nos jours un regain d'intérêt (**Vigneau 1985**).

L'importance du règne végétal dans la thérapeutique antimalarique est bien illustré par des alcaloïdes quinoléiques tel que la quinine et des lactones sesquiterpéniques tel que l'artémisinine.

1. SUBSTANCES NATURELLES INTRODUITES EN THERAPEUTIQUE (Fig. N° 4)

1.1 Quinquina

Une des plantes qui a provoqué un grand enthousiasme en Europe d'abord et dans le monde entier ensuite, est certainement le quinquina. Dès le début de la conquête espagnole le quinquina a attiré l'attention d'un grand nombre. Une information volumineuse sur la recherche, les usages, les intérêt économique, politiques et scientifiques est disponible sur le genre *Cinchona*, de la famille des Rubiacées.

a) Situation géographique

Les arbres ou arbustes à quinquina sont originaires, à l'état sauvage, de la Cordillère des Andes où ils poussent en zone tropicale à une altitude comprise entre 1500 et 3000 mètres, sur le versant oriental humide. Cependant, récemment, un groupe de chercheurs a montré la présence d'arbres du genre *Cinchona* à des altitudes beaucoup plus basses, 200 à 300 m. Ces arbres ont un contenu pauvre en quinine mais riche en d'autres alcaloïdes quinoléiques (cinchonine, cinchonidine) (**Rea et al., 1993**).

Les pays anciennement producteurs sont la Colombie, l'Equateur, le Pérou et la Bolivie. Les quinquinas furent introduits, dans la deuxième moitié du XIXème siècle, dans différentes régions montagneuses humides, à Java, en Inde, à Ceylan et plus récemment en Afrique tropicale (Guinée, Cameroun, Congo, Kenya, Tanzanie) et à Madagascar. Il existe aussi des cultures dans les pays d'origine et en Russie (Caucase) (**Perrot et al., 1971**).

b) Étude chimique

Les écorces sèches de l'espèce *Cinchona ledgeriana* Moens issues des plantations contiennent jusqu'à 13,5% de quinine et un peu moins de 1,5% d'autres alcaloïdes.

35 alcaloïdes ont été décrits dans l'écorce de quinquina. La majorité possède un noyau quinoléine, certains cependant ont un noyau de type indole (**Hofhinz et al., 1984**).

Les quatre alcaloïdes majeurs sont la quinine, la quinidine, la cinchonine et la cinchonidine. Tous possèdent une activité antipaludique considérable, mais leur efficacité relative dépend de l'espèce de *Plasmodium*. Chez l'homme, l'activité peut se classer comme suit: quinidine > quinine > cinchonidine > cinchonine (**Hofhinz et al., 1984**).

c) Propriétés

Les tanins et les alcaloïdes donnent au Quinquina rouge des propriétés toniques, astringentes et apéritives (**Harant et al., 1980**). On lui reconnaît un effet analgésique ; anti-inflammatoire dans le domaine des crampes musculaires et des courbatures fébriles et un rôle de modérateur de l'excitabilité cardiaque. Mais le Quinquina est surtout connu pour son action fébrifuge dans toutes sortes de fièvres et surtout pour son action antipaludique.

1.1.1. La Quinine

L'écorce de quinquina fut introduite en Espagne par Juan de Vega au XVIIIème siècle, médecin du comte de Cinchon, ensuite en Italie puis en France pour le traitement des fièvres. A partir de son introduction en Europe, s'initie une recherche sur la dose adéquate à administrer, l'identification, la composition chimique et la classification botanique (**Bryskier et al., 1988**).

Pelletier et Caventou présentent leur célèbre mémoire sur l'isolement de la quinine (1), à partir de l'écorce de quinquina au cours de la séance du 11 septembre 1820 à l'Académie des Sciences de Paris (**Pelletier et al., 1820**). A partir de cette époque, la quinine est extraite de l'écorce de quinquina à l'état de sulfate, sel qui sert à la préparation industrielle de tous les autres sels de quinine. La structure chimique fut décrite tardivement (**Rabe 1908**). La synthèse est effectuée par Turner et Woodward (**Turner 1953**).

a) Structure

La quinine est un amino-alcool hétérocyclique dont la structure se caractérise par un noyau quinoléine substitué par un groupement méthoxy en 6 et un noyau quinuclidine porteur d'un groupement vinyle en 5. Les deux hétérocycles sont reliés par un chaînon hydroxyméthylène. Cet ensemble comporte quatre centres de chiralité dont la configuration est primordiale pour les relations structure-activité (**Lesieur et al., 1990**).

b) Relation structure-activité

- La juxtaposition de l'hydroxyle alcoolique et de l'atome d'azote quinuclidique est nécessaire à l'activité antipaludique, et les produits présentant la configuration érythro pour les deux carbones (C-8, C-9) possèdent la meilleure activité (**Thompson et al., 1972**).

L'activité antipaludique serait donc liée à la distance entre l'oxygène et l'azote ($<3 \text{ \AA}$), distance qui permettrait la formation de liaisons hydrogènes.

- La réduction de la fonction alcool supprime l'activité antipaludique (**Goodson et al. 1930**).
- L'absence du groupement vinyl ne modifie pas l'activité (**Prelog et al., 1941**).
- Le noyau quinoléine peut être substitué, sans modification notable de l'activité (**Rubstov et al., 1953**).
- Le groupement méthoxy en 6 n'est pas indispensable à l'activité.
- L'introduction d'un halogène (en particulier un chlore) en 6 ou 8 se traduit par une augmentation d'activité

- L'introduction d'un groupement phényl entraîne une augmentation d'activité par protection contre l'oxydation biologique de cette position. Cependant les phényl-2-quinolylamino-4 alcools sont très phototoxiques (**Lesieur 1990**).
- La substitution par un groupement trifluoro méthyle conduit à une augmentation de l'activité sans phototoxicité (méfloquine).

c) Mécanisme d'action

Son mode d'action a fait l'objet de nombreux travaux. Les érythrocytes parasités par *Plasmodium*, vont accumuler la quinine. Cette capacité du globule rouge parasité à concentrer la quinine est le phénomène de base qui explique sa sélectivité d'action sur les stades érythrocytaires. Les mécanismes précis responsables de cette capacité ne sont pas connus et l'on a évoqué plusieurs cibles spécifiques (**Basco et al 1994**).

Pour Fitch (**Fitch 1984 ; Fitch et al., 1983 ; Fitch et al., 1987**), les interactions entre la quinine et la ferriprotoporphyrine IX jouent un rôle important dans la concentration élevée et spécifique de la quinine, dans les érythrocytes parasités, aussi bien que dans la destruction du parasite. Cette hypothèse est fondée sur des observations qui indiquent que l'activité de la quinine est liée à digestion de l'hémoglobine et à la production d'hémozoïne (**Foley et al., 1998**).

Warhurst propose la théorie de la perméase, selon laquelle la molécule serait transportée à l'intérieur de la cellule parasitaire par l'intermédiaire d'un transporteur agissant sous l'influence d'un gradient de pH. La molécule interférerait avec le catabolisme lysosomal de l'hémoglobine, "affamant" le parasite en acide aminés essentiels pour sa propre biosynthèse protéinique (**Warhurst 1986**).

d) Activité antiparasitaire

La quinine est un schizonticide d'action rapide : elle agit sur les formes endoérythrocytaires asexuées (trophozoïtes et schizontes); elle est active sur les formes mûres du parasite, avec 80-100% d'inhibition du développement du parasite après 2 à 4 heures de contact (Skinner et al., 1996). Les formes jeunes sont particulièrement résistantes (Kuile et al., 1993).

La quinine n'agit pas sur les sporozoïtes. Elle a, de plus, une action faible sur les gamétocytes immatures, sauf dans le cas de *P. falciparum*. Elle n'a aucune activité sur les formes intra-hépatiques (Mapaba et al., 1995).

Les formations de rosettes (présentes lorsque le parasite est aux stades trophozoïte et schizonte) et les phénomènes de cytoadhérences sont considérés comme importants dans les processus pathologiques d'un accès pernicieux, et plus spécialement de la forme cérébrale de *P. falciparum*. L'étude *in vitro* et *in vivo* de l'activité antimalarique de la quinine sur la cytoadhérence et la formation de rosettes chez des malades atteints par *P. falciparum* a été menée. *In vivo*, le contact avec la quinine pendant 4 heures ou plus, réduit la formation de rosettes de plus de 50%, mais pas la cytoadhérence. *In vitro*, le contact avec la quinine au moins 8 heures, ne réduit pas la cytoadhérence ni la formation de rosettes (Udomsangpetch et al., 1996 ; Chotivanich et al., 1998).

e) Usages cliniques

Chaiwisut (1998) a comparé l'efficacité de la quinine et de l'artésunate sur des patients atteints de malaria sévère due à *P. falciparum*. Il n'y a pas eu de différence entre

les deux groupes concernant l'arrêt des fièvres et la mortalité. Le temps d'élimination des parasites a été significativement plus court pour le groupe traité à l'artésunate.

McGready et al., (1998), ont comparé les traitements à la méfloquine seule avec les traitements à la quinine seule ou la combinaison des 2 molécules sur 372 femmes enceintes thaïlandaises atteintes d'une malaria simple due à une souche de *P. falciparum* multirésistante.

Le traitement par la méfloquine échoua, l'élimination des parasites n'est retrouvé que pour 6% des patients au 7^{ème} jour et pour 28% au 42^{ème} jour. Concernant le traitement par la quinine, les résultats étaient de 4 et 23% respectivement.

Les pourcentages d'échecs sur les 117 femmes traitées pour recrudescence ont été élevés : 37% pour la méfloquine et 38% pour la quinine. On peut conclure que la méfloquine et la quinine qui sont les antimalariques usuels pour le traitement de malaria multirésistante sur les femmes enceintes n'ont donné qu'une réponse insatisfaisante sur cet échantillon quand elles sont utilisées seules.

Boulos et al., (1997), ont évalué l'efficacité de différentes thérapies pour le traitement du paludisme due à *P. falciparum* sur 484 patients de São Paolo au Brésil. La quinine a été utilisée seule à un dosage de 500 mg toutes les 8 h durant 7 jours ou durant 3 jours mais combinée avec 1,5g de sulfadoxine plus 50 mg de pyriméthamine en une seule prise. La quinine à 500 mg tous les 8 h durant 3 jours à aussi été combinée à de la tétracycline à 500 mg toutes les 8 h durant 7 jours. Le traitement s'est avéré satisfaisant pour 81% des patients, seuls 0,6% d'entre eux ont développé une résistance de type R2. Le plus haut pourcentage de résistance a été observé lorsque la quinine a été utilisée seule (23,1%) ou avec la sulfadoxine et la pyriméthamine (37%). La combinaison quinine-tétracycline fut la plus efficace avec 7,5% de résistance.

1.1.2. Quinidine

La quinidine (2) c'est révélée plus efficace que la quinine contre *P. falciparum in vitro* (Björkman et al., 1991) et chez les malades, par voie orale et parentérale (Miller et al., 1989). Elle peut être utilisée pour le traitement immédiat d'un accès sévère à *P. falciparum*, surtout dans les pays non endémiques où la quinidine peut être plus disponible (en raison de ses propriétés antiarythmiques) que la quinine. Elle est plus cardiotoxique que la quinine et nécessite donc une surveillance étroite de l'électrocardiogramme durant le traitement.

La quinidine conserve en Thaïlande une activité supérieure sur les souches de *P. falciparum* de sensibilité diminuée à la quinine (Phillips et al., 1985; Kain, 1993).

1.1.3. Cinchonidine

La structure a été décrite par Leers en 1852. Des études sur *P. falciparum in vitro* ont montré que la cinchonidine est la moins active des quatre alcaloïdes (Sowunmi et al., 1990). Son profil toxicologique, pharmacologique et sa cinétique sont mal connus.

La dose de cinchonidine (3) nécessaire pour traiter une infection due à *P. falciparum* ou à *P. vivax* est de 1.3 à 3 fois supérieure à celle nécessaire pour la quinine (Marshall 1945).

Were et al., (1997), ont extrait cet alcaloïde à partir de *Dendrosenecio kilimanjari* subsp. *cottonii*.

1.1.4. Quinimax®

Des mélanges des quatre alcaloïdes principaux du quinquina (quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine) sont utilisés en thérapeutique antimalarique (Quinimax®), en cas d'accès pernicieux ou en cas de résistance aux amino 4 quinoléines, ou en cas d'impossibilité d'utilisation de la voie orale.

Une étude clinique a été réalisée en double aveugle sur le Quinimax® intrarectal (à 20 mg/Kg puis 15 mg/Kg toutes les 8 h) comparé au Quinimax® intraveineux (8 mg/Kg en perfusion durant 4 h toutes les 8 h) durant 2 jours sur 76 enfants Nigérian atteints de paludisme cérébral à *P. falciparum*. 39 enfants ont été traités par suppositoires et 37 par perfusion. Ces traitements ont été suivis de chloroquine orale à 10 mg/Kg/jours durant 3 jours.

90% des enfants du premier groupe furent guéris contre 76% pour le second. Il a été conclu que le Quinimax® intrarectal peut être une alternative à l'administration intraveineuse lors d'attaques rapides de paludisme cérébral sur des enfants dans les zones rurales où la sécurité sanitaire d'une administration intraveineuse ne peut être garantie (Barenes et al., 1998).

1.2. *Artemisia annua* L.

Le genre *Artemisia* est l'un des plus répandu de la famille des Compositae. Il regroupe plus de 350 espèces (Tan et al., 1998).

Artemisia annua L., est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise depuis plus de 2000 ans. Dans la dernière édition de la pharmacopée chinoise de 1985, seule *Artemisia annua* L. est considérée comme étant le Qinghao (Armoise verte). Elle fut mentionnée pour

le première fois comme fébrifuge dans un document intitulé "Les 52 prescriptions" découvert dans la tombe du médecin Ma Wangdui (dynastie Han) datée de 168 ans avant J-C. Un célèbre traité rédigé par Li Shizhen et publié en 1596, le "Bencao gangmu", qui sert de référence pendant plusieurs siècles la mentionne également (Trigg 1989).

a) Situation géographique

Artemisia annua pousse naturellement dans les zones tempérées, au bord des fleuves sur des terrains vagues sablonneux ou rocaillieux. On la trouve dans le sud-est asiatique, en Chine, au Japon, en Corée, au Viêt-nam, en Turquie, en Afrique du Nord et Tropicale et en Europe (Angleterre, exYougoslavie, Allemagne, midi de la France). Sa culture a été introduite au Nord de l'Inde, en Australie, au Canada et aux U.S.A. (Delaveau, 1990 ; Guignard, 1994 ; Ulevelen et al., 1976).

b) Différentes espèces

L'activité antimalarique de trente espèces d'armoise a été testée sans succès. Les chercheurs américains ont échoués dans la détection d'artémisinine à partir *A. arbuscula*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. pontica*, *A. schmidviana* et *A. vulgaris* (Klayman et al., 1984). Des petites quantités d'artémisinine ont été mises en évidence dans *A. apiaceae*, *A. scoparia*, *A. abrotanum* et *A. caucasica* (Trigg 1989). Récemment dans *A. indica* Willd. furent découverts 4 composés dont les plus actifs sont les exiguaflavones A et B qui agissent sur la souche multirésistante K1 de *P. falciparum in vitro* (4,6 µg/ml et 7,1 µg/ml respectivement) (Chanphen et al., 1998).

c) Ses propriétés

Les tiges feuillées d'*A. annua* sont employées comme anticholérétique, bactéricide (Klayman et al., 1984), immunosuppresseurs (Tawfik et al., 1990) et principalement comme antipaludique (Basco et al., 1994)

d) Étude chimique de la plante

Dix-sept composés sesquiterpéniques ont été isolés et identifiés à partir des parties aériennes d'*A. annua*, seule l'artémisinine a une activité antipaludique. Dix-sept flavones méthoxylées ont été isolées et identifiées dans la plante. Quatre coumarines ont aussi été isolées de l'extrait brut. Par une hydrodistillation des parties aériennes séchées d'*A. annua* juste avant la floraison, une huile essentielle est obtenue avec un rendement maximum de 1,9%. Elle est constituée de 55% de monoterpènes et de 45% de sesquiterpènes (Acton et al., 1985 ; Brown, 1993 ; El-Ferally et al., 1989 ; Misra, 1986 ; Nair et al., 1986 ; Ranasinghe et al., 1993 ; Roth et al., 1987 ; Wei et al., 1992 ; Yang et al., 1995 ; Sy et al., 1998).

1.2.1. Artémisinine

En 1972, l'équipe de recherche de l'Institut de Pharmacologie de Shanghai a isolé l'artémisinine (4) à partir de la partie aérienne d'*A. annua*, (Klayman 1985).

a) Structure

L'artémisinine, est une lactone sesquiterpénique présentant les noyaux suivants:

- 1) le noyau cyclohexane,
- 2) le noyaux oxyhétérocyclique saturé
- 3) le noyau d-lactone.

Les cinq atomes d'oxygène se trouvent du même côté du plan formé par la molécule. Les atomes de carbone et d'oxygène sont séparés en alternance par une distance courte ou longue. Ces ponts C-O d'une distance alternante semblent jouer un rôle majeur dans la stabilité de la molécule et dans son activité antipaludique (**PNUD, 1981**).

La structure de qinghaosu ou artémisinine a été élucidée en 1973 (**Jeremic et al., 1973**) et sa synthèse réalisée simultanément par deux équipes. **Schmid et al. (1983)** ont transformé le (-)-isopulegol en artémisinine suite à 13 étapes de synthèse avec un rendement de 5%. Un groupe de l'Institut de Shanghai de chimie organique, aboutit au même résultat en partant de l'acide artémisinique avec un rendement de 0.24% (**Xu et al., 1983**).

Ces synthèses ne sont pas rentables dans le cadre d'une production d'artémisinine à grande échelle. Les intermédiaires de la synthèse de l'artémisinine sont toutefois utilisés pour la synthèse d'analogues relatifs ou de précurseurs radiomarqués. Ces composés sont un pré-requis pour les études pharmacocinétiques et métaboliques.

b) Relation structure-activité

L'étude des relations structure-activité du qinghaosu a mis en évidence l'importance de l'endopéroxyde dans l'activité antiplasmodique. L'absence de l'atome d'oxygène en

position 4 dans le noyau 1,2,4 trioxane annule l'activité antipaludéenne de l'artémisinine (Klayman, 1985).

c) Mécanisme d'action

Le mode d'action de l'artémisinine n'est pas élucidé. Plusieurs hypothèses sont avancées, telles que l'action au niveau de la membrane, l'inhibition de la synthèse des protéines, la libération de radicaux libres de l'oxygène et l'inhibition de l'influx de la L-glutamine.

Les membranes parasitaires chez *P. berghei*, *P. knowlesi* et *P. falciparum* sont modifiées ultrastructuralement par l'exposition à l'artémisinine (PNUD,1981a). La drogue se lie aux membranes parasitaires et se concentre à taux élevé dans les érythrocytes parasités, notamment au stade du trophozoïte âgé (Gu et al., 1984).

Gu et al., 1983 ont confirmé par la diminution d'accumulation d'isoleucine dans l'heure qui suit l'administration du médicament, que la première action exercée par l'artémisinine se situe au niveau de la synthèse de protéines chez *P. falciparum* in vitro.

Il est probable que le pont endoperoxyde joue un rôle important dans le mode d'action de l'artémisinine. La métabolisation de la drogue libère des radicaux libres de l'oxygène qui peuvent exercer un effet destructeur sur le parasite (Clark et al., 1983, Cumming et al., 1997).

La spécificité de l'activité schizontocide de l'artémisinine serait fondée sur la formation d'un complexe artémisinine-hème dans la vacuole digestive du parasite, le complexe produirait les radicaux libres dans le parasite (Meshnick et al., 1991, 1993 ; Zhang et al., 1992).

L'artémisinine et ses dérivés inhibent l'influx de L-glutamine dans les érythrocytes parasités par *P. falciparum in vitro* (Elford 1986).

L'artémisinine empêche le développement du stade anneau parasite au stade mature et empêche aussi la formation de rosettes et la cytoadhérence au capillaires (Chotivanich et al., 1998).

d) Activité antiparasitaire

Les chercheurs chinois ont démontré que l'artémisinine et plusieurs de ses dérivés sont actifs à des concentrations de l'ordre du nM *in vitro* contre *P. falciparum* (Lin et al., 1987). Ces études ont été confirmées par les chercheurs du Walter Reed Army Institute of Research. Les premières études *in vivo* ont montré que l'administration de 50 mg/kg d'artémisinine pendant 3 jours est efficace contre *P. berghei* (Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group, 1979). La dose inhibant de 50% le développement des parasites ou ED₅₀ est de 138,8 mg/kg. Une suspension huileuse injectée à la souris par voie intramusculaire a été plus active pour diminuer la parasitémie qu'une suspension aqueuse administrée par voie orale ou voie intramusculaire. (China Cooperative Research Group on Qinghaosu and its Derivatives as Antimalarials 1982).

Au niveau des interactions entre l'artémisinine et les autres drogues antimalariques, il a été observé un effet potentialisateur entre l'artémisinine et la méfloquine. Cet effet est retrouvé pour *P. berghei* et *P. falciparum in vivo* et *in vitro* (Chawira et al., 1986). De même, une potentialisation de l'activité de la tétracycline, de la spiramicine et de la primaquine par l'artémisinine sur *P. berghei* a été rapportée (Chawira et al., 1987). Les études menées par le Walter Ree Army Institute of Research sur *P. falciparum* ont montré que la chloroquine et la brucéine A (molécule isolée d'une Simarubaceae), antagonisent

l'action de l'artémisinine, tandis qu'une combinaison avec l'halofantrine, la quinine et la pyriméthamine mène à un effet additif sur l'activité de l'artémisinine (**WHO, 1986**).

L'artémisinine et ses dérivés sont actifs contre *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma japonicum in vivo* chez l'animal (**Sano et al., 1993; Xiao et al., 1989**). L'artémisinine est également active contre *Leishmania major* (**Yang et al., 1993**), *Toxoplasma gondii* (**Ke et al., 1990**) et *Pneumocystis carinii in vitro* (**Merali et al., 1991**) et *in vivo* (**Chen et al., 1994**).

Les dérivés de l'artémisinine présentent des activités immunosuppressives (**Chen et al., 1994; Tawfik et al., 1990**) et des potentialités anticancéreuses (**Lai et al., 1995**).

Les concentrations nécessaires pour l'ensemble des activités citées ci-dessus sont plus élevées que les concentrations antipaludiques efficaces. Il existe actuellement des programmes de recherche ayant pour but la synthèse de composés présentant des activités anti-infectieuses et anticancéreuses à partir des endopéroxydes (**Woerdenbag et al., 1993**).

e) Problème de recrudescence

Le problème rencontré avec l'artémisinine et ses dérivés est que lorsqu'ils sont utilisés lors de courtes périodes, par exemple moins de 5 jours, la disparition des parasites sanguins n'est que temporaire chez 50% des patients. Toutefois après 5 jours et surtout 7 jours de traitement une efficacité élevée est obtenue. Cela dit, la monothérapie de 5 jours ne semble pas atteindre 90% de guérison dans certaines régions (**McIntosh et al., 1998a**).

f) Résistance

Il n'a pas été rapporté de résistance *in vivo* à l'artémisinine et ses dérivés. Des tests en laboratoire ont montré une variation de sensibilité de ces drogues selon les isolats de *P. falciparum*, mais la relation avec un échec clinique n'est pas évidente (**Wongsrichanalai et al., 1997**).

Cependant, **Peters et al. (1999)** ont réussi à développer des niveaux de résistance modérés vis à vis de l'artémisinine au moyen d'une pression sélective sur *P. berghei* chloroquino-sensible et sur *P. yoelii* ssp. chloroquino-resistant et le Fenozan B07, ne développent pas dans ce modèle de résistance, ou à des niveaux très bas. De plus, on assiste à une réversion de la résistance lorsque la pression de la drogue est levée.

Des études de laboratoire ont montré que les souches résistantes à la méfloquine semblent moins sensibles à l'artémisinine, probablement du fait de leurs activités synergisantes (**Le Bras et al., 1998**). Ces observations ont été confirmées par des travaux sur le terrain (**Ekong et al., 1990**).

g) Usages cliniques

L'artémisinine, l'artéméther, l'artésunate et les métabolites dihydroartémisinine ont un mode d'action unique et en rien comparable aux autres antimalariques. Ces composés sont aussi très bien tolérés. Il n'y a pas de raison cliniques pour ne pas les combiner avec d'autres antimalariques à plus faible dose et sur une période plus longue, ce qui permettrait d'accroître leur efficacité et de retarder l'apparition de la résistance pour chaque composant. En cas de circonstances exceptionnelles (telle une réaction adverse envers

l'agent combinant) la monothérapie à l'artémisinine peut-être prescrite. Il sera toute fois recommandé un traitement effectif de 7 jours.

Dans les zones où la méfloquine est déjà donnée en première intention ou dans les zones où l'on pense la donner, l'artémisinine pourrait être prescrite en combinaison avec la méfloquine durant 3 jours.

Koopsmans et al. (1998), ont combiné les suppositoires d'artémisinine et la méfloquine. Ils ont utilisé 600 mg d'artémisinine suivis, après 24 heures, de 15 mg/kg de méfloquine, pour traiter un paludisme non compliqué due à *P. falciparum*. On atteint ainsi les concentrations sanguines thérapeutiques de l'artémisinine, et ce, en doublant la dose orale usuelle. Des études sur l'administration rectale, avec possibilité d'améliorer la biodisponibilité, sont encore nécessaires.

L'artémisinine et ses dérivés ne sont pas indiqués pour le traitement de malaria à *P. malariae*, *P. ovale*, ou *P. vivax* sensibles à la chloroquine.

1.2.2. La dihydroartémisinine

L'artésunate et l'artéméther (ou artélinat) sont rapidement transformés en dihydroartémisinine (5) (**Lee et al., 1990**). Ce métabolite actif est généralement présent en quantité proportionnelle aux quantités du composé mère (**Teja-Isavadharm et al., 1996**).

La dihydroartémisinine est une forme lactol ou hémiacétal des sesquiterpènes possédant une activité antipaludique élevée, elle est deux ou trois fois plus efficace que l'artémisinine sur *P. berghei* (**Peters et al., 1986**). Sur *P. falciparum in vitro*, elle est également supérieure à celle de l'artémisinine et de l'artééther. Cette molécule se concentre dans les érythrocytes parasités (**Gu et al., 1984**). Une forme orale de la dihydroartémisinine a récemment été introduite en thérapeutique (**Looareesuwan et al., 1996**).

Au Congo, l'efficacité et la tolérance clinique du Cotecxin® (la dihydroartémisinine) a été étudiée par **Mpandi et al., 1998**, sur des cas de malaria dus à *P. falciparum*. Sur les 37 patients contrôlés, tous ont été guéris.

La faible solubilité de l'artémisinine dans l'eau et les huiles, et l'instabilité de la dihydroartémisinine sont les 2 raisons majeurs qui ont amené les chercheurs à synthétiser des dérivés proches de ces substances.

Trois types de dérivés carboxylés ont été préparés à partir de la dihydroartémisinine: les éthers (artéméther et artééther), les esters comme l'artésunate, et les carbonates. Ils présentent des activités antipaludiques croissante décrites ici: artémisinine < dérivés éther < dérivés ester < dérivés carbonate (**Li et al., 1981**). Outre ces dérivés carbonylés, des dérivés aminés et aromatiques ont été synthétisés (**Lin et al., 1990**).

1.2.3. L'artéméther

L'artéméther (**6**) est l'éther méthylique liposoluble de la dihydroartémisinine.

Les dérivés éthers présentent les avantages à la fois d'une solubilité supérieure dans les huiles et d'une activité supérieure à l'artémisinine. Parmi les 32 dérivés examinés, le plus actif est l'arthéméther (a-méthyl-dihydroartémisinine).

Il est plus actif que l'artémisinine et la dihydroartémisinine sur les souches chloroquino-sensibles et chloroquino-résistantes de *P. berghei* et de *P. cynomolgi* (**Peters et al., 1986**). Sa demi-vie est de quatre heures (**Zhao et al., 1986**). Aucun effet toxique n'a été signalé chez la souris.

Des essais cliniques ont été effectués en double aveugle afin de comparer la sécurité et l'efficacité de l'artéméther et de la quinine. L'arthéméther a été administré par voie intramusculaire à une dose initiale de 3,2 mg/kg, suivie de 1,6 mg/kg par jour pendant 4

jours. La quinine a, elle, été administrée par voie intraveineuse, à une dose initiale de 20 mg suivie de 10 mg/Kg toutes les 8 h durant au moins 48 h, et oralement durant 7 jours. L'artéméther semble sûre chez les adultes mélanésiens et probablement aussi efficace que la quinine en intraveineuse pour le traitement du paludisme sévère ou compliqué dues à *P. falciparum* (Seaton et al., 1998). D'autres études effectuées en double aveugle sur des adultes vietnamiens (Hien et al., 1996), des enfants de Gambie (van Hensbroek et al., 1996) et du Kenya (Murphy et al., 1996) prouvent qu'il n'y a pas de différence de mortalité entre les groupes traités avec l'artéméther et ceux traités avec de la quinine (McIntosh et al., 1998b).

La combinaison d'artéméther ou d'artésunate avec la méfloquine augmente considérablement les taux de guérison en comparaison à l'utilisation de méfloquine seule.

L'artéméther ou l'artésunate ont été utilisés pour traiter des femmes enceintes thaïlandaises atteintes par une souche multirésistante de *P. falciparum*. Ces 2 drogues, seules ou combinées à de la méfloquine, ont été administrées entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois de grossesse. Elles ont été bien tolérées, sans aucun effet secondaire et avec une recrudescence de seulement 16%. Aucune anomalie congénitale durant l'année qui suivie, n'a été observée (Mc Gready et al., 1998b).

Le CGP 56697, un nouveau mélange oral d'artéméther à 20 mg et de Benflumétol à 120 mg en comprimé, a été testé en double aveugle en comparaison à la méfloquine à 250 mg en comprimé sur 252 patients adultes atteints de paludisme bénigne due à *P. falciparum*. La posologie du CGP 56697 était de 4 comprimés aux temps 0, 8, 24, 48 heures et celle de la méfloquine était de 3 comprimés initiaux puis de 28 h plus tard. Les taux de guérison au 28^{ème} jour avec le CGP 56697 ont été inférieurs (69,3% contre 82,4%). Cependant le CGP 56697 a été plus efficace si l'on considère les temps de disparition des parasites (43 h contre 46 h), de la fièvre (32 h contre 54 h) et des gamètes (152 h contre 331

h). Le CGP 56697 est donc efficace contre le paludisme du à des souches de *P. falciparum* multirésistantes de Thaïlande, mais un dosage plus élevé serait sans doute nécessaire pour augmenter les taux de guérison (**Looareesuwan et al., 1999**).

Il a aussi été prouvé que l'artéméther ou l'artésunate réduisent grandement la gamétocytémie (**Price et al., 1996**), donc pourrait diminuer la transmission.

On pense qu'un facteur important du développement de la malaria cérébrale est due à la formation de rosettes. **Chotivanich et al.**, ont démontré en **1998** que la formation de rosettes avec des GR non infectés de différents groupes sanguins provenant de patients atteints de paludisme non compliqué, est diminuée dans un délai de 2 h après un traitement avec l'artéméther et l'artésunate, et de 8 h après un traitement par la quinine.

1.2.4. L'artééther

L'artééther (7) est le b-éthyléther de l'artémisinine. Le substituant éthyl remplaçant le méthyl augmente la lipophilie du dérivé et pourrait être favorable à l'accumulation préférentielle du composé dans le cerveau (**Brossi et al., 1988**).

Les activités de l'artééther et de l'artéméther sont équivalentes *in vitro* sur *P. falciparum*; les deux dérivés sont deux fois plus efficaces que l'artémisinine (**Brossi et al., 1988**). *In vitro*, l'artééther et la méfloquine ou la quinine agissent en synergie contre une souche multirésistante de *P. falciparum* (**Ekong et al., 1990**).

Une dose inférieure ou un traitement plus court sont souvent accompagnés d'une rechute ou d'un échec thérapeutique. Depuis 1991, l'artééther est en phase initiale d'évaluation clinique. Des essais cliniques ont été effectués sur 50 patients, atteints de malaria sévère due à *P. falciparum*, traités avec l'artééther par voie IM (150 mg une fois par jour pendant 3 jours). Ces essais ont montré que les temps moyens de disparition sont

de 72 h pour la fièvre et de 2 jours pour les parasites. Une sortie rapide de coma (environ 18 h) a aussi été observée chez les patients atteints de malaria cérébrale. Au bout des 28 jours, 7 patients ont rechuté. Aucune toxicité n'a été observée sur la totalité des malades (**Sanjib Mohanty et al., 1997**). Ce schizonticide est également efficace sur un paludisme bénin .

1.2.5. L'artélate ou acide artélate

Contrairement aux dérivés éther précédents, les dérivés portant un groupe carboxylate lié à la dihydroartémisinine par l'intermédiaire d'alkyle éther se dissolvent mieux dans l'eau (**Lin et al., 1989**). Un de ces dérivés, l'acide artélate (**8**), est plus stable que l'acide artésunate (artésunate) dans une solution aqueuse. L'artélate est plus actif que l'artésunate et que l'artémisinine sur *P. berghei* chez la souris. Il est aussi actif que ces deux composés dans le modèle *in vitro* de *P. falciparum* (**Van Vianent et al., 1990**).

L'absorption et la distribution de l'artélate, après un administration intramusculaire ou orale de 10 mg/Kg sur des chiens et des rats, est rapide avec des demi-temps de distribution de 0,12 à 0,5 h et d'élimination de 2,6 à 6,4 h. La biodisponibilité par absorption orale est de 80 % chez le chien et de 30 % chez le rat, avec élimination via les urines et les selles. La dose létale est de 535 mg/Kg.

Sur les souris une dose intramusculaire multiple de 7 jours à 50 mg/Kg/jours d'artélate provoque des effets toxiques de type anorexie non sévère comparée à l'artésunate.

L'artélate est plus stable *in vivo* et *in vitro* que l'artésunate. Il peut être administré de différentes façons (intraveineuse, intramusculaire, orale). De plus, ce composé semble

avoir un profil pharmacocinétique et toxicologique plus favorable que les autres analogues courants de l'artémisinine sur de nombreuses espèces animales. Ceci en fait un excellent candidat pour la thérapeutique du paludisme (**Li et al., 1998 ; 1998b**).

1.2.6. L'Artésunate ou l'acide artésunique

Les dérivés esters de l'artémisinine se présentent majoritairement sous forme d'un épimère. Dans l'ensemble, ces dérivés possèdent une activité nettement supérieure à celle de l'artémisinine (**China Cooperative Research Group on Qinghaosu and its Derivatives as Antimalarials, 1982**). Le meilleur des esters, l'artésunate (**9**), est préparé comme un sel d'hémisuccinate. Il est soluble en solution aqueuse et administrable par voie intraveineuse. Cette propriété lui permet de diminuer la parasitémie rapidement chez les malades, même présentant un accès pernicieux. L'artésunate est à peu près cinq fois plus efficace que l'artémisinine sur les souches de *P. berghei* chloroquino-sensibles et chloroquino-résistantes et sur celles de *P. falciparum* chloroquino-résistantes (**Brossi et al., 1988**).

Cependant, l'artésunate est instable, il perd facilement le radical succinate par hydrolyse (après une semaine en solution aqueuse, à pH physiologique). De plus son activité pourrait être due à l'ester dérivé ou partiellement à son métabolite, la dihydroartémisinine (**Brossi et al., 1988**). La demi-vie de l'artésunate est extrêmement courte, de l'ordre de deux minutes chez les animaux (**PNUD, 1986**). L'artésunate est presque totalement transformé en dihydroartémisinine au bout de quelques minutes.

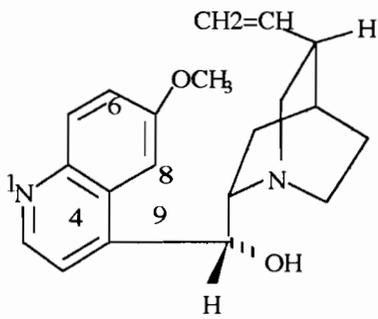
Des associations d'artésunate oral pendant 5 à 7 jours avec de la méfloquine aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant présentant des hyperparasitémies à *P. falciparum* non compliquées se sont montrées efficaces (**Prince 1998**).

De plus il y a des indications qui pourraient démontrer que l'association d'artésunate et de méfloquine a joué un rôle dans la diminution du développement de la résistance à la méfloquine en Thaïlande (**Prince et al., 1997**).

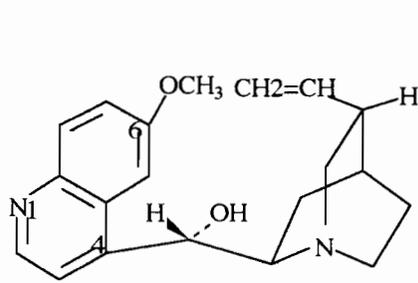
L'artésunate par voie intramusculaire (pour l'accès grave) ou intraveineuse (pour l'accès pernicieux) est plus efficace que la quinine par voie intraveineuse, mais aucune différence significative n'est observée entre ces deux antipaludiques pour la diminution de la durée du coma ou du taux de mortalité (**Hien et al., 1992**). Par contre, une étude clinique effectuée en Birmanie a démontré la supériorité de l'artésunate par voie intraveineuse associé à une prise de méfloquine par rapport à la quinine associée à la tétracycline pour réduire le taux de mortalité de l'accès pernicieux (**Win et al., 1992**). Cette dernière observation est corroborée par celle de **Chaiwisut et al., (1998)**.

Les essais initiaux en Thaïlande d'artésunate Rectocaps® à 200 mg ont été réalisés d'après le schéma posologique suivant: 1600 mg au total sur 3 jours et 1200 à 1600 mg au total en 60 h (**Looareesuwan et al., 1995, 1997**). De l'administration la plus fréquente dans les 24 h résulte une disparition des parasites mais il n'y a pas de changement concernant la disparition de la fièvre. D'après ces résultats et d'autres effectués au Myanmar, les Rectocaps® ont été bien tolérés et efficaces. Cependant, il n'a pas été déterminé si la dose et l'administration utilisées peuvent être optimisées.

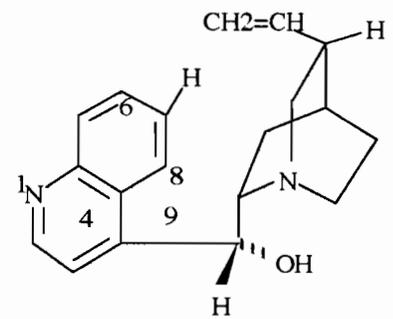
FIGURE 4 : SUBSTANCES NATURELLES INTRODUITES EN THERAPEUTIQUE



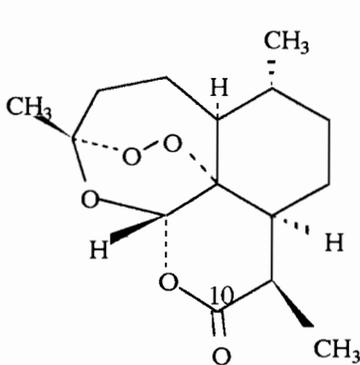
1. Quinine



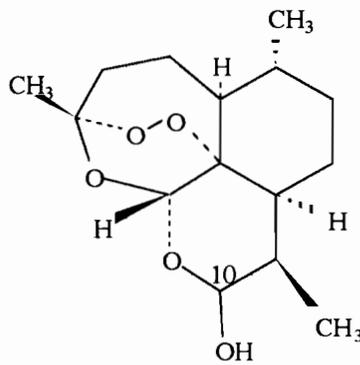
2. Quinidine



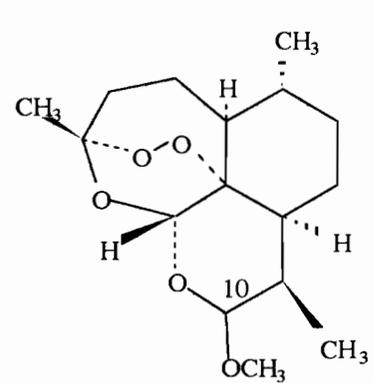
3. Cinchonidine



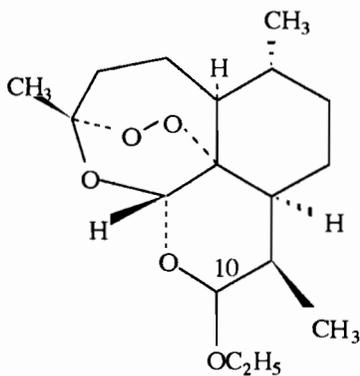
4. Artémisinine



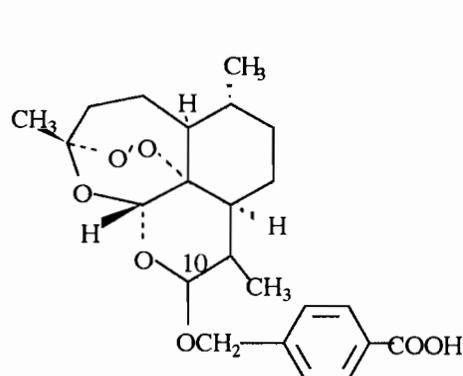
5. Dihydroartémisinine



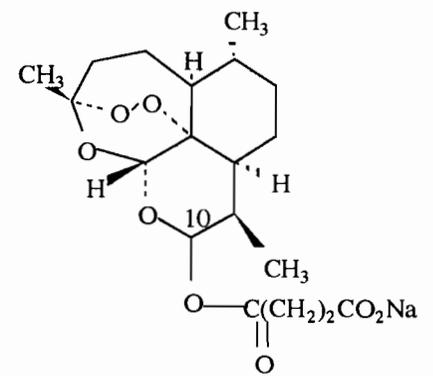
6. Artéméther



7. Artééther



8. Artélinate



9. Artésunato

2. RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTIPALUDIQUES D'ORIGINE VÉGÉTALE

(Fig. N° 5)

Les besoins en nouvelles molécules antipaludiques persistent, ce qui justifie l'intérêt de découvrir de nouveaux principes actifs à partir de plantes médicinales. De nombreux pays tropicaux possèdent leur propre liste de plantes natives utilisées pour le traitement de la malaria. Ces plantes servent souvent de point de départ à de nouveaux programmes de recherche.

En effet, face à l'extension des cas de résistances multiples aux traitements classiques, il s'avère nécessaire de mettre en oeuvre d'importantes recherches biologiques *in vitro* et *in vivo* pour évaluer puis étudier les propriétés antipaludiques de ces extraits végétaux dans la perspective d'une utilisation thérapeutique.

2.1. Criblage des plantes

Une analyse extensive de la littérature montre que ce sujet fait l'objet de nombreuses recherches.

Le plus grand criblage de plantes présumées antipaludiques remonte à une cinquantaine d'années (**Spencer et al., 1947**). Un grand nombre d'espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle comme fébrifuges dans le monde entier (plus de six cents plantes, représentant cent vingt six familles botaniques) ont été testées. Le choix des plantes a été fait en fonction de la littérature ethnobotanique de l'époque qui présentait deux inconvénients majeurs: l'absence d'herbiers de référence de collection et des études de terrain prenant en compte non pas un groupe culturel particulier mais le plus souvent un

pays tout entier. Ainsi la multiplicité et la variété des pharmacopées traditionnelles dans chaque pays étaient peu prises en considération (**Sauvain, 1989**). Des test *in vivo* ont été utilisés sur *Plasmodium cathemerium* chez le poulet et *P. lophurae* chez le canard. 68 espèces botaniques de la famille des Simaroubaceae ont été testées, de même que 44 extraits provenant de plantes de la famille des Amaryllidaceae. D'autres espèces végétales ont fait l'objet d'une évaluation biologique, notamment *Cornus florida* (Cornaceae), *Hymenocallis caribae* (Liliaceae), *Cooperia pedunculata* (Liliaceae), *Schultesia lisianthoides* (Gentianaceae), *Gentiana sp* (Gentianaceae), *Remijia peruviana* (Rubiaceae), *Eryngium foetidum* (Umbelliferae), *Datisca glomerata* (Datisceae), *Aristolochia sp.* (Aristolochiaceae) *Cissampelos pareina* (Menispermaceae) et *Croton sp.* (Euphorbiaceae). L'ensemble de ces données est encore utilisé pour le recensement des différentes espèces végétales employées dans d'autres pays (**Phillipson, 1986a**).

Weenen et al., (1990) ont montré à partir de 49 extraits de plantes utilisées en Tanzanie que les extraits de tubercules de *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae), des écorces de racines de *Hoslundia opposita* Vahl (Labiatae) et des écorces de *Lantana camara* L (Verbenaceae) sont actifs sur *P. falciparum*, souche K1 multirésistante avec des CI_{50} de 5-10 $\mu\text{g/ml}$.

Différents extraits organiques (éther de pétrole, dichlorométhane et méthanol) préparés à partir de neuf espèces différentes de *Uvaria* (Annonaceae) de Tanzanie ont été étudiés. De ces plantes, 17 métabolites possédant des structures de déhydrochalcones et de sesquiterpènes furent identifiés et les plus actives sont *U. lucida* ssp. *lucida* Benth et *U. scheffleri* Diels (**Nkunya et al., 1991**).

Un autre criblage important a été effectué par une équipe brésilienne (**Carvalho et al., 1991**), ces chercheurs ont préparé à partir de 48 plantes, 95 extraits bruts. 73 extraits provenaient de 33 plantes collectées au hasard et 22 extraits étaient préparés à partir de

plantes médicinales. Deux plantes collectées au hasard, *Vernonia brasiliiana* (Asteraceae) et *Eupatorium squalidum* (Asteraceae) et quatre plantes médicinales *Acanthospermum australe* (Asteraceae) *Esenbeckia febrifuga*, (Rutaceae) *Lisianthus speciosus* (Gentianaceae), *Tachia guianensis* (Gentianaceae) ont montré sur *P. berghei in vivo* une inhibition de 40-50% de la parasitémie à J5 à une dose de 1g/kg/4J. *V. brasiliiana* et *A. australe* se révélèrent actives sur *P. falciparum in vitro* (souche chloroquinorésistante BH2 26/86), avec une CI_{50} de 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Cette étude montre l'intérêt de l'ethnopharmacologie dans le choix des plantes dans la perspective d'un criblage antipaludique.

Pendant quatre ans, l'équipe scientifique de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées et celle de l'Institut de Médecine et d'Épidémiologie Africaines et Tropicales de Hôpital Claude Bernard, ont dénombré 251 plantes utilisées empiriquement pour combattre le paludisme à Madagascar. Ces travaux ont abouti à la sélection de 24 espèces végétales dans un premier criblage antipaludique et à l'isolement de plusieurs métabolites, parmi lesquels des alcaloïdes quinoléiques isolés de Rutacées et isoquinoléiques provenant de plantes de la famille des Menispermacées. Ces composés ont montré un profil d'activité antipaludique intéressant. D'autre part, cinq espèces de Ménispermacées malgaches ont été utilisées comme adjuvant de la chloroquine en médecine traditionnelle, néanmoins la plupart de ces plantes se sont révélées moins actives que la chloroquine (**Rasoanaivo et al., 1992**).

Gessler et al., (1994a, 1995a, 1995b, 1995c) ont publié des études qui montrent la perception et le traitement de la malaria par les guérisseurs traditionnels de différentes régions de Tanzanie. Les feuilles, les racines et les écorces de tiges de 43 espèces différentes de plantes ont été extraites par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et l'eau. Ensuite ces extraits ont été testés *in vitro* sur une souche chloroquino-sensible (NF54) et sur une souche K1 de *P. falciparum* multirésistante. Durant ce criblage, 37% des plantes

étudiées ont montré une CI_{50} inférieure à $10 \mu\text{g/ml}$ et 61% une activité modérée (CI_{50} comprise entre 10 et $49 \mu\text{g/ml}$). Parmi les extraits étudiés, le plus actif fut l'extrait d'acétate d'éthyle de l'écorce de tige de *Maytenus senegalensis* LAM (Celastraceae) ($CI_{50} = 0,16\mu\text{g/ml}$) sur la souche K1. L'administration de l'extrait d'acétate d'éthyle des écorces de racines à la dose de 500 mg/kg/4J par voie orale chez des souris infectées par *P. berghei* souche ANKA a permis une suppression de la parasitémie de 89,9% et a prolongé la survie des animaux de 4 jours. Ce résultat est modeste si on le compare à l'activité *in vivo* de la chloroquine.

Une autre étude de l'activité des plantes africaines (**Benoit et al., 1996a**) à partir de sept plantes fréquemment utilisées en Côte d'Ivoire testées sur une souche chloroquinosensible (F32) et sur une souche chloroquinorésistante (FcB1) a montré que seules *Combretum micranthum*, (Combretaceae), *Lippia multiflora* (Verbenaceae) et *Ximenia americana* (Olacaceae) présentent une activité supérieure à celle de *Azadirachta indica* (Meliaceae). Les valeurs de CI_{50} de ces extraits sont comprises entre $0,7 \mu\text{g/ml}$ et $6,25 \mu\text{g/ml}$. Les extraits du tubercule de *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae) utilisés dans le traitement du paludisme ont montré aussi une activité antimalarique *in vitro* supérieure à celle de *A. indica* (environ $1 \mu\text{g/ml}$) (**Benoit et al., 1995**).

16 extraits de quatre plantes médicinales du Kenya ont été préparés. Les extraits plus actifs tant sur les souches résistantes que sensibles de *P. falciparum* proviennent des feuilles de *Phyllanthus reticulatus* Poir. (Euphorbiaceae) et de *Suregada zanzibariensis* Baill (Euphorbiaceae) avec une $CI_{50} \leq 10\mu\text{g/ml}$ (**Omalulokoli et al., 1997**).

L'activité antiplasmodique de plantes médicinales de Malaisie a été étudié *in vitro* et *in vivo*. L'extrait chloroformique de *Andrographis paniculata* présentait une CI_{50} de 50

$\mu\text{g/ml}$, après 24 h d'incubation. Cette même espèce également montre une forte activité *in vivo* (**Rahman et al., 1999**).

Les plantes médicinales du Soudan furent également soumises à une étude d'activité antipaludique. Une forte activité sur des souches de *P. falciparum* a été observé pour la plupart de plantes appartenant à la famille Meliaceae.

Khaya senegalensis, *Azadiracta indica* et *Trichilia emetica* donnent des valeurs de CI_{50} inférieures à $5 \mu\text{g/ml}$. L'extrait de dichlorométhane de *Maytenus senegalensis* (Celastraceae) a montré une CI_{50} de $2.1 \mu\text{g/ml}$ (**El Tahir et al., 1999**).

La plupart des observations faites dans ces différents travaux montrent que les extraits des plantes utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de la malaria représentent une voie originale pour trouver de nouveaux agents sélectifs. Nous pensons que les extraits qui présentent une activité sur des souches chloroquinosensibles et chloroquinorésistantes et une faible CI_{50} sont des candidats potentiels à un nouveau traitement contre le paludisme.

2.2. Alcaloïdes

2.2.1. Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléines (BBIQ)

Les alcaloïdes bisbenzylisoquinoléines sont répartis principalement dans les Menispermaceae, les Ranunculaceae, les Berberidaceae, les Monimiaceae, les Annonaceae et les Lauraceae.

Les extraits du genre *Triclisia* (Menispermaceae) sont utilisés contre le paludisme en Afrique de l'Ouest (**Wang et al., 1985**). *T. Patens* de Sierra Leone, présente plusieurs alcaloïdes de type BBIQ. L'aromaline, la pycnamine et la phaéanthine (**10**) ont montré une

bonne activité antipaludique *in vitro* contre *P. falciparum*, la valeur de cette activité se trouvait entre 0.15 à 1.43 $\mu\text{g/ml}$ (Partridge et al., 1988).

L'isotétrandrine qui a été isolée de *T. dictyophylla* (diastéréoisomère de la phaéanthine) présentait une $\text{CI}_{50} = 0.07 \mu\text{g/ml}$ sur *P. falciparum* (Partridge et al., 1989).

Cyclea barbata (Menispermaceae) pousse dans l'est asiatique et est utilisée en Thaïlande pour le traitement des fièvres associées au paludisme. La tétrandrine (11) et quatre autres alcaloïdes BBIQ furent isolés à partir des racines, ils montrent une activité cytotoxique et antimalarique (Lin et al., 1993). La tétrandrine proposée comme antipaludique par Ye et al., (1989), est un énantiomère de la phaéanthine.

L'index thérapeutique de la tétrandrine n'est probablement pas très favorable au développement éventuel d'une drogue antipaludique, compte tenu de ses effets sur le système cardiovasculaire et de ses propriétés anticancéreuses.

Anherhofer et al., (1999) ont testé 53 alcaloïdes BBIQ sur des souches de *P. falciparum* chloroquinosensible et chloroquinorésistante. Parallèlement, ils ont évalué sa cytotoxicité sur des cultures cellulaires.

Ces alcaloïdes ont été isolés de *Cyclea barbata*, *Stephania pierrei*, *Stephania erecta* (Likhitwitayawuid et al., 1993a, b), *Pachygone dasycarpa*, *Cyclea atjehensis*, *Hernandia peltata*, *Curare candicans*, *Albertisia papuana* et *Berveris valdiviana*, les produits ont donné différentes valeurs d'activité antiplasmodiale. Pour la plupart de ces alcaloïdes, un certain grade de toxicité contre les cellules humaines KB a été observé. Cependant, plus de la moitié de ces composés évalués ont montré une activité antiplasmodique sélective sur des souches de *P. falciparum* chloroquinosensible et chloroquinorésistante.

Les alcaloïdes dont l'activité est la plus sélective sont: (-)-cycleanine (10), (+)-cycleatjehine (11), (+)-cycleatjehinine, (+)-malekulatine, (-)-repandine et (+)-temuconine. L'établissement de relations structure-activité est difficile dans cette famille d'alcaloïdes.

2.2.2. Naphthylisoquinolines

Triphyophyllum peltatum (Dioncophyllaceae) est utilisée en médecine traditionnelle de l'Afrique de l'Est et de l'Ouest pour le traitement des fièvres, du paludisme et d'autres affections.

De cette plante ont été isolés des alcaloïdes naphthylisoquinoliques qui ont montré une activité antipaludique *in vitro* sur des souches chloroquinosensible et chloroquinorésistante. Le dioncopeltine A (12), le dioncophylline A (13) et B (14) présentent une forte activité (0,063 – 0,860 $\mu\text{g/ml}$ sur la souche K1 et 0,021 – 1,443 $\mu\text{g/ml}$ sobre la souche NF54/64), Cette activité élevée peut s'expliquer par la position de l'oxygène et l'absence de méthyl sur l'azote tertiaire (François et al., 1994).

Les dioncophylline A et C ont aussi été testés *in vitro* sur *P. berghei* et présentent une $\text{CI}_{50} = 0,015\mu\text{g/ml}$ (François et al., 1996a).

Ces alcaloïdes sont donc un nouveau type de produit naturel, avec une activité antimalarique marquée, pour lesquels des études complémentaires sont nécessaires.

2.2.3. Alcaloïdes aporphiniques

Likhitwitayawuid et al. (1993b) ont montré que l'extrait éthanolique de *Stephania pierrei* Diels (Menispermaceae) a une CI_{50} de 0,136 $\mu\text{g/ml}$ sur la souche chloroquinosensible D-6 et une CI_{50} de 0,161 $\mu\text{g/ml}$ et sur la souche chloroquinorésistante W-2 de *P. falciparum*. A partir des tubercules de la plante ont été isolés 23 alcaloïdes isoquinoléines, 11 sont aporphiniques: (-)-asimilobine, (-)-asimilobine-2-O- β -D-glucoside, (-)-anonaine, (-)-isolaureline, (-)-xylopine, (-)-roemeroline, (-)-dicentrine, (-)-nordicentrine, (-)-phanostenine, (-)-cassithicine, (+)-magnoflorine. Ces alcaloïdes ont montré une activité

significative, néanmoins l'activité antipaludique est parallèle à la cytotoxicité, la seule exception est la (-)-asimilobine ($CI_{50} = 0,950$ y $0,470 \mu\text{g/ml}$ sur D-6 et W-2 respectivement), dont l'indice de sélectivité laisse présumer une séparation possible des deux propriétés biologiques.

De l'écorce de tige, des racines et des rameaux de *Nectandra salicifolia* (H.B.K.) Nees (Lauraceae) collectée dans la forêt humide du Costa Rica, ont été isolés 16 alcaloïdes dont 8 aporphiniques connus: (+)-boldine, (+)-isoboldine, (+)-lauroilsine [(+)-norboldine], (+)-norpurpureine, (+)-norisocorydine, (+)-isocorydine, (+)-laurotetanine, (+)-N-methylaurotetanine, qui présentent une CI_{50} comprise entre 1240 et 7150 ng/ml contre la souche chloroquino sensible D6 et une CI_{50} comprise entre 1680-4480 ng/ml contre la souche résistante W2 (Böhlke et al., 1996).

Dreyfuss et al., (1987) ont évalué l'activité antipaludique *in vivo* de 13 alcaloïdes isoquinoléiques par le test Renne sur des souris infectées par *Plasmodium berghei berghei*. Une absence d'activité significative de l'aporphine bulbocapnine a été observée.

Ont été isolés 8 alcaloïdes quinoliniques de *Stephania venosa* Spreng (Menispermaceae), une plante thaïlandaise utilisée comme tonique amer. Des 5 alcaloïdes aporphiniques isolés: stephanine, crebanine, sukhodianine, dehydrostephanine (15) et dehydrocrebanine, les deux derniers ont montré une CI_{50} voisine de celle de la chloroquine (40-70 ng/ml, respectivement). L'importance de la fonction 1,2 ethylendioxy, est soulignée et les auteurs suggèrent que le potentiel antimalarique de ce groupe puisse être augmenté par l'introduction d'une insaturation des C-6 et C-7 (Likhitwitayawuid et al., 1999).

2.2.4. Autres alcaloïdes

La fébrifugine (**16**) a été extraite de *Dichroa febrifuga* (Saxifragaceae), la plante étant utilisée en médecine chinoise comme fébrifuge. Son activité antipaludique a été mise en évidence dès 1946 et sa structure a été élucidée en 1952 (**Bryskier et al., 1988**). C'est un schizontocide puissant qui est actif sur tous les modèles expérimentaux de paludisme; son activité est plusieurs dizaines de fois supérieure à celle de la quinine dans l'infection du poulet par *P. gallinaceum*. L'usage chez l'homme infecté par *P. vivax* a été évalué. L'intolérance digestive observée lors de sa prise par voie orale n'a pas permis de continuer les essais, d'autres tests sur la souris ont montré également une toxicité hépatique (**Steck 1972**). De nombreux dérivés ont été synthétisés, permettant d'évaluer le rapport structure-activité, mais ils n'ont pas été développés.

Les extraits aqueux de racines de *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr (Asclepiadaceae) sont utilisés par des guérisseurs ghanéens dans le traitement du paludisme et dans les infections uro-génitales. La cryptolépine (**17**), la cryptolépine HCl et l'isocryptolépine sont des alcaloïdes isolés des racines, leur activité antimalarique a été confirmée *in vitro* et *in vivo*, les valeurs *in vitro* de la CI₅₀ se trouvant entre 0.0475 - 0.0858 µg/ml sur la souche F32 et de 0.075 - 0.14 sur la souche FcB1. Les études *in vivo* sur la souche *P. vinckei petteri* ont montré un DL₅₀ inférieur à 2,5 mg/Kg/4J et sur la souche *P. berghei* ANKA une DL₅₀ supérieure à cette valeur (**Grellier et al., 1996**).

Pogonopus tubulosus (D.C.) Schumann est une plante utilisée en Bolivie et dans toute l'Amérique du Sud dans le traitement du paludisme. Trois alcaloïdes, la tubulosine, la psychotrine, la cephaeline ont été isolés de cette plante. L'évaluation *in vitro* sur *P. falciparum* a montré que la tubulosine (**18**) (CI₅₀: 0,006 - 0,011 µg/ml) est plus active que la cephaeline et la psychotrine.

La tubulosine testée *in vivo* a une bonne activité sur des souris infectées par *P. berghei* (CI₅₀ = 0.45 mg/kg/4J) et *P. vinckei petteri* (CI₅₀ = 0.05 mg/Kg/4J) (**Sauvain et al., 1996**).

Un nouvel alcaloïde aminostéroïde, la sarachine (**19**), a été isolé d'une autre plante bolivienne, la *Saracha punctata* Ruíz et Pavón (Solanaceae). Cet alcaloïde présentait un CI₅₀ de 0,01 µg/ml sur la souche chloroquino sensible et une CI₅₀ de 0,07 µg/ml sur la souche chloroquinorésistante. Le composé a été également actif *in vivo* sur *P. vinckei* à 100 mg/kg/4J puisqu'il provoque une inhibition de 83% de la parasitémie. Sur *P. berghei* (NK65) à une dose de 32 mg/kg/4J, une inhibition de 69% de la parasitémie a été observée (**Moretti et al., 1998**).

La CI₅₀ d'autres alcaloïdes antipaludiques qui ont été étudiés *in vitro*, sont présentées dans le tableau A. Ce tableau donne aussi les nom d'espèce et les familles d'origine de ces molécules.

**TABLE I : QUELQUES ALCALOÏDES ANTIPALUDIQUES
ISOLES DE PLANTES UTILISEES EN MEDECINE
TRADITIONNELLE**

FAMILLE	ESPECE	COMPOSE ACTIF	ACTIVITE In vitro <i>P. falciparum</i> CI50 (μ g/ml)	REFERENCES
Ancistrocladaceae	<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	N-methyl-dioncophylline A Ancistrobrevine D Ancistrocladine	5,749 - 25,350 (souche K1) 12,222-18,353 (souche NF54/64)	François et al., 1994
Amaryllidaceae	<i>Crinum amabile</i>	(-)-amabiline (-)-lycorine, (-)-buphanisine, (-)-augustine (+)-crinamine	>10 - 0,14 (souche D6) >10 - 0,18 (souche D6)	Likhitwitayawuid et al., 1993c
Amaryllidaceae	<i>Brunsvigia littoralis</i> R A Dyer	licorine 1,2-di-O-acetylly-corine ambelline crinine	0,62 - >20 (souche D10)	Campbell et al., 1998
Apocynaceae	<i>Alstonia coriacea</i>	corialstonine corialstonidine	2,34 - 2,16 (souche K1)	Wright et al., 1993
Apocynaceae	<i>Alstonia scholaris</i>	echitamine	16,35 (souche K1)	Wright et al., 1993
Lauraceae	<i>Beilschmiedia madang</i> BL.	dehatrine	0 1 (souche K1)	Kitagawa et al., 1993
Loganiaceae	<i>Strychnos usambarensis</i> Gil	10'-hydroxyusambarensine usambarensine	0,16 - 0,26 (souche W2Indochina) 0,48 - 0,65 (souche FCA20 Ghana)	Frédérich et al., 1999
Menispermaceae	<i>Ciclea barbata</i> (Wall.) Miers	tetrandrine, limacine, thalrugosine, homoaromoline etcycleapeltine	0,029-0,232 (souche D6) 0,040-0,451 (souche W-2)	Lin et al., 1993
Menispermaceae	<i>Abuta grandifolia</i>	krukovine limacine compuesto 3	0,44 - 1,58 (souche K1) 0,022 - 0,24 (souche T9 - 96)	Steele et al., 1999
Ranunculaceae	<i>Thalictrum faberi</i> Ulbr.	3-hydroxy-6'-desmethyl-9-0- methylthalifaboramine 3-hydroxy-6'-desmethyl-9-0- methylthalifaboramine 6'-desmethylthalifaboramine	0,011 - 0,024 (souche W-2) 0,11 - 15,2 (souche D6)	Lin et al., 1999
Ranunculaceae	<i>Isopyrum thalictroides</i> L.	penduline tetrandrine	0,012 - 0,084 (souche FcB1) 0,019 - 0,081 (souche F32)	Valentin et al., 1997
Rutaceae	<i>Toddalia asiatica</i>	nitidine	0,045 (souche K39)	Gakunju et al., 1995

2.3. Terpènes

La très grande majorité des terpènes proviennent du règne végétal.

La famille des Compositae présente une grande variété d'espèces qui a fait l'objet de nombreuses études. Les feuilles de *Vernonia amydalina* DEL (compositae) utilisées dans le traitement de la rougeole au Bénin et au Rwanda sont également utilisées pour traiter le paludisme. L'administration par voie orale à des souris infectées par *P. berghei* de 1000 mg/kg/4J d'extrait de feuille a provoqué une inhibition de 67% de la parasitémie (**Hakizamungu et al., 1988**), ceci a conduit à l'isolement de vernodalin (**20**), de vernolide, l'hydroxivermolide, et de vernodalol (**Phillipson et al 1986a**).

Azadirachta indica A. Juss., (Meliaceae) est un arbre originaire d'Inde, acclimaté en Afrique tropicale. Écorce, feuilles et huiles extraites des graines sont largement mises à contribution par les systèmes de médecine traditionnelle.

De nombreux constituants terpéniques ont été isolés de *A. indica*: diterpènes (dérivés de l'abiétane) et surtout, plus de cinquante tétranortriterpénoïdes: azadirachtine, les limonoïdes isonimbocinolide, nimoncinol, nimbolide, gédunine, azadirone, nimbine, etc. (**Bruneton 1993**). On pense que l'activité immunomodulatrice de l'azadirachtine explique son efficacité dans le traitement des patients souffrant de paludisme (**Bray et al., 1990; Pousset 1984**). Récemment, **Benoit-Vical et al. (1996b)** ont décrit une CI_{50} de 7,29 $\mu\text{g/ml}$ (24 h) et 4,17 $\mu\text{g/ml}$ (72 h) pour le décocté de feuilles contre la souche FcB1 chloroquinorésistante de *P. falciparum*.

Neurolaena lobata (L.) R.Br. est une plante médicinale d'Amérique centrale et du sud. **François et al., (1996b)** ont isolé de cette Asteraceae les sesquiterpènes lactones: neurolenin A (**21**), B, C, D et la lobatin A et B qui ont présenté *in vitro*, les valeurs de CI_{50} situées entre 0,26 – 6,2 $\mu\text{g/ml}$. Tous les composés mentionnés ont montré un certain grade

de toxicité, mais il a été rapporté que l'effet antiplasmodique de ces molécules n'est pas du à une toxicité générale et que la double liaison proche de la fonction keto sur le C-1 est importante pour une toxicité élevée. La liste de quelques terpènes est reportés sur le tableau II.

**TABEAU II : QUELQUES TERPÈNES ANTIMALARIQUES
RELEVÉS DANS LA LITTÉRATURE**

FAMILLE	ESPECE	COMPOSE ACTIF	ACTIVITE In vitro <i>P. falciparum</i> CI ₅₀ µg/ml	AUTEURS
Annonaceae	<i>Uvaria pandensis</i> Verdc.	3-farnesyldole (6',7'-Dihydro-8',9'-dihydroxy) -3-farnesindole, 3-farnesindole	16,7 (souche K1) 50,0	Nkunya et al., 1991
Annonaceae	<i>Uvaria lucida</i> ssp. <i>lucida</i> Benth.	lucidene	50,0 (souche K1)	Nkunya et al., 1991
Annonaceae	<i>Uvaria tanzaniae</i> Verdc.	tanzanene	50,0 (souche K1)	
	<i>Picralima nitida</i>	Akuammine		Kapadia et al., 1993
Annonaceae	<i>Uvaria pandensis</i> Verdc.	3-farnesyldole	2,86 (souche K1)	Nkunya et al., 1991
Compositae	<i>Vernonia brachycalux</i>	16,17 dihydrobrachycalxolide	4,2 (souche K39) 13,7 (souche 3D7) 3,0 (souche V1/S)	Oketch-Rabah et al., 1998
Compositae	<i>Vernonia brasiliiana</i> (L.)Druce	lupeol	> 25	Almeida et al., 1997
Compositae	<i>Centipeda minima</i>	brevelin A	3,26 souche K1	Yu et al., 1994
Compositae	<i>Vernonia amygdalina</i>	vernodaline, vernolide, hydroxivernolide, vernodalol	4 -11 souche K1	Ohigashi et al., 1993
Compositae	<i>Parthenium hysterophorus</i>	parthenine et derives	0,714 -329,4 souche K1	Hooper et al., 1990
Dioncophyllaceae	<i>Triphyophyllum peltatum</i>	Acid betulinic	10,46 souche NF54, clone A1A9	Bringmann et al., 1997
Simaroubaceae	<i>Brucea javanica</i>	bruceajavanin A Dihydrobruceajavanin A bruceajavanin B	0,65 1,48 souche K1	Kitagawa et al., 1994
Zingiberaceae	<i>Amomun krervanh</i> Pierre	myrtenal, myrtenol, trans-pinocarveol 4-hydroxymyrténal	0.74 -7.4 31.87	Kamchonwongpaisan et al., 1995

2.4. Quassinoides

L'activité des Simaroubaceae est liée aux activités biologiques marquées d'un certain nombre de quassinoides isolés des plantes des genres *Ailanthus*, *Brucea*, *Eurycoma*, *Simarouba* (Phillipson et al., 1995, Ajaiyeoba et al., 1999).

Spencer et al. (1947) ont démontré que la plupart des Simaroubaceae ont une activité sur le paludisme d'oiseaux, de même que Trager et al. (1981) ont montré une forte activité antipaludique des quassinoides extraits de Simaroubaceae.

Phillipson et O'Neill ont repris l'étude des quassinoides antipaludiques, ils ont évalué un grand nombre de quassinoides contre *Plasmodium* (Bray et al., 1985; O'Neill et al., 1985; O'Neill et al., 1986; Chan et al., 1986; O'Neill et al., 1987; O'Neill et al., 1988; Phillipson et al., 1995). Ils ont montré que les quassinoides les plus actifs, comme le sergéolide (22), la brucéantine, et la simalikalactone D ont des CI_{50} de l'ordre du ng/ml. Mais cette forte activité *in vitro* n'est pas spécifique de *P. falciparum*. La cytotoxicité de ces métabolites (en utilisant des cellules cancéreuses) a été comparée à l'activité antipaludique. Les expériences menées sur *P. berghei* chez la souris avec des extraits contenant des quassinoides confirment la haute toxicité de ces molécules (Bray et al., 1987; Anderson et al., 1991; Phillipson et al., 1995).

Les quassinoides sont constitués d'un noyau de type terpénoïde, l'activité *in vitro* des molécules dépend de la présence, la position et la nature du groupe ester d'une part, et des substituants du noyau A d'autre part (Phillipson et al., 1986b).

La liste de quelques composés quassinoides isolés de plantes, est reportée sur le tableau III.

**TABLÉAU III : QUELQUES QUASSINOÏDES ANTIMALARIQUES
RELEVÉS DANS LA LITTÉRATURE**

FAMILLE	ESPECE	COMPOSE ACTIF	ACTIVITE		REFERENCES
			In vitro <i>P. falciparum</i> CI 50 $\mu\text{g/ml}$	In vivo DE50 mg/kg/4J	
Simaroubaceae	<i>Simaba guianensis</i>	gutolactone, simalikalactone D	0.004 (souche W-2) 0.0016		Cabral et al., 1993
Simaroubaceae	<i>Brucea javanica</i>	Bruceantin, bruceantinol, bruceine A, bruceine B, bruceine C, dehydrobruceine A, brusatol, bruceine D, yadanzolide A	0.0008 – 0.046 (souche K1)	0,90 – 3,36 <i>P. berghei</i> , souche N	O'Neill et al., 1987
Simaroubaceae	<i>Simarouba amara</i>	ailanthinone, 2'-actylglucarubinone, holacanthone, glucarubinone	0,004 – 0,009 (souche K1)	0.86 – 2.19 <i>P. berghei</i> , souche N	O'Neill et al., 1988
Simaroubaceae	<i>Simaba cedron</i> Planchon	cedronin	0.25 (souche FZR8)	1.8 <i>P. vinckei</i> <i>petteri</i> , 279 BY	Moretti et al., 1994
Simaroubaceae	<i>Eurycoma longifolia</i> Jack	eurycomanol-2-O-b-D-glucopyranoside, 13b,18-dihydroeurycomanol	1,231 – 4,899 μM (isole)		Ang et al., 1995

2.5. Quinones

Parmi les cinq naphthoquinones extraites de *Nepenthes thorelii* (Nepenthaceae) employée traditionnellement pour traiter la malaria en Malaisie, la plumbagine (**23**) présente la plus forte activité *in vitro*, avec une CI_{50} de 0,046 $\mu\text{g/ml}$ (Likhawitayawuid et al., 1998).

9 quinones de la Rubiaceae *Morinda lucida* Benth ont été isolés, et ont révélé des valeurs d'activité situées entre 6 – 22,3 $\mu\text{g/ml}$. Les études de relation structure-activité ont montré que l'aldéhyde sur le C2 et le groupe hydroxy phénolique sur le C-3 augmentent l'activité des antraquinones sur *P. falciparum in vitro* (Sittie et al., 1999).

2.6. Autres métabolites antipaludiques

L'activité antipaludique du n-hentriacontanol ($(\text{CH}_2)_{29}\text{CH}_2\text{OH}$), un alcool gras isolé d'une Solanaceae bolivienne, *Cuatresia fosteriana*, a été étudié *in vivo* sur des souris infectées par *P. berghei* et *P. vinckei* au moyen du test suppressif de 4 jours. Ce composé réduit l'infection provoqué par *P. vinckei*. Le n-hentriacontanol appartient à un nouvelle série de substances naturelles qui pourraient être utilisées en thérapeutique antipaludique (Deharo et al., 1992).

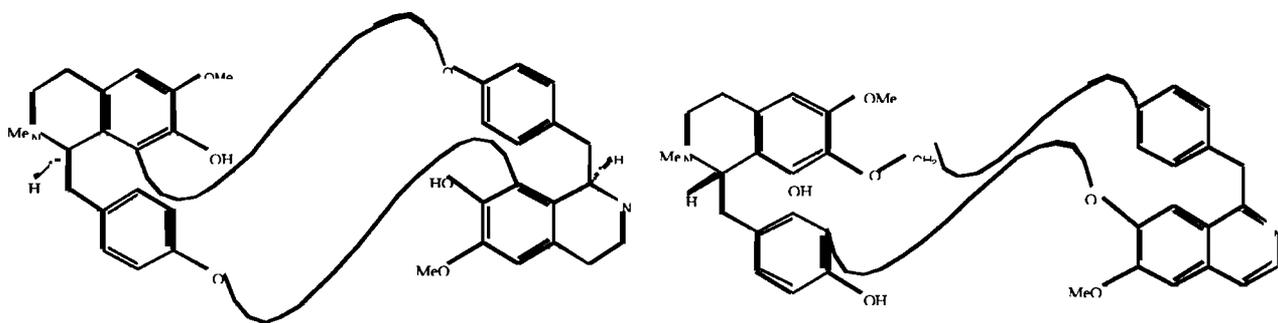
La licochalcone A (**24**) est un flavonoïde présent dans les liqueurs de racines de Gan Cao (*Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*) (Leguminosae). Ces liqueurs sont utilisées dans la médecine traditionnelle Chinoise contre différentes maladies (Renan et al., 1986). Chen et al. (1994) ont mis en évidence l'activité antipaludique *in vitro* et *in vivo* de la licochalcone A qui montre une $CI_{50} = 0,6 \mu\text{g/ml}$ sur les souches chloroquinosensible

(3D7) et chloroquinorésistante (Dd2). Elle inhibe le développement de tous les stades érythrocytaires de *P. falciparum*. Il est donc probable, qu'elle agisse sur des événements métaboliques importants pour le parasites durant la phase érythrocytaire. L'administration par voie intrapéritonéale et orale de ce flavonoïde pendant 3 à 6 jours à des souris infectées par *P. yoelii* protège les souris d'une infection létale. Ces études montrent que la licochalcone A peut être la base d'une nouvelle génération de molécules antiparasitaires et en même temps, un motif d'études de synthèse (**Rongshi et al., 1995**)

Benoit-Vical et al., 1999 ont étudié l'activité antiplasmodiale et cytotoxique des huiles essentielles extraites des Cochlospermaceae: *Cochlospermum tinctorium* et *C. planchonii*, les CI_{50} obtenus après 24 et 72 h de contact entre les huiles et les culture de *P. falciparum* présentent une activité de 22 a 500 $\mu\text{g/ml}$.

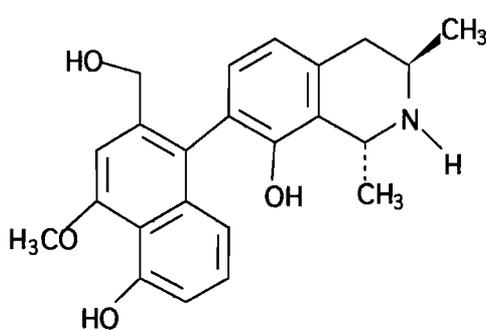
Tous ces travaux mentionnés constituent un bon exemple de la nécessité d'approfondir l'étude des molécules ayant une bonne activité *in vitro* pour expliquer la réputation de ces plantes en médecine traditionnelle.

FIGURE 5 : STRUCTURES DE QUELQUES COMPOSES D'ORIGINE VEGETALE

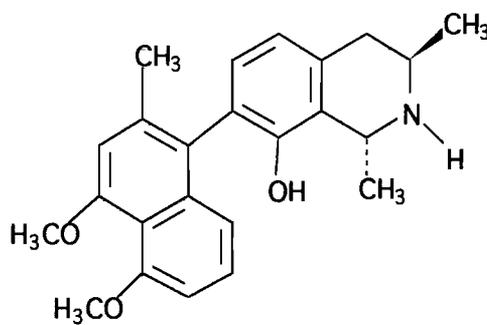


10. Cycleanine

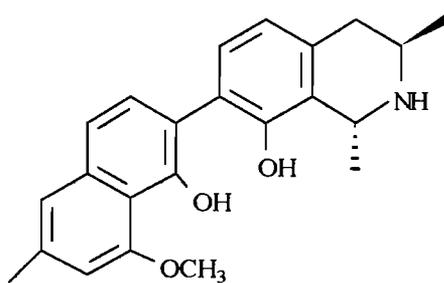
11. Cycleatjehine



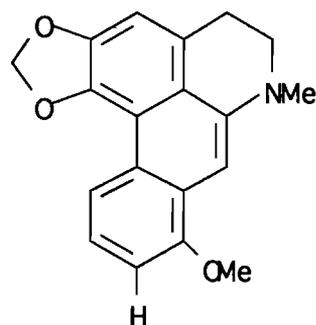
12. Dioncopeltine A



13. Dioncophylline A

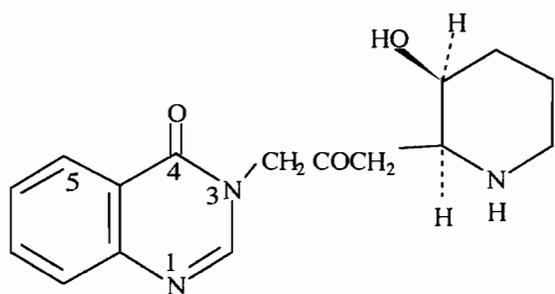


14. Dioncophylline B

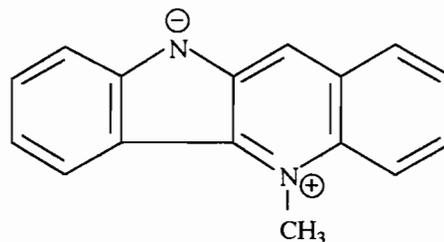


15. Dehydrostephanine

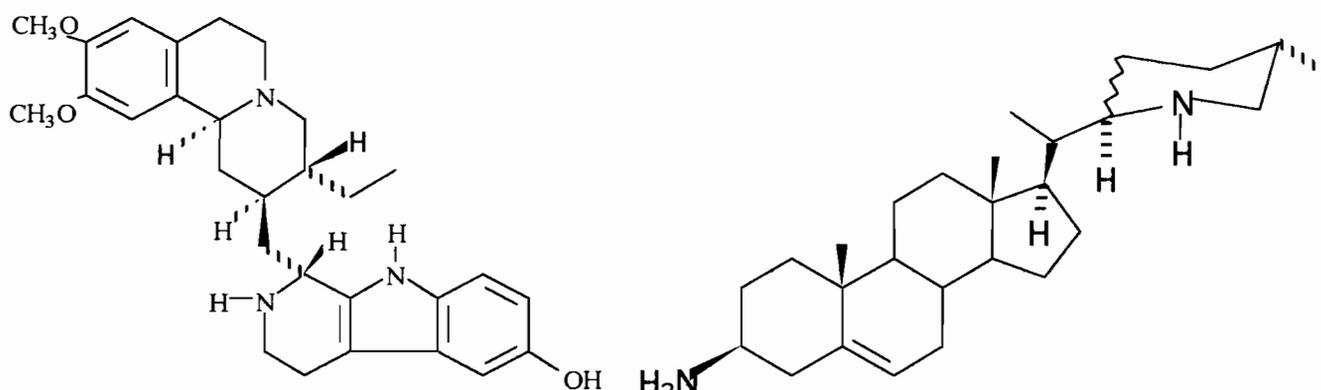
FIGURE 5 : (SUITE)



16 Fébrifugine

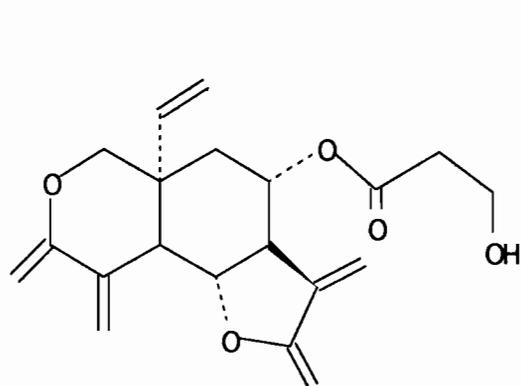


17. Cryptolépine

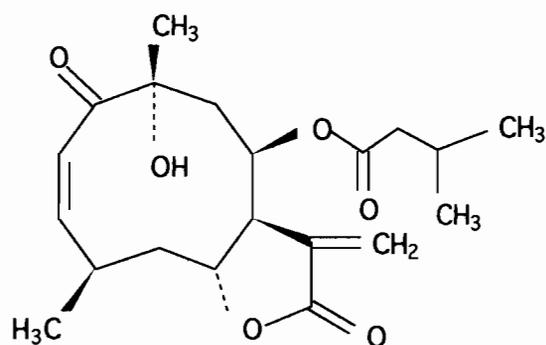


18. Tubulosine

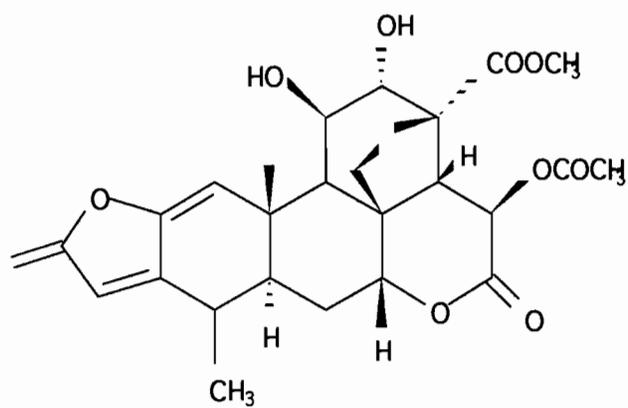
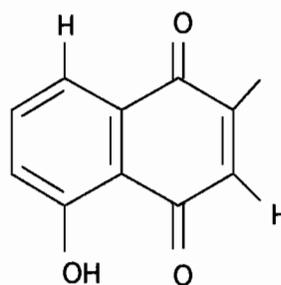
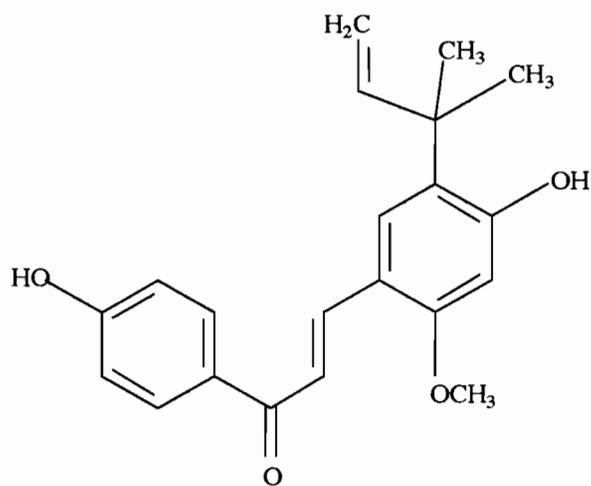
19. Sarachine



20. Vernodaline



21. Neurolepin A

FIGURE 7: (SUITE)**22. Sergéolide****23. Plumbagine****24. Licochalcona A**

2.7 Plantes et composés synergisant, potentialisant et antagonisant l'effet de drogues conventionnelles (Fig. N° 6)

La combinaison rationnelle des drogues dans le traitement du paludisme présente trois objectifs fondamentaux:

- Posséder une action sur les différents stades du cycle du parasite
- Permettre l'accroissement de l'activité antiparasitaire de façon à augmenter le taux de guérisons.
- Participer à la prévention de la résistance aux drogues.

Dans différents pays en voie de développement, les malades utilisent des préparations de plantes comme adjuvant du traitement à la chloroquine. Les termes classiques de synergie, additivité, antagonisme, sont utilisés pour interpréter les données obtenues *in vitro* ou *in vivo*.

2.7.1. Tétrandrine

La complexité de l'effet de l'association de drogues est bien illustrée avec l'exemple de la tétrandrine (25).

La tétrandrine possède une haute activité antipaludique sur *P. falciparum in vitro* (Ye et al., 1989a). Les CI_{50} de la tétrandrine sont 498 ± 93.7 nM et $197,5 \pm 24,7$ nM sur une souche chloroquinorésistante (Indochina W2) et chloroquinosensible respectivement 5FCMSU1/Soudan. Les résultats de l'interaction de la tétrandrine avec la chloroquine et le Qingaosu (10:3; 10:1 et 30:1) ont été exprimés de deux façons: d'une part, par la somme des concentrations inhibitrices fractionnelles SCIF, et d'autre part, par les isobogrammes.

Les formes des courbes obtenues par les isoboles dans la combinaison entre la tétrandrine-chloroquine et la tétrandrine-qingaosu sont concaves pour les 2 souches, sensible et résistante. Donc l'interaction paraît être de nature potentialisatrice, chaque drogue possédant sa propre action antipaludique.

Autrement dit, l'addition de la tétrandrine combinée à la chloroquine et ou qingaosu est beaucoup plus effective sur la souche chloroquino résistante. Cependant à des concentrations subinhibitrices la tétrandrine ne reverse pas la résistance à la chloroquine de *P. falciparum in vitro* (Ye et al. 1989b).

2.7.2. Phaéanthine

La tétrandrine (1S,1'S) est un énantiomère de la phaéanthine (**26**) qui est un antagoniste de la chloroquine contre la souche T9-96 de *P. falciparum*, et qui ne montre pas de synergie en association avec la chloroquine contre la souche multirésistante K1 (Ekong et al., 1991). Cette observation témoigne de l'importance de la stéréochimie au centre chiral 1' de ces alcaloïdes.

2.7.3. Flavones

Les extraits de *Artemisia annua* utilisés en médecine traditionnelle contiennent un mélange complexe de produits naturels, comprenant l'artémisinine, les flavones casticine et artemetine. Ces flavones ont un effet synergique avec l'artémisinine sur l'inhibition de croissance du *P. falciparum in vitro*, souche D4 (Elford et al. 1987). Les effets des autres composés chimiques inclus dans la préparation traditionnelle sont inconnus à ce jour.

2.7.4. Alcaloïdes de quinquina

Des associations faites à parties égales entre les alcaloïdes isolés de l'écorce de *Cinchona*: quinina, quinidina et cinchonina montrent une activité similaire à celle de la quinine contre des souches quinine susceptibles, mais par contre la combinaison de ses alcaloïdes s'est montrée 2 à 10 fois plus effective contre des souches résistantes à la quinine et on constate un effet supérieur à celui des alcaloïdes utilisés seuls.

La somme des concentrations inhibitrices fractionnelles de la combinaison de deux ou trois alcaloïdes démontre l'existence d'une synergie ou d'un simple effet additif. La synergie s'observe principalement sur des lignées quinine résistantes et dépend surtout de la présence de cinchonine dans l'échantillon étudié. La synergie de ces alcaloïdes a également été confirmée dans des études sur 25 isolats frais de *P. falciparum* chez des patients Thai, pour lesquels les combinaisons se sont montrées 2 à 3 fois plus efficaces que la quinine seule, surtout pour les souches quininorésistantes (**Druilhe et al., 1988**).

L'activité antimalarique des dérivés de la quinine, la dihydroquinine (une impureté naturelle rencontrée dans les formulations pharmaceutiques commerciales de quinine) et la 3-hydroxyquinine (le principal métabolite de la quinine chez l'homme) ont été évalués seuls ou combinés contre 5 souches de *P. falciparum* issues de patients thaïlandais. Les isobogrammes construits avec la quinine en association avec la dihydroquinine et la 3-hydroxyquinine n'ont pas montré de synergie ni d'antagonisme, mais une contribution additive à l'activité antimalarique de la quinine .

2.7.5. Plantes et composés malgaches

L'Institut Malgache de Recherches Appliquées a étudié l'association des plantes médicinales de Madagascar avec la chloroquine.

Les chercheurs malgaches ont choisi pour la recherche de nouveaux potentialisateurs de la chloroquine le genre *Strychnos* (Loganiaceae), *Strychnopsis*, *Spirospermum*, (Menispermaceae) et *Hernandia* (Hernandiaceae). Les études ethnobotaniques effectuées sur le terrain révèlent l'association d'un ou de deux comprimés de chloroquine à une infusion de plantes médicinales, de préférence au goût amer. Trois espèces de *Strychnos* ont été largement utilisées dans le traitement du paludisme (**Rasoanaivo et al., 1996**): l'extrait de *Strychnos myrtoïdes* Gilg & Busse a une activité intrinsèque faible ($CI_{50} = 57,6 \mu\text{g/ml}$), mais, combiné à la chloroquine à des doses allant de la moitié au dixième de sa CI_{50} , l'extrait potentialise l'action de la chloroquine vis-à-vis de la souche *P. falciparum* résistante FCM29/Cameroun.

Le fractionnement biodirigé d'extraits de *S. myrtoïdes* Gilg & Busse a permis d'identifier deux alcaloïdes majoritaires responsables de l'activité potentialisatrice *in vitro*; la malagashanine (**30**) et la strychnobrasiline (**31**). En effet, la chloroquine administrée seule a une CI_{50} de 332,9 nM, en présence de doses croissantes de la strychnobrasiline ou de la malagashanine, la CI_{50} de la chloroquine diminue, elle est de 11,9 nM avec 25 $\mu\text{g/ml}$ de strychnobrasiline (**Rasoanaivo et al., 1994**).

Après des études pharmacologiques et toxicologiques, l'infusion de *S. myrtoïdes* Gilg & Busse a été soumise à un essai clinique à l'hôpital d'Anatanarivo pour évaluer sa capacité à potentialiser l'action d'antipaludéens comme la chloroquine, la quinine et l'association sulfadoxine/pyriméthamine; les essais cliniques ont été effectués sur 20

malades. Les résultats montrent une intolérance ou/et un échec thérapeutique aux antipaludéens (**Randriamahary-Ramialiharisoa et al., 1994**).

L'infusion d'écorce de tige de *S. mostueoides* Leeuwenberg, est employée comme adjuvant à la chloroquine pour traiter le paludisme chronique. Huit alcaloïdes indoliques ont été isolés de l'écorce de tiges (**Rasoanaivo et al., 1996**). L'infusion de tiges râpées de *S. diplotricha* Leeuwenberg seule ou en association avec la chloroquine sert à combattre le paludisme dans le traitement prophylactique ou curatif (**Rasoanaivo et al., 1996**).

Les feuilles et l'écorce des tiges de *Strychnopsis thouarsii* Baill sont utilisées seules ou en association avec la chloroquine dans le traitement du paludisme. Ont été isolés de cette plante: 4 alcaloïdes aporphiniques (l'isocorydine, la prédicentrine, la lirirotulipiférine et la N-méthyl lidcarpine), un alcaloïde de type morphine, la sinoacutine et l'alcaloïde bisbenzylisoquinoléine: 7-O-demethyltetrandrine (**27**), ce composé a une faible activité *in vitro*, et potentialise l'effet de la chloroquine (**Ratsimamanga-Urverg et al. 1992**).

De la même façon, les racines et l'écorce des tiges de *Spirospermum penduliflorum* Thou (Menispermaceae) sont utilisées dans le traitement du paludisme, seules ou associées à la chloroquine. La limacine (**28**), alcaloïde bis-isoquinoléine isolé de cette plante est faiblement actif *in vitro* mais potentialise l'effet de la chloroquine (**Ratsimamanga-Urverg et al. 1992**).

Hernandia voyronii Jum (Hernandaceae) est facilement reconnaissable par la mauvaise odeur de l'écorce des tiges qui est utilisée comme adjuvant du traitement à la chloroquine. Le traitement local dans le sud-est de Madagascar consiste à prendre une dose subcurative de chloroquine (2 à 4 comprimés soit de 2 à 4 mg/Kg) avec une décoction de l'écorce de tiges. L'activité antimalarique est due à la fraction alcaloïdique A qui a une activité intrinsèque *in vitro* sur la souche chloroquinorésistante FCM29 (CI₅₀ = 3,53 µg/ml), l'activité antimalarique de la fraction polaire alcaloïdique C est trois fois plus importante

que celle de la fraction A ($CI_{50} = 1,14 \mu\text{g/ml}$). Les deux fractions potentialisent l'activité de la chloroquine, comme le montrent les concavités des courbes.

Le fractionnement bioguidé a permis d'identifier treize alcaloïdes parmi lesquels **Ratsimamanga-Urverg et al., 1994** et **Rasoanaivo et al., 1998** ont mis en évidence *in vitro* des activités potentialisatrices de l'harveline B (**33**), l'harveline C, la retiluline et la laudanosine sur l'activité de la chloroquine. Le mélange des alcaloïdes harveline D et harveline C a également une activité potentialisatrice *in vitro*. L'activité antagoniste a été démontrée pour une combinaison de la chloroquine et l'harveline D.

L'activité potentialisatrice a été confirmée *in vivo* sur *P. berghei* pour l'**harveline A (32)**, l'harveline B et la laudanosine (**34**).

2.7.6. L'ajoene

L'ajoene ou 4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide, produit initialement isolé de l'ail (*Allium sativum*), a montré une activité antipaludique forte sur *P. berghei* à des doses basses de 12,25 mg/kg associées à des doses inhibitrices ou subcuratives uniques de 2,8 mg/kg de chloroquine, ce qui démontre l'effet synergisant de l'ajoene à la chloroquine (**Perez et al., 1994**)

2.7.7. La berbamine

La berbamine (**29**) est un analogue naturel de la tétrandrine et un des principaux alcaloïdes issus de deux espèces chinoises utilisées traditionnellement: *Berberis soulieana* ou *Berberis portii* ainsi que dans d'autres espèces de *Berberis*. Des associations de cet alcaloïde avec la chloroquine et l'artémisinine ont été étudiées par **Ye et al. 1993** sur des

souches chloroquino-sensibles (D2) et chloroquino-résistantes (W2). Les valeurs des CI_{50} de la berbamine combinée à la chloroquine et à l'artémisinine se sont montrées plus faibles que celles obtenues avec les produits seuls, en particulier sur une souche résistante à la chloroquine.

2.7.8. *Nectandra salicifolia*

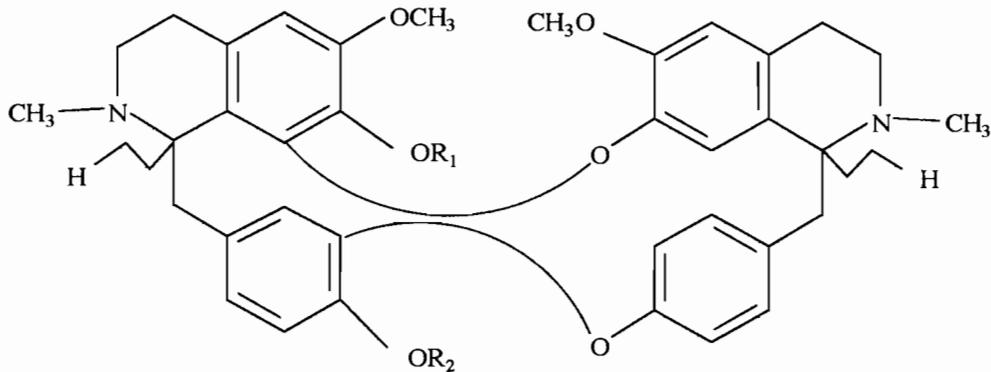
De l'écorce, la racine, les feuilles de *Nectandra salicifolia* (H.B.K.) Nees (Lauraceae) ont été isolés 15 alcaloïdes, parmi lesquels la (+)-costaricine (**35**) qui a une forte activité sur la souche D6 chloroquinosensible et sur la souche chloroquinorésistant W2. Un autre composé qui pourrait contribuer à l'activité antiplasmodiale de l'extrait méthanolique est la (+)-laurolitsine[(+)-norboldine] (**35**). La possibilité d'interaction entre les deux composés précédemment cités a permis de faire des associations de (+)-costaricine et de (+)-laurolitsine[(+)-norboldine]. On a ainsi démontré l'existence d'un effet additif (Bohlke et al., 1996).

2.7.9. *Salacia kraussi*

Salacia kraussi (Harv.) Harv. (Celastraceae) est utilisée en médecine traditionnelle au Mozambique pour le traitement des bilharzioses et des dysenteries. De cette plante ont été isolées 6 quinones méthides: 28-nor-isoiguesterin-17-carbaldehyde, 17-(methoxycarbonyl)-28-nor-isoiguesterin, 28-hydroxyisoiguesterin, celastrol, pristimerin et isoiguesterol. *In vitro* ces quinones méthides ont montré une activité antimalarique avec des CI_{50} de 30 à 50 fois plus élevées que leur cytotoxicité sur des cellules HT-29. Une interaction additive entre le celastrol et la pristimerin a été montrée. L'association avec le

composé le plus actif (17-(methoxycarbonyl)-28-nor-isoiguesterin) et l'isoiguesterol possède un effet antagoniste sur le souche K1 et la souche NF54 de *P. falciparum*. Le 17-(methoxycarbonyl)-28-nor-isoiguesterin a également un effet antagoniste sur la chloroquine sur des souche NF54 et K1 (**Figueiredo et al., 1998**).

FIGURE 6 : STRUCTURE DE QUELQUES COMPOSES SYNERGISANT, POTENTIALISANT ET ANTAGONISANT L'EFFET DE DROGUES CONVENTIONNELLES ISOLES DE PLANTES



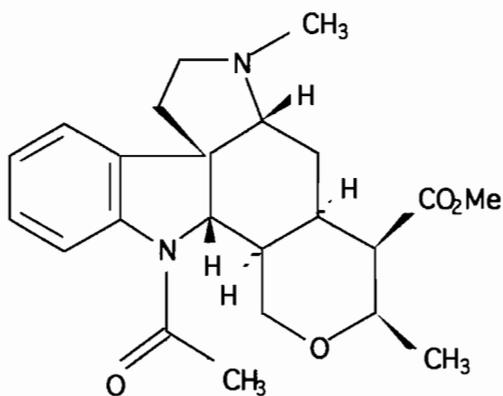
25. Tetrandrine: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, 1 *S*, 1' *S*

26. Phaenanthine: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$, 1 *R*, 1' *R*

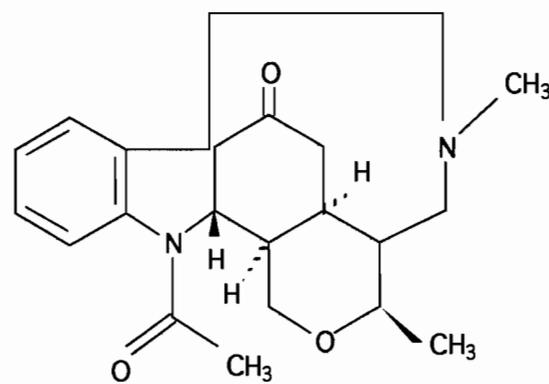
27. 7-O-Demethyltetrandrine: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, 1 *S*, 1' *S*

28. Limacine: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, 1 *R*, 1' *R*

29. Berbamine: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, 1 *R*, 1' *S*

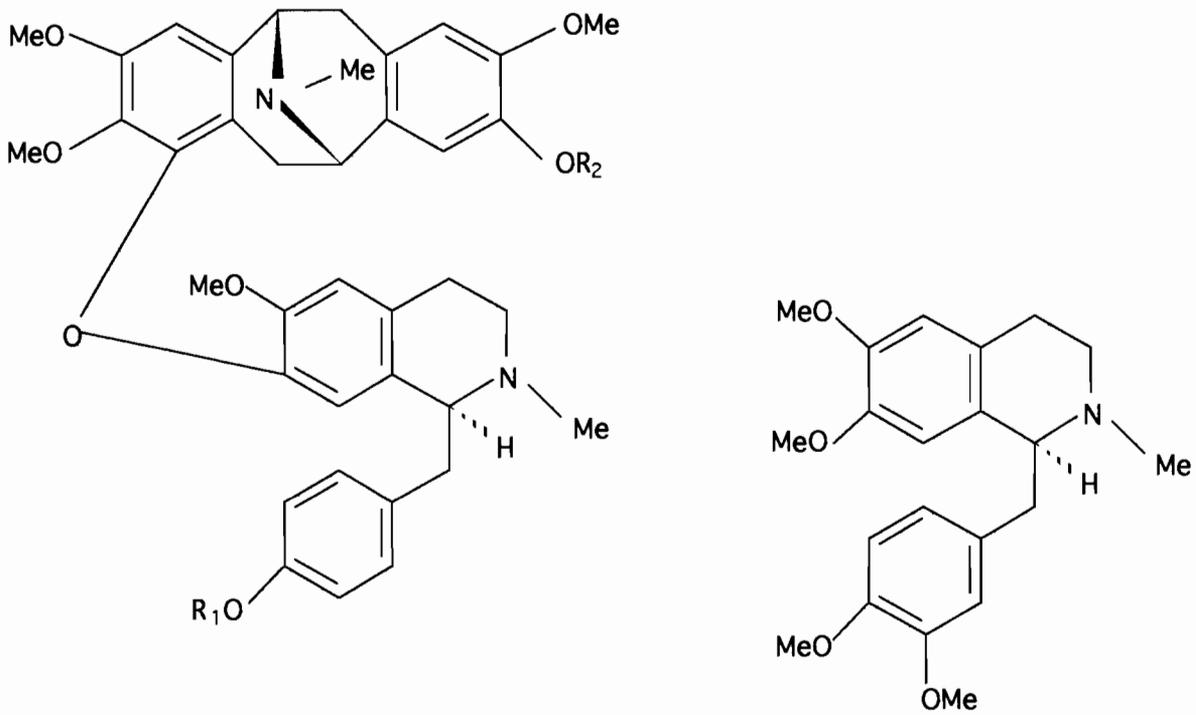


30. Malagashanine



31. Strychnobrasiline

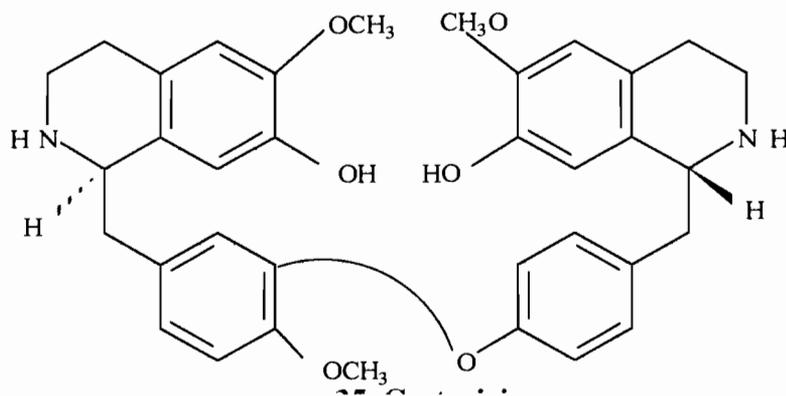
FIGURE 6 : (SUITE)



32. Harveline A: $R_1 = H, R_2 = Me$

33. Harveline B: $R_1 = Me, R_2 = H$

34. Laudanosine



35. Costaricine

MATERIEL ET METHODES

A. ETUDES ETHNOPHARMACOLOGIQUES ET ISOLEMENT DE LA (-) ROEMREFIDINE

1. ETHNOBOTANIQUE/ETHNOPHARMACOLOGIE

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie sont des disciplines appartenant à un champ d'investigation plus étendu, appelé ethnoscience, ce qui signifie "l'étude des cultures et des connaissances des différentes ethnies du monde". Le terme "ethnobotanique" est apparu à la fin du 19^{ème} siècle et signifiait à l'époque "l'étude de l'utilisation des plantes par les peuples primitifs". Actuellement, parler d'ethnobotanique se réfère à "l'étude des connaissances botaniques indigènes".

L'ethnopharmacologie, branche spécialisée de l'ethnobotanique, est de nature multidisciplinaire, et tente de réunir de manière complémentaire deux niveaux de recherches distincts :

-le premier niveau, comprend des concepts ethnologiques, tels les conceptions vernaculaires de santé, de maladie, de remède, de préparation médicinales et de leur efficacité, etc.

-le second niveau, correspond aux sciences expérimentales, ou sciences positivistes, tels l'identification botanique, zoologique, et minérale des drogues, leur évaluation biologique, leur mode d'action, la recherche des principes actifs (**Martin 1995**).

La recherche de substances naturelles à activité antiparasitaire utilisant le biais de l'ethnopharmacologie est une recherche de nature pluridisciplinaire, c'est pourquoi, depuis 1993, a été mis en place en Bolivie un projet de recherche intitulé "Conservation du milieu ambiant par le biais de la valorisation ethnobotanique et ethnopharmacologique en Bolivie", regroupant des chercheurs de différentes disciplines, appartenant à diverses institutions et organismes de recherche français et bolivien.

2. L'ETHNOBOTANIQUE APPLIQUEE A UNE ETHNIE : LES CHACOBOS

L'ethnie Chacobo appartient à la grande famille linguistique panoan (**Mason 1950**), qui comprend une douzaine d'ethnies amazoniennes. Cette ethnie est actuellement localisée dans le nord-est de la Bolivie sur un territoire de 43.000 hectares, et de petites communautés sédentarisées se sont installées entre les rivières Yata et Benicito dans le département du Beni.

L'histoire des Chacobos est similaire à celles de beaucoup de groupes amazoniens de Bolivie : initialement établis en petits groupes semi-nomades, se déplaçant entre le Lac Rogoaguado et la rivière Mamore, ils ont souffert des poussées expansives de leurs voisins Tacanas plus agressifs. A la fin du 19^{ème} siècle, les Chacobos ont subi le boom du caoutchouc, se traduisant par la présence de "maisons d'exploitation" (ou "gomeriales"), avec l'intrusion de "seringueros" (récolteurs du caoutchouc) dans leurs territoires. Ces intrusions les ont obligés à des déplacements incessants chaque fois plus au nord de leur territoire. Jusqu'en 1950, les Chacobos ont vécu à l'écart de l'économie de marché bolivienne, tirant leur subsistance d'activité de chasse, de pêche, de culture sur brûlis (les principaux cultigènes étant le maïs, le manioc doux, et la banane). Cependant, à partir de 1953, l'influence missionnaire commence à s'étendre dans cette ethnie, et les Chacobos petit à petit se sont sédentarisés, sont évangélisés par le Sil (Institut linguistique d'été, une église d'obédience évangéliste), Ce qui entraîna certains changements dans leur mode de vie. Fait important, l'aide de ce groupe religieux les a aidé à devenir propriétaires de leurs terres.

Actuellement, la population Chacobo est estimée à 700 personnes. Les Chacobos participent à l'économie de marché (récolte de gomme ou caoutchouc *Hevea brasiliensis*, de châtaignes du Brésil, *Bertholletia excelsa*, exploitation de bois) et sont totalement sédentarisés.

Les voies d'accès aux principales communautés sont difficiles, se résumant aux fleuves, aux chemins piétonniers, et aux petits avions (**Boom, 1987; 1988**).

Le climat est un climat tropical humide, les températures moyenne sur toute l'année sont comprises entre 25 et 27 °C, avec une époque sèche bien marquée, de juin à octobre et une saison d'été (novembre à avril), au cours de laquelle les précipitations pluviales peuvent atteindre entre 1500 et 1800 mm. La formation floristique rencontrée dans cette région de l'Amazonie est une forêt de type amazonien sempervirente, comprenant des éléments de l'hylea périodiquement inondable, entrecoupée de zones de savanes, également périodiquement inondables (**Ribera 1992**).

2.1. Description de la région d'étude

Le village d'Alto Ivón est situé à environ 112 kilomètres au sud de Riberalta (Province Vaca Diez, del Departamento de Beni) près du fleuve Ivon, affluent mineur du fleuve Beni, et à une altitude de 200 m. La végétation pousse sur la terre ferme. Elle est du type forêt subtropicale humide (**Unzueta, 1975**). A la station météorologique la plus proche (Riberalta), on enregistre une température annuelle moyenne de 26,8°C et une pluviométrie de 1566 mm. Il existe une saison sèche qui dure de juin à novembre. La saison des pluies s'étend de la mi-décembre à début mars.

Les diverses formations végétales rencontrées sur le territoire Chacobo, et plus précisément dans la zone d'étude, se répartissent de la manière suivante (**Unzueta, 1975**).

-Forêt amazonienne humide non inondable

-savanes arborées aussi appelées "pampas"

Ces savanes peuvent être inondées durant les époques de pluie (de décembre à février), et elles présentent des taches arborées disséminées, non inondables.

-Forêts galeries saisonièrement inondables

Ce type de forêt se rencontre généralement au bord des rivières. En époque de pluie, la rivière peut grossir jusqu'à 8 mètres, inondant alors les berges arborées, alors qu'en époque sèche, la rivière tend à disparaître, ne laissant que quelques trous d'eau dans les zones de dépression.

-végétation secondarisée, suite à une action anthropique, présentant plusieurs stades évolutifs.

Ce type de végétation correspond à des zones anciennes de cultures vivrières ou de campement humain.

3. METHODOLOGIE DE TERRAIN

Les enquêtes ethnobotaniques, effectuées par Bergeron (**Bergeron, 1993, 2000**) se sont déroulées dans le village d'Alto Ivón. Ce village est situé près du fleuve Ivón, affluent mineur du fleuve Beni, et à une altitude de 200 m.

Durant ces recherches de terrain, 2 méthodologies complémentaires ont été utilisées : réalisation d'une parcelle permanente en forêt primaire et collecte systématique d'échantillons d'herbier dans toutes les formations végétales rencontrées autour et dans le village.

3.1. Parcelle permanente et enquêtes

Une parcelle de forêt d'un hectare, représentative de la forêt primaire a été délimitée à 65°NE et 155°SE. Tous les arbres, lianes et palmiers de plus de 10 cm de diamètre à hauteur de la poitrine ont été numérotés et un échantillon d'herbier d'au moins 4 parts a été collecté, en vue de l'identification de l'espèce. Les données de hauteur, ainsi que le diamètre exact de l'espèce végétale a été enregistrés. Quatre informateurs Chacobos ont ensuite été invités à donner le(s) nom(s) Chacobo des

espèces numérotées, le(s) autres noms vernaculaires connus, et à commenter l'utilisation traditionnelle Chacobo de ces espèces.

3.2. Collecte dans différents sites écologiques

Des collections botaniques systématiques ont également été réalisées dans différents écosystèmes, tels les pourtours de maisons, de villages, les jardins, les jachères, les champs cultivés, les bords de rivière, les savanes, afin d'obtenir un maximum d'informations sur les espèces représentatives du milieu dans lequel évoluent les Chacobos.

Les parts d'herbier collectées ont été déposées à l'herbier national de La Paz (LPB), ou des spécialistes ont aidé à leur détermination. Des parts ont également été envoyées aux spécialistes des familles correspondantes, dans les herbiers internationaux.

Les données ethnobotaniques ont été saisies et traitées sur de bases informatisée, et leur analyse a permis d'établir une liste d'espèces utilisées par les Chacobos (**Bergeron 1993**). Cette liste d'espèces et d'usages montre quelques différences avec celle établie une dizaine d'année auparavant par un autre ethnobotaniste travaillant dans la même région (**Boom, 1987**), mais dans l'ensemble est concordante, ce qui tendrait à démontrer une continuité dans le savoir ethnobotanique indigène au sein de cette ethnie durant cette décennie.

4. UTILISATION DES PLANTES PAR LES CHACOBOS

Un total de 346 espèces différentes ont été collectées. Sur ces 346 espèces, les Chacobos en désignent 73% comme utiles, et parmi celles-ci 45%, soit 156 sont

médicinales. Sur ces 156 espèces médicinales, seulement 4 ont été expressément désignées comme utiles contre le paludisme (*Cedrela fissilis*, *Coutarea hexandra*, *Geissospermum laeve* et *Maquira coriacea*). Les autres espèces servent à soigner, par ordre de fréquence prédominante, les problèmes gastro-intestinaux (diarrhée, dysenterie, vomissements, spasmes, acidité d'estomac, malaises, douleurs etc.), les problèmes cutanés (furoncles, infections dues à des blessures, égratignures, parasites, larves de mouches, inflammations, brûlures, attaques fongiques, bactériennes), les problèmes rénaux, les problèmes pulmonaires, gynécologiques, les maux d'yeux, d'oreilles, de dents, les morsures de serpents venimeux, les inflammations, les rhumatismes, les insomnies (**Bergeron, 2000**).

5. CRITERES DE SELECTION DES ESPECES VEGETALES QUI ONT ETE SOUMISES A L'ETUDE

5.1. Utilisation traditionnelle

Le premier critère de sélection des espèces à étudier concerne évidemment l'indication médicinale traditionnelle : les espèces utilisées spécifiquement contre les crises de paludisme ont été retenues, ainsi que les espèces utilisées pour combattre le principal symptôme du paludisme, la fièvre. De même, ont été retenues prioritairement les espèces utilisées traditionnellement pour soigner divers symptômes qui peuvent avoir un lien avec une attaque de paludisme, tels fièvre, problèmes digestifs, splénomégalie, douleur au niveau du foie, céphalées, vomissements.

5.2. Critères bibliographiques généraux, données collectées sur banques informatisées (NAPRALERT, MEDLINE, en chimie et autres) et citations dans les pharmacopées ou les inventaires nationaux ou régionaux

Une recherche bibliographique la plus complète possible doit être entreprise sur les espèces botaniques correctement identifiées durant la phase de criblage préliminaire. Elle indiquera soit l'absence de publications chimiques ou pharmacologiques pour l'espèce indiquée, soit l'intérêt des publications sur des genres ou espèces voisines permettant d'envisager de trouver dans les taxons testés des composés chimiotaxonomiquement proches de composés connus à activités antiparasitaires ou cytotoxiques.

5.3. Critères d'approvisionnement

A partir des résultats du triage préliminaire, un réapprovisionnement important de l'ordre du kg en poids sec des organes des plantes positives est généralement nécessaire, afin d'aborder la recherche des principes actifs par bioguidage. C'est ici qu'intervient la disponibilité dans le milieu naturel de la plante qui fait éliminer les plantes rares ou de très petite taille. Il faut noter que, de la sélection par les tests *in vitro*, résulte un grand nombre d'extraits positifs, et ceci peut laisser l'équipe dans l'embarras pour choisir les plantes à travailler en priorité. Les critères de nouveauté phytochimique et d'abondance permettent de sélectionner les plantes pour l'isolement des principes actifs par guidage biologique.

6. EXTRAITS VEGETAUX

6.1. Monographies des plantes sélectionnés pour leur activité antipaludique

30 plantes utilisées dans le traitement du paludisme ou d'affections superposables cliniquement, sont sélectionnées sur un total de 156 différentes espèces utilisées par les Chacobos pour une évaluation de l'activité biologique.

Parmi les plantes étudiées, nous avons choisi 15 espèces (catalogue ci-après) qui ont différents degrés d'activité in vitro et /ou in vivo.

PLANCHE 1

Apuleia leiocarpa (J. Vogel) J.F. Macbr. (Fabaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Mani
Description	Grand arbre (35 m), l'écorce externe présente des cicatrices, les feuilles sont alternes, coriaces, les fleurs petites en cimes axillaires; les sépales sont unis, tubulaires; les pétales sont blancs, les fruits sont indéhiscent, coriaces, ovales-oblongs, ailés, et contiennent 1 à 2 graines.
Habitat en Bolivie	Département du Pando et du Beni.
Indication thérapeutique Chácobo	Fièvre
Partie utilisée	L'écorce du tronc et des tiges.
Autres utilisations	Le tronc sert pour faire de poteaux de soutènement des maisons. Il sert aussi comme bois de feu, ou pour préparer du charbon.

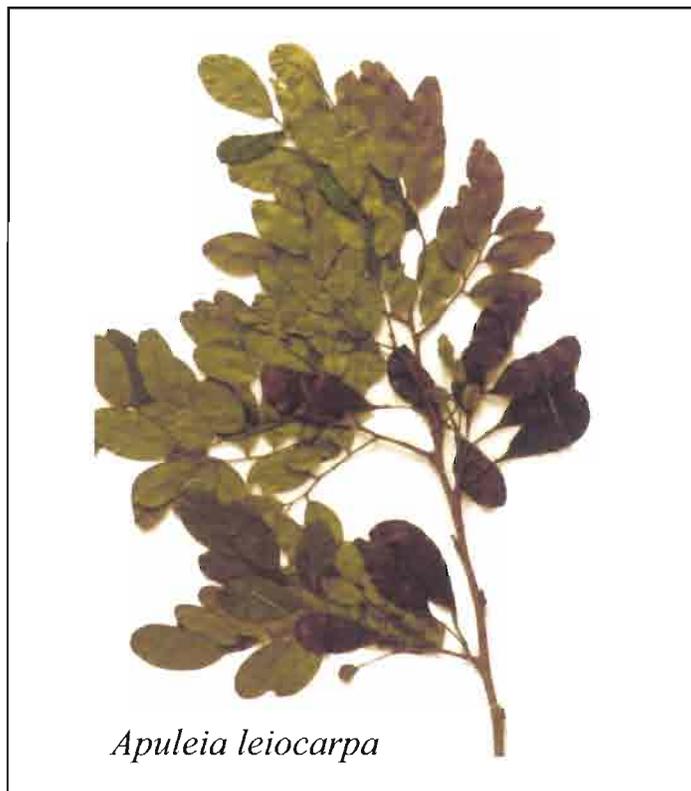


PLANCHE 2

Bauhinia guianensis Aublet (Fabaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Nishipara.
Description	Épaisse liane lignifiée. Les feuilles sont typiquement bilobées, les folioles unies à la base. La tige principale de la liane elle-même est aplatie à intervalles réguliers, lui imprimant une forme sinusoïdale, d'où le nom «d'escalier de singe» donné à ces lianes.
Habitat en Bolivie	Département du Beni, de Santa Cruz.
Indication thérapeutique Chácobo	Diarrhées, maux d'estomac.
Partie utilisée	L'écorce du tronc et des tiges.



PLANCHE 3

Derris amazonica Killip (Fabaceae)

Nom vernaculaire Chácobo Capëhitsa.

Autre nom vernaculaire usité en Bolivie
Barbasco.

Description Liane a bois dur, aux feuilles bipennées, alternes, non épineuses. Les fleurs sont blanches, le fruit est indéhiscent et ailé.

Habitat en Bolivie Département de La Paz, du Beni, du Pando, de Santa Cruz. Forêt amazonienne.

Utilisation Chácobo Ichtyotoxique.

Partie utilisée Racines et tiges.

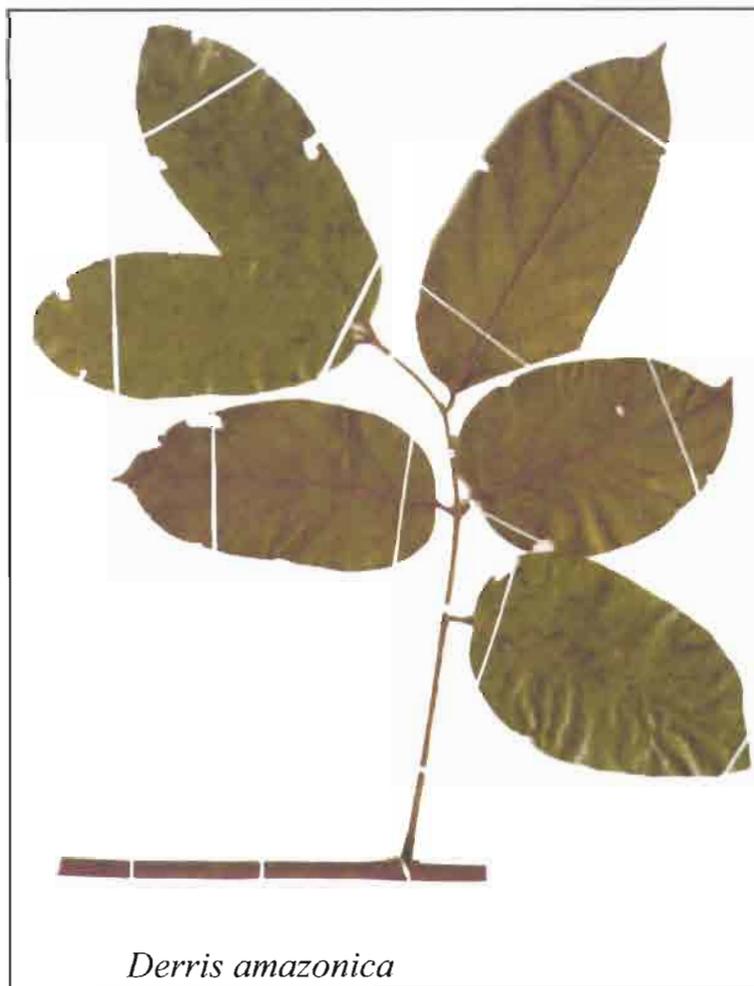


PLANCHE 4

Geissospermum laeve (Vellozo) Miers (Apocynaceae)

Nom vernaculaire Chácobo Jihumoca.

Description Arbre d'environ 10 m. les tiges pubescentes. Présence de latex blanc. Feuilles alternes, spiralées, les nervures secondaires lâches. Fleurs petites. Les fruits sont des baies ovoïdes-ellipsoïdes comprimées. Les graines ne sont pas ailées.

Habitat en Bolivie Département du Pando et du Beni. Forêt amazonienne, des zones basses.

Indication thérapeutique Chácobo Paludisme, vomissements, problèmes hépatiques.

Partie utilisée Ecorce du tronc.



PLANCHE 5

Guatteria aff. schomburgkiana Mart. (Annonaceae)

Nom vernaculaire Chácobo

Ahuabaca

Description

Arbre de taille moyenne (15m), aux feuilles de 15-20 cm de long. Les fleurs sont pubescentes, solitaires et axillaires. Le fruit est apocarpique, constitué de plusieurs monocarpes ellipsoïdes, contenant en général une seule graine.

Habitat en Bolivie

Département de La Paz, du Beni, du Pando. Se rencontre généralement en forêt de piedmont (350m/snm).

Utilisation Chácobo

Construction de maisons, de meubles.

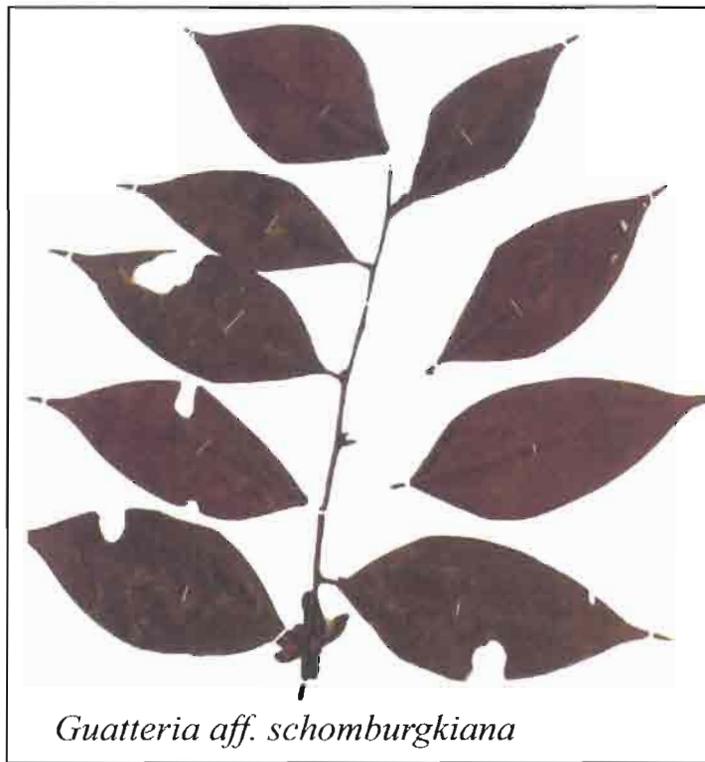


PLANCHE 6

Iryanthera laevis Markgraf (Myristicaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Méquënobita, bita.
Description	Arbre d'environ 20 m. Fleurs petites en racème axillaire ou cauliflore. Fleurit de Juillet à Septembre et fructifie de Août à décembre.
Habitat en Bolivie	Département du Beni, du Pando.
Indication thérapeutique Chácobo	Ampoules et lésions dans la bouche.
Partie utilisée	Sève.
Autres utilisations	Sert de bois d'ébénisterie.

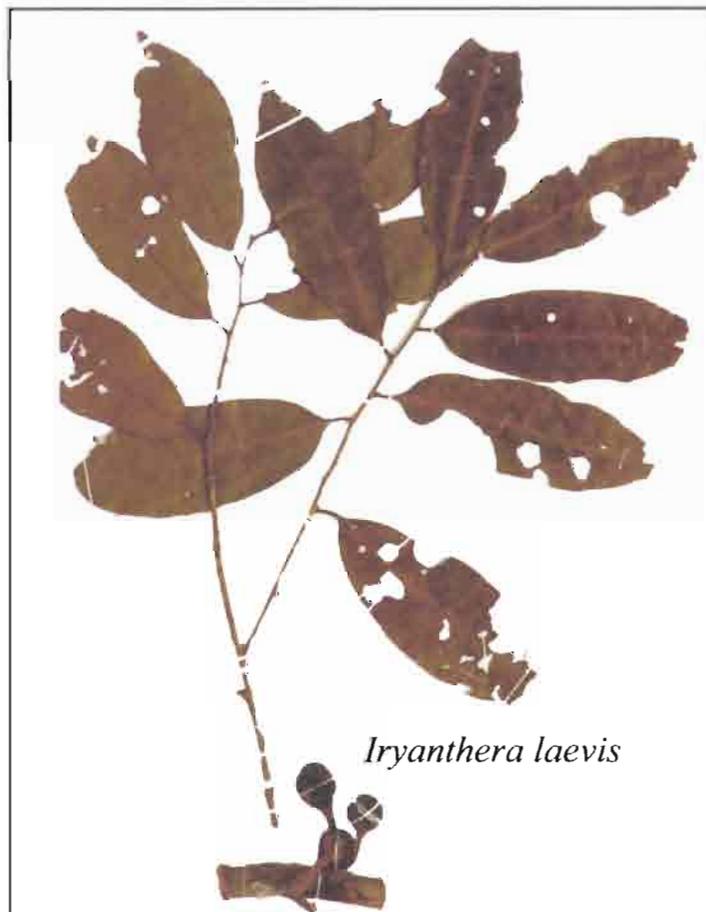


PLANCHE 7

Maquira coriacea (Karsten) C.C. Berg (Moraceae)

Nom vernaculaire Chácobo Huápamo.

Autre nom vernaculaire usité en Bolivie
Bibosi.

Description Grand arbre émergent, pouvant atteindre 40m., avec un latex de couleur crème ou « café au lait ». L'écorce se détache facilement des branches. Les feuilles sont glabres. Les inflorescences sont sphériques ou discoïdes, pédonculées ou sessiles.

Habitat en Bolivie Département de La Paz, du Beni, du Pando.
Se rencontre fréquemment dans les forêts galeries.

Indication thérapeutique Chácobo
Paludisme, fièvre

Partie utilisée Écorce de racines et de tiges.



PLANCHE 8

Mascagnia macrophylla Rusby

Nom vernaculaire Chácobo	Ascana
Description	Liane de forêt primaire, pouvant atteindre plus d'un mètre de diamètre. Feuilles opposées, de grande taille, jusque 35 cm sur 15 cm. Fleurs visible de 2 a 3 cm de couleur jaunes, disposées en panicule lâche. Les fruits son ailes, pouvant atteindre de 5 a 6 cm.
Habitat en Bolivie	Espèce de forêt primaire amazonienne, collectée en Bolivie dans les départements du Pando et du Nord de La Paz.
Indication thérapeutique Chácobo	Le jus, exprimé de l'écorce écrasée avec un peu d'eau se boit trois fois par jour, pour stopper les diarrhées.
Partie utilisée	Ecorce



PLANCHE 9

Nectandra cuspidata Nees. (Lauraceae)

Nom vernaculaire Chácobo Yobini.

Autre nom vernaculaire usité en Bolivie
Laurel.

Description Arbre de 10-12m, aux feuilles ovales-elliptiques d'environ 13 cm de long. Toutes les parties de la plante sont fortement aromatiques. Cette espèce fleurit en Mars, et fructifie en Juin.

Habitat Département de La Paz, du Pando, du Beni. Espèce de forêt amazonienne pouvant se rencontrer en forêt de piedmont, jusqu'à 800m.

Indication thérapeutique Chácobo
Maux d'estomac.

Partie utilisée Ecorce du tronc, des tiges.

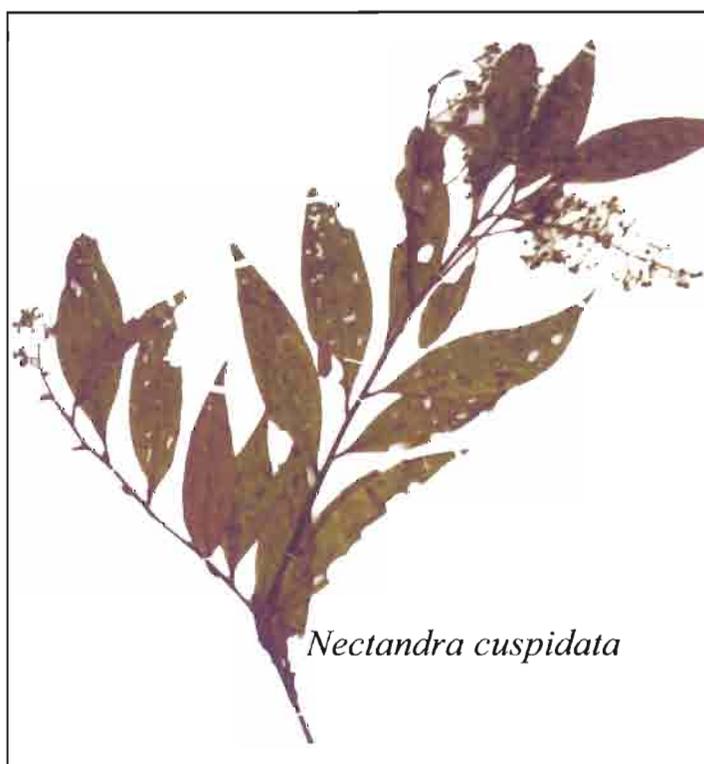


PLANCHE 10

Prunus amplifolia Pilger (Rosaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Jihuiirononopa, jihuí.
Description	Arbre de taille moyenne (10m). Feuilles simples, alternes, finement dentées, quelquefois avec une paire de glandes à la base de la feuille. Fleurs remarquables, en fascicule ou en racime, quelquefois solitaires.
Habitat en Bolivie	Département du Beni, du Pando.
Indication thérapeutique Chácobo	Pour calmer les douleurs dues aux piqûres d'insectes et aux rhumatismes.
Partie utilisée	Ecorce du tronc, des tiges.
Autre utilisation	Fruits comestibles.

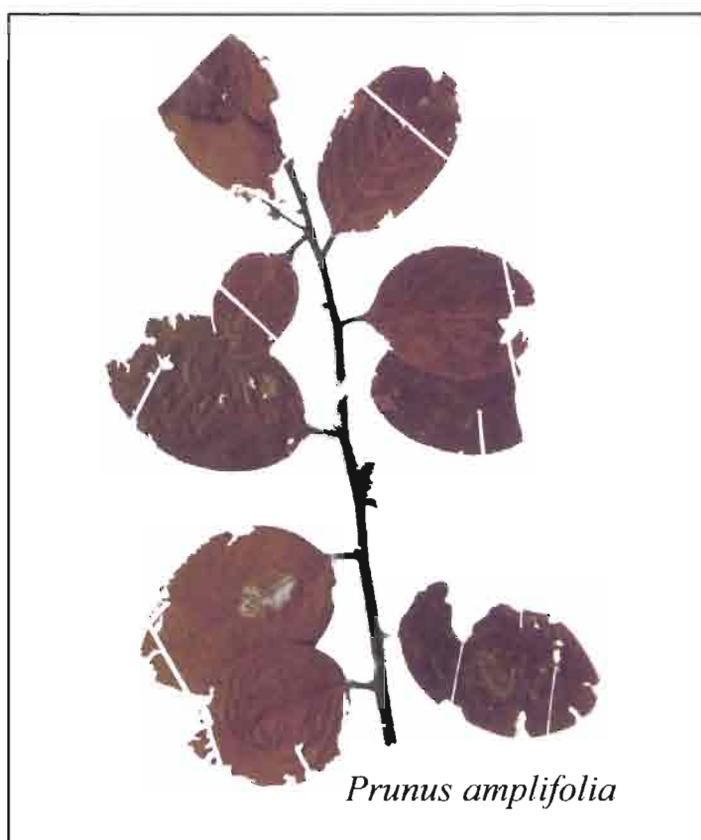


PLANCHE 11

Pterocarpus cf. amazonum (Benth.) Amshoff (Fabaceae)

Nom vernaculaire Chácobo

Capanahahuati

Description

Petit arbre de 4-5m. Les fleurs avec une corolle orangée. Fleurit d'Août à Octobre.

Habitat en Bolivie

Département du Beni et du Pando en zone de savanes humides.

Indication thérapeutique Chácobo

Brûlures.

Partie utilisée

Ecorce des tiges.



PLANCHE 12

Qualea paraensis Ducke (Vochysiaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Nhipëpëcho, Jihui sama.
Description	Arbre pouvant atteindre jusqu'à 35 m. Ecorce externe lisse et dure, avec de petites écailles, exfoliante sur les jeunes tiges. Ecorce interne de couleur brique. Les feuilles sont coriaces, aux nervures parallèles. En fleurs de Septembre à Février.
Habitat en Bolivie	Département du Beni, Pando, la Paz. En forêt amazonienne non inondable.
Indication thérapeutique Chácobo	Gale.
Partie utilisée	Ecorce de tiges.
Autres utilisations	Le bois sert en ébénisterie, pour fabriquer des caisses, des bateaux et des rames. Les fruits sont comestibles.



PLANCHE 13

Sclerolobium aff. *guianense* Benth. (Fabaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Xabahuasicano
Description	Arbre (27 m), aux fleurs jaune-pâle, présentes en Août.
Habitat en Bolivie	Département du Pando, du Beni, (forêt amazonienne).
Indications thérapeutiques Chácobo	Gale.
Partie utilisée	Ecorce du tronc, des tiges.
Autres utilisations	Les troncs servent de poteaux de soutènement des maisons.



PLANCHE 14

Sparattanthelium amazonum Mart. (Hernandiaceae)

Nom vernaculaire Chácobo

Nishitsanone.

Description

Liane. Les feuilles sont oblongues, assez membraneuses et glabres, mesurent 10 à 12 cm de long et de 2,5 à 3,5 cm de large, elles sont trinervées, les nervures fusionnées à leur base.

Habitat en Bolivie

Département du Beni, de Santa Cruz.

Indication thérapeutique Chácobo

Maux d'estomac, vomissements de diarrhées.

Partie utilisée

Ecorce du tronc, des tiges.



PLANCHE 15

Tanaecium jaroba Sw.(Bignoniaceae)

Nom vernaculaire Chácobo	Nishiratëquëya.
Description	Liane. Les feuilles sont opposées, trifoliées ou bifoliées. Les fleurs sont un long tube de couleur blanc-crème. Les fruits, caractéristiques des Bignoniaceae, sont de grosses gousses (17x7 cm).
Habitat en Bolivie	Département du Pando, du Beni, de La Paz, de Santa Cruz. (Forêt amazonienne, et forêt dégradée)
Indication thérapeutique Chácobo	Diarrhées, vomissements, en cas d'inflammations ou de gonflements (après un traumatisme).
Partie utilisée	Ecorce du tronc, des tiges.



6.2. Préparation des extraits bruts

Vingt cinq grammes de la partie de la plante à tester, sont séchés et broyés. La poudre est mise en contact avec le solvant (ethanol – eau 70:30) pendant 48 heures à 25 °C. La solution aqueuse-éthanolique est évaporée dans un rotavapor et le résidu est utilisé dans les tests.

7. SPARATTANTHELIUM AMAZONUM MARTIUS

7.1. Revue de la Famille des *Hernandiaceae*

La famille des Hernandiaceae est une petite famille, composé de 5 genres parmi lesquels deux genres d'arbres à bois tendre (*Gyrocarpus*, *Hernandia*) deux autres à bois dur (*Illigera* et *Valvanthera*), le dernier genre sont des lianes (*Sparattanthelium*).

La famille Hernandiaceae est une famille principalement représentées au Pérou. Ce sont des arbustes et des sous-arbustes grimpants dont les feuilles sont simples avec 3 à 5 nervures principales qui partent depuis la base, les fleurs sont le plus souvent petites, axillaires, paniculées, et le calice est 3-5 valvés. Tous les genres sont facilement reconnaissables par la symétrie trinervée prononcée des feuilles qui sont généralement pétiolées, alternes et très aromatiques (**Killeen et al., 1993**).

- Le genre *Hernandia* est généralement arborescent et comprend 24 espèces, surtout distribuées dans la région Indo-pacifique, avec 5 espèces en Amérique centrale et Amérique du nord.
- Le genre *Illigera* est représenté par 18 espèces, qui sont en majorité des arbustes grimpants ou des lianes.
- Le genre *Gyrocarpus* est représenté par 3 espèces, dont une pan-tropicale.

- Enfin, le genre *Sparattanthelium* est représenté par 13 espèces qui sont des arbustes ou des lianes grimpantes, et sont toutes originaires du nouveau monde.

La majorité des alcaloïdes obtenus à partir d'Hernandiaceae sont isoquinoliques, le plus souvent de type aporphinique ou bisbenzylisoquinolique.

7.2. Description botanique, répartition et classification

L'espèce *S. amazonum* Martius (voir planche 14) est une liane, pouvant s'élever grâce à une structure de tige spéciale, portant des épines, qui sont la base de nouvelles inflorescences. Les feuilles sont monochromatiques, oblongues, assez membraneuses et glabres, et mesurent 10 à 12 cm de long et de 2,5 à 3,5 cm de large. Elles sont trinervées. Les nervures sont laches et étroites. Les pétioles ont de 10 à 20 mm de longueur. L'inflorescence est un panicule corymbiforme, les fleurs sont bisexuées et ont 1 mm de long. Les fruits sont des drupes grises ou argentées, ovoïdes. L'infrutescence est dichotomique, pendante et présente des noeuds au niveau des ramifications.

Cette espèce se trouve en Amérique Centrale (Costa Rica, Nicaragua, Panama), et en Amérique du Sud (Bolivie, Colombie, Equateur, Pérou) (Kubitzki, 1982). En Bolivie l'espèce se trouve dans les départements du Beni, du Pando et de Santa Cruz. (Chávez de Michel, 1999).

Classification botanique

Règne	Plantae
Sous-règne	Spermatophyta
Division	Angiosperma
Classe	Dicotyledoneae
Sub classe	Archilamydeae
Ordre	Ranales
Famille	Hernandiaceae
Genre	<i>Sparattanthelium</i>
Espèce	<i>amazonum</i>

7.3. Utilisation médicinale

Une décoction préparée à partir des feuilles ou de l'écorce de cette espèce est ingérée par les Chacobos comme antidiarrhéique et vomitive. Cette même préparation sert également à soigner les "douleurs d'estomac" (Boom, 1987, Bergeron, 2000).

8. ISOLEMENT DE (-)-ROEMREFIDINE

L'écorce de tronc de *Sparattanthelium amazonum* (700g) séchée et dégraissée est extraite au moyen de 2 litre d'éthanol (95%) pendant 72 heures. La solution alcalinisée par NH₄OH et extraite avec du dichlorométhane ce qui conduit à 0.8 g d'extrait brut d'alcaloïdes (1.14%). L'extrait alcaloïdique est chromatographié sur Sephadex LH-20 (35 g, 1x 92 cm), élué avec un mélange CH₂Cl₂ : MeOH (50:50) et donne 5 fractions de 50 ml. La troisième fraction (523 mg) la plus active est passée en chromatographie (CC) sur Sephadex LH-20 (35 g, 1 x 92 cm) éluée avec du MeOH et donne 12 fractions de 50 ml. Les fractions actives (3-5, 318 mg) sont rassemblées et

soumises à une CC sur polyamide (Ac-6) 50g, 2 x 30 cm). L'élution est effectuée avec un mélange CH₃OCH₃ : MeOH (90:10) et donne 16 fractions de 50 ml. Les fractions actives sont rassemblées (5-7, 41 mg) et recristallisées avec un mélange d'acétate d'éthyle : MeOH (70:30) conduisant à un cristal blanc (31 mg) de roemréfidine (Mollinedo 1995).

B. MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET DES PRODUITS PURIFIÉS

1. SOUCHE DE *PLASMODIUM* UTILISÉES

4 souches de *P. falciparum* ont été utilisées au cours de ce travail. Elles ont été choisies pour leur degré de sensibilité à la chloroquine et leur capacité à former des protubérances à la surface du globule rouge. Les souches dites K⁺ forment des "knobs" (protubérances "en bouton" denses aux électrons) sur la membrane des hématies parasitées par des formes âgées du parasite. En revanche, les souches dites K⁻ ne présentent pas de "knobs".

Le seuil de résistance à la chloroquine est de 70 nM (Le Bras et al, 1998).

-FCB1-Colombia. Elle est connue pour sa chloroquinorésistance avec une CI₅₀ de 200 ± 5 ng/ml (1). Cette souche est K⁺.

-W2-Indochina. Est chloroquinorésistante, avec une valeur de CI₅₀ de la chloroquine de 167 nM. Cette souche est knobs⁺.

-F32-Tanzania. Est chloroquinosensible, avec une valeur de CI₅₀ de la chloroquine de 30 nM. Cette souche est knobs⁺

-FcM29. Est chloroquinorésistante, avec un valeur de CI₅₀ de la chloroquine de 150 ± 18 ng/ml.

Les espèces plasmodiales de muridés utilisées proviennent du Laboratoire de Biologie Parasitaire du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (Pr. I. Landau).

Ces espèces présentent des caractéristiques biologiques bien définies :

-*Plasmodium vinckei petteri* **279BY** présente un cycle schizogonique érythrocytaire de 24 heures très synchrones ce qui permet d'obtenir une quantité importante de parasites au même stade de développement. La durée de chaque stade est de 6 heures environ. Cette caractéristique permet l'étude directe de l'efficacité d'une drogue sur un stade donné sans passer par des étapes de synchronisation nécessaires avec des espèces asynchrones. Le stade trophozoïte moyen est le stade le plus sensible à la chloroquine (**Landau et Gautret, 1998**)

-*Plasmodium berghei* **NK65** présente un cycle schizogonique érythrocytaire de 21 heures moins synchrones que celui de *P. vinckei*. Il présente une affinité pour les réticulocytes (**Landau et Gautret, 1998**).

2. CULTURE IN VITRO DE *P. FALCIPARUM*

P. falciparum est maintenu en culture continue selon une technique dérivée de la méthode originale proposée par **Trager et Jensen en 1976**. Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St Louis, USA), qui contient 25 mM d'Hepes (Gibco BRL, Life Technologies, Scotland) et 30 mM de NaHCO₃ (Sigma Chemical Co, St Louis, USA). Le pH est ajusté à 7.3. Ce milieu sans sérum est ensuite filtré sur filtre Millipore (Bedford U.S.A.) de 0,22 µm puis stocké à 4°C s'il n'est pas utilisé aussitôt. Le RPMI peut également être congelé. Du sérum humain décomplémenté (30 minutes à 56°C), groupe 0+, provenant d'un mélange de sérums, est ajouté à de concentration de 5 % à 20 % (v/v). Ce sérum est conservé à une température de -20°C.

Les hématies saines sont préalablement lavées et centrifugées (1000g, 10 minutes) deux fois avec le milieu RPMI sans sérum. La parasitémie de chaque boîte est

contrôlée au moyen d'un frottis coloré au Giemsa (Merck, France). Les hématies parasitées ne doivent pas dépassées 5% du total des hématies. Quand la parasitémie est supérieure à 5%, elle est réajustée à 1% par dilution avec des hématies saines.

La culture est réalisée dans des boîtes de Petri (Fisher, France) et maintenue dans une récipient fermé type "Candle Jarr" contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé quotidiennement.

3. SYNCHRONISATION

La culture de *P. falciparum* perd spontanément la synchronisation décrite *in vivo* après quelques cycles.

Des techniques de synchronisation ont été développées pour sélectionner soit:

- des stades jeunes (anneaux et trophozoïtes jeunes) par du D-sorbitol selon la technique de **Lambros et al., (1979)**.

- des stades âgés (trophozoïtes âgés et schizontes) au moyen d'une solution de gélatine. Cette technique s'applique de préférence aux souches générant des protubérances ou knobs à la surface des globules rouges parasités (**Pasvol et al., 1978**)

3.1. Concentration des formes jeunes : Synchronisation au D sorbitol

Cette technique permet de débarrasser la culture des stades âgés. En effet, la perméabilité membranaire des globules rouges parasités par les stades âgés de *P. falciparum* est fortement modifiée par rapport aux hématies normales en raison de l'activité métabolique parasitaire intense. Le D-sorbitol est alors capable de pénétrer massivement dans le globules rouges entraînant une entrée d'eau qui provoque la lyse osmotique des hématies parasitées par des stades mûrs (**Kutner et al. 1987**). Seules les

formes jeunes supportent ce traitement. Cette méthode permet d'obtenir une population de formes jeunes dont l'âge est compris entre 0 et 20 heures (cycle de 48 h).

Une solution de D-sorbitol à 5% (p/v) stérile est préparée puis préchauffée à 37°C, avant son utilisation. Les cultures sont préalablement centrifugées à 600 g pendant 5 min et le culot d'hématies est remis en suspension dans 9 fois son volume de D-sorbitol 5%. Après une incubation de 10 min à 37°C, le mélange est centrifugé à 600g pendant 5 minutes, un frottis est réalisé et le culot est remis en culture.

3.2. Concentration des formes âgées par flottation

Les membranes des hématies infectées par des stades âgés et les schizontes de *P. falciparum* de certaines souches de parasites présentent des protubérances denses aux électrons, les knobs.

Dans une solution de gélatine, la vitesse de sédimentation de ces hématies est plus lente que celle des hématies non parasitées ou parasitées par des formes jeunes, les érythrocytes parasités par des formes âgées restent donc en suspension en surface. Cette technique permet d'obtenir des parasitémies voisines de 90% avec essentiellement des formes âgées (**Jensen, 1978, Pasvol et al., 1978**).

La solution à 5 % de gélatine (Plasmagel[®]) est livrée prête à l'emploi et est conservée à 4°C. Avant son utilisation, il faut la préchauffer à 37°C pour ne pas endommager les parasites. Les cultures sont centrifugées à 600g pendant 5 minutes et le culot est remis en suspension dans 3 fois son volume de milieu de culture et 4 fois son volume de solution de gélatine. Après une incubation de 30 min à 37°C, la phase supérieure qui contient les parasites âgés est récupérée sans créer de turbulences, puis centrifugée et le culot remis en culture à la parasitémie et à l'hématocrite souhaités.

4. MICROMÉTHODE RADIOISOTOPIQUE

Cette méthode proposée par **Desjardins et al. (1979)**, est fréquemment utilisée pour déterminer les propriétés antimalariques des extraits végétaux (**O'Neill et al., 1985**). L'étude est réalisée au moyen de microplaques de 96 puits. Une suspension érythrocytaire infectée par des parasites synchronisés au stades jeunes (hématocrite 2 %, parasitémie 1 %) est distribuée dans chaque puit à raison de 100 μ l par puit. Les plaques sont incubées à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO₂ en présence de 100 μ l de milieu contenant la drogue à tester à des dilutions décroissantes. Chaque drogue est testée en triplicat. La croissance parasitaire est déterminée par la mesure de l'incorporation d'un précurseur marqué des bases puriques: l'hypoxanthine tritiée (Amersham, France). En effet *Plasmodium* ne synthétise pas les bases puriques et est donc tributaire d'un apport exogène pour la synthèse de ses acides nucléiques. **Inselburg et Banyal (1984)** ont démontré que le parasite synthétisait l'ADN au moment de la phase S qui commence à la 30ème heure pour un cycle de 48 heures. Avec la phase S commence la schizogonie au cours de laquelle l'ADN parasitaire augmente de façon logarithmique.

Les temps de contact entre extraits et parasites sont, dans notre cadre expérimental, de 24, 48 et 72 heures. Une fois les temps respectifs écoulés, les cellules sont congelées puis décongelées pour provoquer une lyse puis filtrées sur filtre Skatron[®] (Fisher, France) à l'aide d'un collecteur semi automatique à 12 canaux (Semi automatic Cell Harvester, Skatron, DK). Les pastilles de filtres séchées sur lesquelles les acides nucléiques ont été retenus sont distribuées dans des tubes à scintillation avec 2 ml de liquide de scintillation (Scinti Verse USA). La radioactivité est mesurée dans un compteur beta (Hewlet Packard, TRI-CARB, 1900 CA, USA) et les résultats exprimés en coups par minutes (cpm).

Le pourcentage d'inhibition est calculé de la façon suivante:

$$\% \text{inhibition} = 100 - \frac{X - Bf}{Tem - Bf} \times 100$$

X = moyenne des cpm pour trois puits, pour une dilution donnée de l'extrait à tester

Bf = bruit de fond, dosage du témoin (200 μ l de RPMI, 5% sérum humain + 2 μ l de hématies saines)

Tem = témoin de globules rouges parasités non traités

Les CI_{50} son déterminées en utilisant la méthode graphique: les courbes montrent le pourcentage d'inhibition du développement du parasite vs le logarithme du concentration de la drogue, la CI_{50} correspond à la concentration inhibant de 50% la croissance de *P. falciparum*.

5. METHODE VISUELLE

Cette méthode est semblable à la méthode radioisotopique mais ne fait pas intervenir de produits radiomarqués. Elle consiste à répartir dans des microplaques de 96 puits, 100 μ l par puit d'une suspension globulaire infectée par des parasites synchronisés au stades jeunes (hématocrite 5 %, parasitémie 1 %). Les plaques sont incubées dans une "candle jar" à 37°C en présence de 100 μ l de milieu contenant la drogue à tester à des dilutions décroissantes. Chaque drogue est testée en triplicat. Comme pour la méthode isotopique, les solvants servent de témoins. La croissance parasitaire est déterminée par la lecture de frottis colorés au Giemsa réalisés pour chaque alvéole 72 heures après le début de l'expérience. Le milieu de culture contenant la drogue est remplacé chaque jour.

Le pourcentage d'inhibition est calculé de la façon suivante:

$$\% \text{inhibition} = \left(\frac{\% \text{ de parasitémie du témoin} - \% \text{ de parasitémie de la drogue}}{\% \text{ de parasitémie du témoin}} \right) \times 100$$

Les CI_{50} sont obtenues de la même façon que pour la méthode isotopique.

6. TEST DE POTENTIALISATION

Le principe consiste à déterminer la dose efficace 50 de la chloroquine ou d'un autre antimalarique en présence de doses croissantes de l'extrait végétal à probable activité potentialisatrice.

Pour ce test, nous avons modifié la méthode isotopique décrite précédemment. Au lieu d'ajouter 100 μl d'extrait végétal nous en ajoutons seulement 50 μl plus 50 μl d'un antimalarique classique à des concentrations subinhibitrices

6.1. Isobogrammes

L'isobogramme est une représentation graphique utilisée en pharmacologie pour visualiser et interpréter l'activité résultante de l'association de deux molécules (Martin et al. 1987, Ratsimamanga-Urverg et al., 1994, Chawira et Warhurst, 1987, Basco et al. 1991).

Il se construit de la manière suivante:

-en abscisse :

$$IC_{50} \text{ fractionnelle de la drogue 1} = \frac{IC_{50} \text{ drogue 1 combinée}}{IC_{50} \text{ drogue 1 seule}}$$

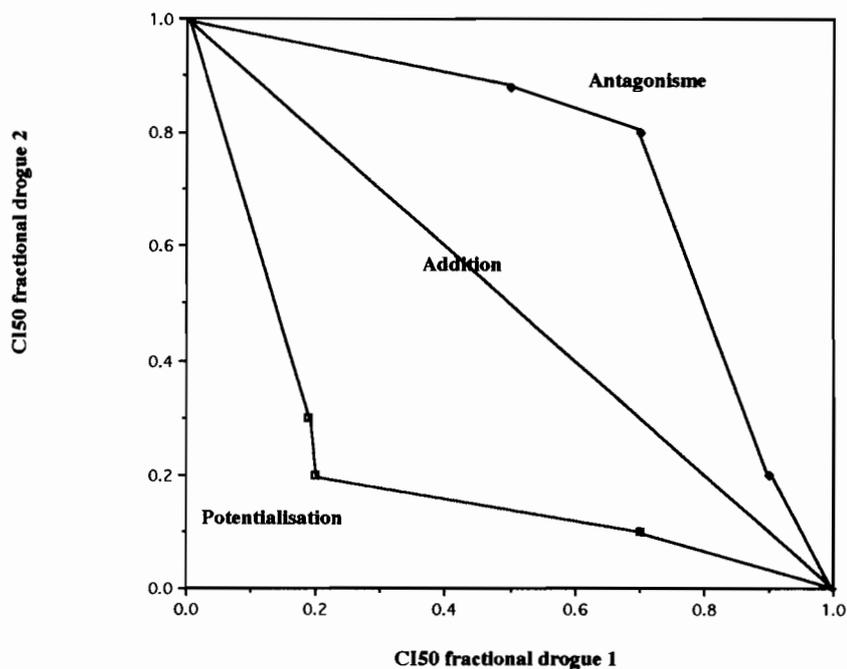
-en ordonnée:

$$IC_{50} \text{ fractionnelle de la drogue 2} = \frac{\text{Concentration subinhibitrice de la drogue 2}}{IC_{50} \text{ drogue 2 seule}}$$

Ces deux fractions constituent les coordonnées d'un point reporté sur le graphique.

Ce procédé est suivi pour chacune des concentrations utilisées. La courbe obtenue est comparée à la droite qui unit les deux extrémités du graphique correspondantes au 100% de chaque échelle (**Figure N° 7**).

FIGURE N° 7 : ISOBOLOGRAMME D'INTERACTION ENTRE DEUX DROGUES



6.1.1. Interprétation d'un isobologramme:

-Dans le cas où les deux molécules se substituent mutuellement, la courbe suit la diagonale. Il s'agit d'une synergie additive.

-Dans le cas où les deux molécules accentuent mutuellement leur activité respective la courbe est concave, il s'agit d'une synergie potentialisatrice.

- A l'inverse quand la courbe est convexe (au dessus de la diagonale), l'inhibition mutuelle des activités indique un antagonisme.

-

6.1.2. L'index de potentialisation du pouvoir schizonticide de la chloroquine "activity enhancement index" AEI

L'AEI est calculée en divisant la valeur de la CI_{90} de la chloroquine seule par celle de la chloroquine associée aux différentes doses de produits. Seules les valeurs de l'AEI supérieures à 1,5 traduisent l'existence d'une potentialisation (**Basco et al., 1991**). Cet index est utilisé dans le cas où le produit associé n'a pas d'activité antimalarique intrinsèque.

7. TEST DE PERMEABILITE MEMBRANAIRE

Lors de son développement intraérythrocytaire, le parasite induit des changements drastiques de la perméabilité de la cellule hôte qui sont détectables 6 heures après le début de l'invasion (**Ginsburg, 1987 a et b, 1990, Kutner et al., 1982, 1985**). Il active de nouvelles voies de transport afin d'assurer la pénétration de solutés indispensables à sa croissance, comme par exemple, des carbohydrates, des bases puriques, des acides aminés ou des acides carboxyliques. De ce fait, toute intervention bloquant les nouvelles voies transmembranaire est susceptible d'inhiber la multiplication parasitaire.

L'étude de l'action d'une drogue sur le transport repose sur la technique proposée par **Kutner et al., (1987)**. Des globules rouges parasités par la souche F32 de *Plasmodium falciparum* sont synchronisés par la technique de **Lambros et al. (1979)**. Les globules (parasitémie >70% remis en suspension dans du RPMI sans sérum,

hématocrite de 0.5%) sont lavés au moyen d'un tampon phosphate (phosphate de sodium 10mM, NaCl 150mM, pH 7.4). Ils sont ensuite alicotés dans 4 tubes eppendorf.

Dans le premier est tube est ajoutée une solution de sorbitol à 5%, dans le deuxième un tampon PBS à pH 7.4, dans le troisième de l'eau distillé (standard) et le quatrième reçoit la solution contenant la drogue à une concentration double de son CI50.

Les essais sont réalisés en duplicat, à température ambiante. 200 μ l d'échantillons sont prélevés à 1, 5, 30, et 60 min, transférés dans des tubes Eppendorff et centrifugés.

Le surnageant est transféré dans un plaque de 96 puits et lu à 405 nm dans un lecteur de microplaque (Multiskan MCC/340, Titertek USA). L'absorbance de l'hémoglobine est déterminée pour permettre le calcul du pourcentage de lyse.

$$\% \text{ de lyse} = \frac{\text{D.O échantillon}}{\text{D.O standard}} \times 100$$

Un graphique % de lyse versus temps est tracé.

8. LE TEST SUPPRESSIF DE 4 JOURS (D'APRÈS PETERS, 1988)

Le test suppressif de 4 jours utilise des souris mâles (Swiss albinos) de 20 ± 2 g (4-6 semaines) maintenues à 22°C (+2°C) avec un régime standard *ad libitum*. Il est préférable d'utiliser des souris ne pesant que 20 ± 2 g car la susceptibilité au développement parasitaire et aux traitements diminue avec l'âge.

Au jour JO, du sang fortement parasité (30% de parasitémie) est prélevé par voie rétro-orbitaire et dilué dans du sérum physiologique de façon à injecter aux souris

receveuses, par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, 0.1 ml de sang contenant 10^6 parasites.

Les extraits de plantes sont mis en suspension ou dissouts par agitation ou sonication dans un solvant approprié (sérum physiologique, DMSO, éthanol, Tween 80). L'administration se fait à des doses comprises entre 100 - 1000 mg/kg par voie orale, intrapéritonéale, sous cutanée ou intraveineuse 2 heures après l'infestation puis tous les jours à la même heure pendant 4 jours. Dans le cadre d'un criblage à grande échelle, une seule dose est administrée.

Au 5^{ème} jour, des frottis sont réalisés en prélevant une goutte de sang à la queue des souris. Ils sont ensuite colorés au Giemsa et les parasitémies déterminées afin de calculer les CI50. Les frottis sont examinés au microscope sous un grossissement x1000, et le pourcentage de globules rouges parasités est déterminé sur environ 9000 cellules pour chaque concentration. Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé à partir de la formule suivante:

$$\frac{(\text{parasitémie du témoin} - \text{parasitémie avec l'extrait}) \times 100}{\text{parasitémie du témoin}} = \% \text{ d'inhibition}$$

9. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ CELLULAIRE *IN VITRO* AU MOYEN DE LA MÉTHODE À LA SULFORHODAMINE B (SRB)

La toxicité des différents composés est évaluée sur cellules KB (Cellules de carcinome épidermoïde humain), HeLa (carcinome utérine) et Hep-2 (carcinome épidermoïde laryngé humain).

Ces lignées cellulaires sont cultivées dans des boîtes de culture de 25 cm² (Corning) dans un milieu essentiel Minimum Eagle (MEM) Sigma, supplémenté avec du bicarbonate de sodium 7,5%, 10 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et

5% de sérum veau foetal. Les boîtes sont incubées à 37°C, avec une humidité de 90% et 5% de CO₂.

Les subcultures sont obtenues après le décollement des cellules par agitation en présence d'une solution de trypsine (Sigma T8918) à 0,25% et de EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique 0,02%, Sigma E4884) pendant 5 – 10 min à 37°C.

Les cellules sont comptées à l'aide d'une chambre de Neubauer, puis lavées avec le milieu de culture sans sérum. Pour la détermination de la toxicité *in vitro* des composés, les cellules sont distribuées à raison de $2,0 \times 10^4$ cellules dans 100 μ l de MEM supplémenté par 10% de sérum bovin foetal dans chaque alvéole de la plaque de 96 puits. 100 μ l de chaque concentration de drogues à tester, dissoutes dans le MEM, sont ajoutés dans les puits. Chaque drogue est évaluée en triplicat. Les plaques sont incubées 72 heures puis les cellules sont fixées par une solution de 50 μ l d'acide trichloroacétique froid à 50%. Après une incubation d'une heure à 4°C, les puits sont lavés 4 fois à l'eau distillée et la plaque est séchée à température ambiante. Les cellules sont ensuite colorées avec 100 μ l de SRB (Sigma USA) à 0,4% dans de l'acide acétique glacial à 1% durant 30 min. La plaque est ensuite rincée 4 fois avec une solution d'acide acétique à 1%, puis est séchée à température ambiante. Le colorant fixé aux protéines est dissout par 200 μ l de tris base 10 mM, pH 10, pendant 5 min en agitation constante. La densité optique (D.O.) est lue à 492 nm sur lecteur de microplaques (Multiskan MCC/340, Titertek USA). Le pourcentage de développement des cellules KB de chaque alvéole est calculé de la façon suivante:

$$\% \text{ de développement} = \frac{\text{D.O (cellules+drogue)} - \text{D.O (jour zéro)}}{\text{D.O (cellules sans drogue)} - \text{D.O. (jour zéro)}} \times 100$$

Le contrôle jour zéro consiste en un nombre identique de cellules dans 200 μ l de MEM à 5%, laissées reposées 30 min, au bout desquelles elles sont fixées par de l'acide

trichloroacétique froid à 50%, lavées 4 fois avec de l'eau distillée, séchées et conservées jusqu'à la lecture.

Les valeurs de D.O. obtenues sont ensuite portées sur un graphique versus le logarithme de la concentration des drogues respectives. Les valeurs des CI₅₀ sont calculées par interpolation linéaire (**Skehan et al., 1990, Likhitwitayawuid et al., 1993**).

RESULTAT ET DISCUSSION

Évaluation de l'activité antimalarique de plantes utilisées par les indiens Chacobo.

PUBLICATION 1

La découverte d'un grand nombre de médicaments d'origine végétale résulte d'études scientifiques de plantes connues et employées dans la médecine traditionnelle. Au cours des années 70 la mise au point des cultures continues de *Plasmodium falciparum* (Trager et al., 1976) et le test radioisotopique ont permis de faciliter l'étude des substances potentiellement antimalariques (Desjardins et al., 1979). Par ailleurs les études *in vivo* ont été largement améliorée par le remplacement des *Plasmodium* d'oiseaux par les *Plasmodium* de rongeur à la fin des années soixante (Landau et Gautret 1998).

C'est grâce à ces avancées techniques que nous avons pu mettre en place une batterie de tests pour l'évaluation des pharmacopées traditionnelles boliviennes.

En effet, la malaria reste un problème de santé publique majeur en Bolivie et les connaissances ancestrales du milieu végétal en tant que source de traitement thérapeutique sont particulièrement menacées en raison :

- des phénomènes migratoires des populations
- de leur aculturation rapide
- des catastrophes écologiques

Il est donc essentiel de récupérer au plus vite ce savoir, afin si ce n'est de proposer des traitements révolutionnaires, pour le moins de valider des usages et les faire connaître à l'ensemble de la population des pays en voie de développement. Un autre objectif est celui de participer au développement durable des communautés tout en assurant la protection du milieu ambiant.

L'étude de l'activité antimalarique des plantes médicinales utilisées par le groupe Chacobo fait donc partie de notre grand programme intitulé Substances naturelles

antimalariques . 156 espèces végétales différentes sont utilisées par les Chacobo pour soigner ou soulager divers symptômes ou maladies (**Bergeron 1993, Bergeron 2000**). Parmi celles-ci, nous avons sélectionné 30 espèces pour l'évaluation de leur activité biologique au moyen de tests *in vitro* et *in vivo*.

Pour le test *in vitro*, nous considérons que si les extraits présentent une CI_{50} :

- < 5 $\mu\text{g/ml}$, l'activité antimalarique est très bonne;
- de 5 à 10 $\mu\text{g/ml}$, l'activité est bonne;
- au dessus de 10 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait est inactif.

L' IC_{50} de la chloroquine est de 6.3 ng/ml sur la souche F32 et de 30 ng/ml sur la souche Indo. L'activité d'un extrait éthanolique d'écorce de *Cinchona calisaya* est de 0.2 $\mu\text{g/ml}$.

Nous classons les résultats *in vivo* de la manière suivante :

- à la dose de 100 mg/kg/jour, si le pourcentage d'inhibition de croissance est supérieur ou égal à 50%, l'activité antimalarique est considérée comme excellente;
- à la dose de 250 mg/kg/jour, si le pourcentage d'inhibition de croissance est supérieur ou égal à 50 %, l'activité est considérée comme bonne;
- à la dose de 500 mg/kg/jour, si l'extrait étudié présente un pourcentage d'inhibition de croissance supérieur ou égal à 50%, l'activité est considérée comme modérée.

Une dose de chloroquine de 5 mg/kg/jour inhibe à 100% la croissance des deux souches de *Plasmodium* de muridés utilisées. Une dose de 250 mg/kg d'un extrait éthanolique d'écorce de *Cinchona calisaya* inhibe 91% du développement parasitaire.

In vitro

3 extraits de plantes: (*Geissospermum laeve*, *Mascagnia macrophylla*, *Sparattanthelium amazonum*) montrent une très bonne activité antimalarique sur les deux souches avec des IC_{50} comprises entre 1.7 et 3.1 $\mu\text{g/ml}$, comparable à l'activité de *Artemisia annua* et de certaines Simaroubaceae (**O'Neill et al. 1985**). Un extrait

(*Guatteria* aff. *schomburkiana*) montre une très bonne activité (IC₅₀ 4 µg/ml) sur la souche Indo mais s'est révélé inactif sur la souche F32, tandis qu'un extrait (*Derris amazonica*) s'est montré actif sur F32 et inactif sur la souche Indo. L'extrait de *Maquira coriacea* s'est montré actif sur la souche Indo.

Ces résultats indiquent que 6 extraits ont une bonne activité antimalarique soit 21% des extraits sélectionnés. Cependant aucun d'eux ne s'est montré aussi actif que l'extrait d'écorce de *Cinchona calisaya*.

In vivo

Dans le modèle de *P. vinckei*, 3 extraits ont montré une très bonne activité (*Bauhinia guianensis*, *Maquira coriacea*, *Qualea paraensis*) et 5 plantes ont montré une bonne activité (*Nectandra cuspidata*, *Pterocarpus amazonum*, *Sclerolobium* aff. *guianense*, *Sparattanthelium amazonum*, *Tanaecium jaroba*).

Dans le modèle de *P. berghei*, un extrait a montré une très bonne activité (*Iryanthera laevis*) et 4 extraits ont montré une bonne activité (*Nectandra cuspidata*, *Tanaecium jaroba*, *Apuleia leiocarpa*, *Prunus amplifolia*). Trois espèces, *Nectandra cuspidata*, *Tanaecium jaroba* et *Geissospermum laeve* ont montré une bonne activité contre les deux souches tout comme précédemment *in vitro*.

Sur les 30 espèces évaluées *in vivo* contre *P. vinckei* et/ou *P. berghei*, 11 (36%) ont montré une intéressante activité antimalarique, alors que seulement 21% étaient actifs *in vitro*. Cette différence peut s'expliquer par l'absence des processus métaboliques en culture.

Sur les quatre espèces désignées par les Chacobos comme antimalariques, 2 d'entre elles ont montré une bonne activité *in vitro* et *in vivo*, corroborant l'usage traditionnel.

Parmi les 12 espèces utilisées traditionnellement contre des symptômes en relation avec des accès palustres, 5 extraits pourraient être retenus pour des études approfondies.

Un seul extrait s'est montré uniquement actif *in vitro* (*Mascagnia macrophylla*), alors que trois extraits furent actifs uniquement *in vivo*.

Un seul extrait s'est révélé à la fois actif *in vitro* et *in vivo*, *Sparattanthelium amazonum*, C'est donc une priorité de recherche.

Deux espèces utilisées contre la gale (sous forme de bains) ont montré une intéressante activité *in vivo* ainsi que quatre autres espèces utilisées également pour des symptômes sans relation avec la malaria.

Finalement, une espèce (*Derris amazonica*) utilisée comme ichtyotoxique a montré une bonne activité *in vitro*, de même une Annonaceae, *Guatteria* aff. *Schomburgkiana*, utilisée en construction.

Chez les Chacobo quand quelqu'un est malade il reçoit un premier traitement qui est substitué par un autre traitement etc. jusqu'à ce que la personne soit guéri. De ce fait il n'est pas facile de déduire si une plante possède vraiment une activité intrinsèque, raison pour laquelle il serait plus judicieux d'évaluer le groupe de plantes utilisées conjointement pour traiter une symptomatologie.

Par ailleurs, il faut tenir compte du fait que les traitements traditionnels s'adressent en premier lieu à des populations qui présentent un certain degré de protection immunologique, immunité qui n'est pas retrouvée chez les animaux de laboratoire. La réputation traditionnelle de certaines plantes pourraient être due à un pouvoir immunomodulateur plutôt qu'à une action directe sur les parasites.

Un autre aspect pouvant influencer sur l'activité antipaludique est la voie d'administration. Il serait en effet préférable d'opter pour la voie orale qui se rapproche le plus de la voie traditionnelle.

Il est évident que les tests utilisés ont des limitations. Cependant nous considérons que la sélection d'espèces basée sur une approche ethnopharmacologique couplée à des données chimiotaxonomiques et suivie par des tests biologiques, est une méthode valable pour la détection de molécules antimalariques.



ELSEVIER

Journal of Ethnopharmacology 69 (2000) 127–137

Journal of
ETHNO-
PHARMACOLOGY

www.elsevier.com/locate/jethpharm

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

V. Muñoz ^a, M. Sauvain ^b, G. Bourdy ^b, J. Callapa ^a, S. Bergeron ^c, I. Rojas ^a,
J.A. Bravo ^d, L. Balderrama ^d, B. Ortiz ^e, A. Gimenez ^f, E. Deharo ^{b,*}

^a Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA), CP 641, La Paz, Bolivia

^b Mission IRD (ex ORSTOM), Institut de Recherche pour le Développement, CP 9214, La Paz, Bolivia

^c Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA), CP 9241, La Paz, Bolivia

^d Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), UMSA, CP 303, La Paz, Bolivia

^e Departamento del Beni, Alto Ivó, Bolivia

^f Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas (IIFB), UMSA, Av. Saavedra # 2224, La Paz, Bolivia

Received 1 August 1998; received in revised form 1 August 1999; accepted 17 August 1999

Abstract

Thirty extracts of plants traditionally used by the Chacobos, a native community living in the Amazonian part of Bolivia, were screened in vitro and/or in vivo for antimalarial activity. Two of the four species designated as antimalarial, *Geissospermum laeve* and *Maquira coriacea*, displayed rather good activity, corroborating their traditional uses. However, they did show a rather high toxicity in vivo. Among twelve species used to cure symptoms relevant to malaria, five showed good activity: *Apuleia leiocarpa*, *Bauhinia guianensis*, *Nectandra cuspidata*, *Sparatanthelium amazonum*, *Tanaecium jaroba*. Two species, *Qualea paraensis* and *Sclerolobium* aff. *guianense*, used to treat scabies, showed interesting antimalarial activity in vivo; three other species (*Iryanthera laevis*, *Prunus amplifolia*, *Pterocarpus* aff. *amazonum*) used for various medicinal purposes, apparently not related with a *Plasmodium* infection, also showed antimalarial activity. Finally, one species (*Derris amazonica*) used as a piscicide displayed good in vitro activity, in the same way as one Annonaceae, *Gutteria* aff. *schomburgkiana*, used for construction purposes. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Plasmodium*, Antimalarial agents; Traditional medicine; Bolivia; Medicinal plants; Chacobo

1. Introduction

The endemic region of malaria in Bolivia covers an area of 821 346 km², i.e. 75% of the country's

* Corresponding author.

land surface. More than three million people are exposed to this disease, and a recent epidemiological study (Ministerio de Desarrollo Humano, 1996) showed a spectacular rise of cases: from 9774 in 1981 to 46911 in 1995. This deterioration is concentrated in the Amazonian areas, where the vector *Anopheles darlingi* and two *Plasmodium* species, *P. falciparum*, responsible for the most severe cases of malaria (7.2% of the cases), and *P. vivax* (92.8% of the cases) coexist. Under Amazonian climatic conditions both vector and parasite find an environment for persistent transmission all year round.

The Chacobos are a Bolivian Amazonian ethnic group, of almost seven hundred persons, living in high-ground forest between Yata and Benicito in Beni (Fig. 1). They are exposed to malaria and have developed various plant-based remedies to treat this disease and to alleviate the symptoms associated with it, such as, fever, digestive trou-

bles, splenomegaly and headache. Our purpose was to evaluate the relevance of these preparations, and of other non-malaria remedies selected on ethnopharmacological-chemotaxonomic bases.

2. Materials and methods

2.1. Ethnobotanical survey

The ethnobotanical survey was undertaken with the agreement of the communities involved. Two different methodologies were utilized. A permanent plot of one hectare in a high-ground forest was established. All trees, lianas, and palms ≥ 10 cm diameter at breast height (dbh) were tagged, and at least four herbarium samples were collected for each tree. The data collected included height, dbh, Chacobo and/or other local names, and traditional uses. Also, species were collected in different ecological sites with the help of informants willing to participate. Voucher herbarium specimens were collected for each plant designated by the informant as useful, and the Chacobo name of the plant was recorded, as well as its other names, and uses.

Voucher specimens were deposited in the Herbario Nacional de Bolivia in La Paz. A first determination of the identity of the specimens was performed by the ethnobotanists of the team with the help of specialists from the herbarium. Duplicate specimens were sent to specialists relevant to the plant family of interest.

2.2. Selection of plants

A total of 156 different species were indicated by the Chacobo to be used to cure or alleviate various diseases and symptoms (Bergeron, 1992; Bergeron et al., 1997). Of this number, 30 species were selected for biological evaluation. The details of their traditional use are presented in Table 1.

2.3. Treatment of plants samples

All parts of the plant (20–25 g) selected for biological assay were ground, submitted to a maceration process with ethanol-water (70–30%) for

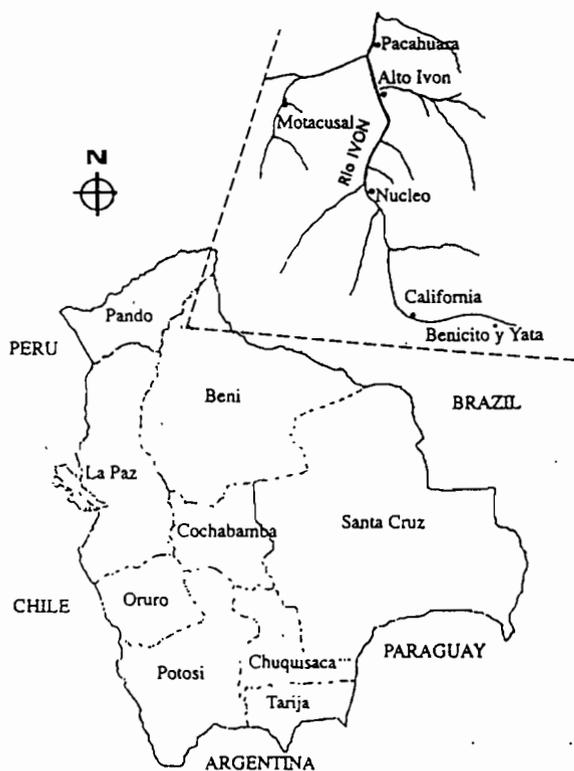


Fig. 1. Map of Bolivia and location of the Chacobo communities, between Benicito and Yata in the Department of Beni.

48 h at 25°C and protected from sunlight. The aqueous-ethanolic solution obtained was evapo-

rated under vacuum and the residue directly assayed against *Plasmodium*.

Table 1
Traditional uses of species selected for antimalarial investigation

Species (family), vernacular name, voucher number	Traditional Chacobo use (Bergeron, 1992; Bergeron et al., 1997)	Preparation, posology (Bergeron, 1992; Bergeron et al., 1997)	Part of plant tested
<i>Alibertia edulis</i> (L. Rich.) A. Rich (Rubiaceae) Tusa SB 073	Digestive problems	Cut a ripe fruit in 4 parts, and boil in one liter of water for 15 min. Drink when thirsty	Fruit
<i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allem.) A.C. Smith (Fabaceae) Quixono SB 467	Alleviate headache	The stembark is crushed and applied directly on the head	Stembark
<i>Apeiba tibourbou</i> Aublet (Tiliaceae) Moxoqüe SB 744	Alleviate headache	The leaves are crushed in water and then applied in the form of a paste	Stembark
<i>Apuleia leiocarpa</i> (J. Vogel) Macbr. (Fabaceae) Mani SB 765	Fever	One handful of grated stembark is boiled in 2 liter of water, until reduced to 1 liter. Drink when thirsty, until fever calms down	Stembark
<i>Arrabidaea</i> sp. (Bignoniaceae) Nishirajoxo SB 307	Digestive problems, diarrhea	Drink one glassful of sap exuding from the liana, 3 times a day	Stembark
<i>Bauhinia guianensis</i> Aublet (Fabaceae) Nishipara SB 869	Diarrhea, stomachache	Boil in 2 liter of water one handful of grated stembark, until reduced to 1 liter. Drink half-a-cup 3 × per day	Stembark
<i>Cedrela fissilis</i> Vell. (Meliaceae) Itsa SB 483	Malaria, vomiting, diarrhea	One handful of grated trunkbark is boiled in 2 liter of water until reduced to 1 liter. Drink 3 cups a day, until the symptoms disappear	Stembark
<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) Schum. (Rubiaceae) Jihumoca SB 33	Malaria, vomiting, fever	One handful of grated trunkbark is boiled in 2 liter of water until reduced to 1 liter. Drink half-a-cup 3 × a day, until the symptoms disappear	Stembark
<i>Derris amazonica</i> Killip (Fabaceae) Capëhütsa SB 880	Fish poison	Fresh roots and fresh stems are crushed and thrown into a pond	Stems and leaves
<i>Derris</i> sp. (Fabaceae) Jënëhaxahua SB 688	Fish poison	Fresh roots and fresh stems are crushed and thrown into a pond	Stembark
<i>Duguetia spixiana</i> C. Martius (Annonaceae) Xahuisi SB 728	Construction		Stembark
<i>Geissospermum laeve</i> (Vellozo) Miers (Apocynaceae) Jihumoca SB 701	Used to cure malaria, vomiting, liver pain	500 g of grated trunkbark is boiled for 15 min in 2 liters of water. Drink one cup, two times a day, until symptoms disappear	Stembark
<i>Guatteria</i> aff. <i>schomburgkiana</i> Mart. (Annonaceae) Ahuabaca SB 15	Construction		Stembark
<i>Iryanthera laevis</i> Mkgf. (Myristicaceae) Mëquënobita SB 727	Lesions in the mouth	Apply the sap exuding from the trunkbark directly on the lesions	Stembark
<i>Licania intrapetiolaris</i> Spr. ex Hook. (Chrysobalanaceae) Pacachësti SB 175	Skin problems	The stembark is crushed, burned, and then applied on the skin as a poultice	Stembark

Table 1 (Continued).

Species (family), vernacular name, voucher number	Traditional Chacobo use (Bergeron, 1992; Bergeron et al., 1997)	Preparation, posology (Bergeron, 1992; Bergeron et al., 1997)	Part of plant tested
<i>Maquira coriacea</i> (Karst.) C.C. Berg (Moraceae) Huápamo SB 691	Malaria, fever	One handful of grated trunkbark and one handful of grated rootbark are boiled in 2 liters of water, until reduced to one liter. Drink half-a-cup, 3 times a day until the symptoms disappear	Stembark
<i>Mascagnia macrophylla</i> Rusby (Malpighiaceae) Ascana SB 258	Diarrhea	Stembark juice is drunk 3 times a day to cure diarrhea	Stembark
<i>Mussatia hyacinthina</i> (Standl.) Sandw. (Bignoniaceae) Boa SB 726	Diarrhea and stomachache	One handful of leaves are prepared like a tea. Drink 1 full-cup 3 times a day	Leaves
<i>Nectandra cuspidata</i> Nees (Lauraceae) Yobini SB 528	Stomachache	One handful of grated stembark is boiled in 2 liters of water, until reduced to 1 liter. Drink 3 cups a day, until the pain calms down	Stembark
<i>Piper darienense</i> C. DC. (Piperaceae) Nibosa SB 694	Used to alleviate tooth pain	Apply the crushed root directly on aching tooth, or chew the root	Roots
<i>Prunus amplifolia</i> Pilger (Rosaceae) Jihurononopa SB 628	Used to alleviate pain caused by insect bite and pain as a result of rheumatism pain	The stembark is crushed in a paste which is applied to the painful area	Stembark
<i>Pterocarpus cf. amazonum</i> (Benth.) Amsh (Fabaceae) Capanahahuati SB 152	Used as cicatrizant of burns	The stembark is pulverized, applied on the skin and covered with a cloth	Stembark
<i>Qualea paraensis</i> Ducke (Vochysiaceae) Nihipépécho SB 164	Scabies	The stembark is boiled in water, and the water is used in the form of a bath	Stembark
<i>Sclerolobium aff. guanense</i> Benth. (Fabaceae) Xabahuasicano SB 381	Scabies	The stembark is boiled in water, and the water is used in the form of a bath	Stembark
<i>Serjania</i> sp. (Sapindaceae) Carihanahaxa SB 692	Fish poison	Fresh roots and fresh stems are crushed and thrown into a pond	Stems
<i>Sparattanthelium amazonum</i> Mart. (Hernandiaceae) Nishitsanona SB 819	Stomachache, vomiting, diarrhea	One handful of grated stembark is boiled in 2 liters of water, until reduced to 1 liter. Drink when thirsty, until diarrhea and vomiting stop	Stembark
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae) Nisho SB 626	Used to cure fever	One handful of grated stembark is boiled in 2 liters of water, until reduced to 1 liter. Drink when thirsty, until fever calms down	Stembark
<i>Tanaecium jaroba</i> Sw. (Bignoniaceae) Nishiratëquëya SB 266	Diarrhea, vomiting Inflammation, or swelling after a trauma	One handful of grated stembark is boiled in 2 liters of water, until reduced to 1 liter. Drink when thirsty, until diarrhea and vomiting stop Apply grated stembark as a poultice on the swelling. Change it until complete cure	Stembark
<i>Vataireopsis</i> sp. (Fabaceae) Canamashia SB 473	Scabies	The ashes of the stembark are applied on the skin	Stembark
<i>Xylopia cuspidata</i> Diels (Annonaceae) Xahui-xahuira SB 729	Construction		Stembark

2.4. Biological tests

The *in vivo* antimalarial activity of plant extracts were determined by the classical 4-day suppressive test (Peters and Robinson, 1992) against *Plasmodium berghei* NK65 and *P. vinckei* 279BY strains.

Swiss male mice (Charles River, France), of a mean body weight 20 ± 2 g, were infected with 10^8 parasitized cells in 0.9% saline, on day 0. Groups of five mice were treated intraperitoneally from day 0–3 with increasing doses (100 mg/kg up to 1 g/kg) of plant extracts. The malaria-suppressive effect was estimated on day 4, by examination of Giemsa-stained thin blood smears made from the tails of the treated mice, compared with a control group of mice treated only with the solvent of the extract (saline, dimethyl sulfoxide or Tween). Each test also included a positive control with a *Cinchona calisaya* Wedd. (Rubiaceae) bark extract (from 50 to 250 mg/kg in saline), collected by one of us, in the Department of Sud Yungas (Bolivia). Chloroquine (Sigma-USA) was also used as standard (5 mg/kg). The stained thin blood smears were examined under $1000 \times$ magnification, and the percentage of parasitized red blood cells was counted on at least 9000 red blood cells for each concentration. Percent growth inhibition of the parasite was calculated by the following formula:

$$\frac{(\text{parasitaemia in control} - \text{parasitaemia with drugs})}{\text{parasitaemia in control}}$$

$\times 100 = \% \text{ of inhibition}$

For the *in vitro* tests, cultures of the Indo (chloroquine resistant) and F32-Tanzania (chloroquine sensitive) strains of *P. falciparum* kindly provided by Dr Fandeur T. (Pasteur Institute, Cayenne, France) were maintained according to the method of Trager and Jensen (1976), on glucose-enriched RPMI 1640 medium supplemented with 10% human serum at 37°C. A total of 50 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the plant extracts, which were dissolved in RPMI 1640 medium with the aid of mild sonication in a sonicleaner bath (Branson Ltd), and then diluted as required in culture medium.

The final DMSO concentration was never greater than 0.1%. One hundred and fifty mi-

cro litres of total culture medium with the diluted extract and the suspension of infected human red blood cells (0 + group, 5% haematocrit, 1% parasitaemia), were distributed into 96-well microtitre plates. All tests were performed in triplicate. After 24 h of incubation at 37°C in a candle jar incubator, the medium was replaced by fresh medium with the diluted extract, and incubation was continued for a further 48 h. On the 3rd day of the test, a blood smear was taken from each well and parasitaemia counted.

The parasitaemia for each well was obtained and the percentage inhibition of parasitaemia for each concentration of extract was calculated in relation with the control. IC_{50} values were determined graphically by plotting concentration versus percentage inhibition. Each test also included an untreated control with solvent and a positive control with a *Cinchona calisaya* Wedd. (Rubiaceae) bark extract. Chloroquine (Sigma, USA) was also used as control.

3. Results

The results of biological evaluation are presented in Table 2.

3.1. *In vitro* results

Twenty eight ethanolic plant extracts were evaluated *in vitro* using chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *P. falciparum* strains (F32 and Indo, respectively). It was considered that if the extracts displayed an IC_{50} less than 5 μ g/ml, the antimalarial activity was very good; from 5 to 10 μ g/ml the antimalarial activity was good; over 10 μ g/ml the extract was considered inactive. The IC_{50} of *Cinchona calisaya* stem bark extract used as the standard drug in these assays was 0.2 μ g/ml against both strains. The IC_{50} of Chloroquine (excluded from Table 2) was 6.3 ng/ml for the F32 strain and 74 ng/ml for the Indo strain.

Three plant extracts (*Geissospermum laeve*, *Mascagnia macrophylla*, *Sparattanthelium amazonum*) showed very good antimalarial activity against both strains with IC_{50} values ranging from 1.7 to 3.1 μ g/ml, comparable to the activity of

Table 2
Antimalarial activities of the selected species^a

Voucher	Scientific name	Family	In vitro		In vivo			
			F32 IC ₅₀ µg/ml	Indo IC ₅₀ µg/ml	Dose mg/kg 4 days	<i>P. vinckei</i> % inhibition	Dose mg/kg 4 days	<i>P. berghei</i> % inhibition
LR 232	<i>Cinchona calisaya</i>	Rubiaceae	0.2	0.2			250	91
LR 232	<i>Cinchona calisaya</i>	Rubiaceae					100	41
LR 232	<i>Cinchona calisaya</i>	Rubiaceae					50	36
SB 765	<i>Apuleia leiocarpa</i>	Fabaceae	50	50			250	53
SB 765	<i>Apuleia leiocarpa</i>	Fabaceae					100	31
SB 869	<i>Bauhinia guianensis</i>	Fabaceae	> 100	28	250	Toxic		
SB 869	<i>Bauhinia guianensis</i>	Fabaceae			50	84		
SB 880	<i>Derris amazonica</i>	Fabaceae	3.2	18				
SB 701	<i>Geissospermum laeve</i>	Apocynaceae	3.1	2	50	41	100	Toxic
SB 701	<i>Geissospermum laeve</i>	Apocynaceae					50	36
SB 015	<i>Guatteria aff schomburgkiana</i>	Annonaceae	19	4			> 500	36
SB 727	<i>Iryanthera laevis</i>	Myristicaceae	40	40			100	59
SB 691	<i>Maquira coriacea</i>	Moraceae	50	9	250	Toxic	100	36
SB 691	<i>Maquira coriacea</i>	Moraceae			100	92		
SB 258	<i>Mascagnia macrophylla</i>	Malpighiaceae	1.7	2.2	472	58		
SB 528	<i>Nectandra cuspidata</i>	Lauraceae	> 100	> 100	250	83	250	61
SB 628	<i>Prunus amplifolia</i>	Rosaceae	> 100	> 100			250	66
SB 152	<i>Pterocarpus amazonum</i>	Fabaceae	> 100	> 100	250	98		
SB 164	<i>Qualea paraensis</i>	Vochysiaceae	> 100	> 100	250	Toxic		
SB 164	<i>Qualea paraensis</i>	Vochysiaceae			100	67		
SB 381	<i>Sclerolobium aff guianense</i>	Fabaceae	10	10	200	82		
SB 819	<i>Sparantanthelium amazonum</i>	Hernandiaceae	2	2	250	57	250	Toxic
SB 266	<i>Tanaecium jaroba</i>	Bignoniaceae	20	20	250	78	250	70

^a Toxic: death of more than half of the animals.

Artemisia annua and of some Simaroubaceae plants (O'Neill et al., 1985). One extract (*Guatteria aff. schomburgkiana*) showed very good activity (IC₅₀ 4 µg/ml) on the Indo strain and was inactive on the F32 strain, while one extract (*Derris amazonica*) showed very good activity on the F32 strain and was inactive on the Indo strain. One extract (*Maquira coriacea*) displayed good activity on the Indo strain. These results indicate that six extracts displayed good antimalarial in vitro activity against the sensitive or against the resistant strains, representing 21% of the screened extracts. However, none of the extracts was as active as the bark extract of *Cinchona calisaya*.

3.2. In vivo results

Twenty eight ethanolic extracts were tested in the in vivo model of the rodent malaria *P. vinckei petteri* 279 BY and sixteen in the *P. berghei* NK65 model. The in vivo results were classified as follows: at the dose of 500 mg/kg/day, if the extract displayed a percent growth inhibition equal or greater than 50%, the antimalarial activity was considered moderate; at the dose of 250 mg/kg/day, if the percent growth inhibition was equal or greater than 50%, the antimalarial activity was considered good; at the dose of 100 mg/kg/day if the percent growth inhibition was equal to 50%,

the antimalarial activity was considered very good. The *Cinchona calisaya* bark extract, used as a positive standard for these assays displayed 91% inhibition at 250 mg/kg/day, while 5 mg/kg of chloroquine inhibited 100% of the parasite growth.

In the *P. vinckei* model, three plant extracts displayed very good activity (*Bauhinia guianensis*, *Maquira coriacea*, *Qualea paraensis*) and five plant extracts displayed good activity (*Nectandra cuspidata*, *Pterocarpus amazonum*, *Sclerolobium* aff. *guianense*, *Sparattanthelium amazonum*, *Tanaecium jaroba*).

In the *P. berghei* model, one plant extract displayed very good activity (*Iryanthera laevis*) and four plant extracts displayed good activity (*Nectandra cuspidata*, *Tanaecium jaroba*, *Apuleia leiocarpa*, *Prunus amplifolia*). It should be pointed out that only three species, *Nectandra cuspidata*, *Tanaecium jaroba*, and *Geissospermum laeve* exhibited good activity against both strains, the former also showed very good in vitro activity.

4. Discussion

Apuleia leiocarpa (J. Vogel) Macbr. (Fabaceae): at 250 mg/kg the percent growth inhibition reached 53% and fell to 31% at 100 mg/kg against *P. berghei*, demonstrating good antimalarial activity. The extract was inactive in vitro. *A. leiocarpa* has also been reported to have anti-inflammatory activity (Ruppelt et al., 1991). This observation was confirmed by Mitaine (1998) because in the petroleum ether fraction, β -amyryn, a triterpene with anti-inflammatory and sedative properties (Kweifio-Okai et al., 1994) was found. The use of this species by the Chacobos to reduce any kind of fevers appears to be justified by the presence of β -amyryn (though a complementary antipyretic test should be performed) and also by its anti-malarial properties, thus, helping to reduce the fevers as a result of malaria attacks.

Research for the active antimalarial compounds is in progress, justified by the activity displayed in vivo.

Bauhinia guianensis Aublet (Fabaceae): the ethanolic stembark extract of this species was

inactive against both Indo and F32 strains ($IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$). At 50 mg/kg it showed very good activity against the *P. vinckei* strain (84%) but was toxic at 250 mg/kg. No other biological activities were reported for *Bauhinia guianensis*, but the strong in vivo antimalarial activity justifies further investigation of this species for active principle(s). This extract should also be tested at lower doses.

Derris amazonica Killip (Fabaceae): it was decided to investigate the antimalarial potential of *Derris* species, after it was shown (Sauvain, 1989), in work performed in French Guyana, that the genus *Tephrosia*, which is botanically close to *Derris*, displayed good activity against *Plasmodium*.

The extract of *Derris amazonica* showed stronger activity against the F32 strain (IC_{50} 3.2 $\mu\text{g/ml}$) than against the Indo (IC_{50} 18 $\mu\text{g/ml}$). The genera *Derris* and *Tephrosia* are known to contain rotenones and related compounds which are potent pesticides and piscicides (Moretti and Grenand, 1982), thus explaining their traditional use as 'fish poisons'. From a Brazilian species of *Derris*, *D. sericea*, Buckingham (1998) isolated prenylated chalcones, such as 2'-hydroxy-4'-prenyloxylchalcone, which displayed moderate toxicity (LD_{50} of 275 mg/kg in mice by the intraperitoneal route). As indicated previously, chalcones and their derivatives are potentially active against malaria. Therefore, it is possible that the in vitro activity of *Derris amazonica* is related to the presence of chalcone compounds, but this hypothesis still has to be proven.

Geissospermum laeve (Vellozo) Miers (Apocynaceae): the stembark extract showed very good activity in vitro (IC_{50} 3.1 $\mu\text{g/ml}$ against the F32 strain and 2 $\mu\text{g/ml}$ against the Indo strain), but was inactive on *P. berghei*, and was highly toxic at 100 mg/kg. *G. laeve* is known to contain flavopereirin, a monoterpene indole alkaloid. Its derivative, 5,6-dihydroflavopereirin displayed a marked activity against *P. falciparum* in vitro at an IC_{50} of 3.02 μmoles (Wright et al., 1996). Further studies are required to confirm that the antimalarial activity detected is as a result of the presence of flavopereirin derivatives. The toxicity of the ethanolic stembark extract in mice presents some

contradiction with the famous antimalarial reputation of this species in the Amazonian region (Grenand et al., 1987). Therefore, it is worthwhile to investigate this species, in order to determine if the compounds responsible for the antimalarial activity are the same as those responsible for the toxicity in mice.

Guatteria aff. *schomburgkiana* Mart. (Annonaceae): the ethanolic stem bark extract did not display any activity against the F32 strain (IC₅₀ 19 µg/ml), but was active on the Indo strain (IC₅₀ 4 µg/ml). This extract was inactive on *P. berghei*. Species belonging to the family Annonaceae are well known to contain acetogenins (Rupprecht et al., 1990) and isoquinolines (Leboeuf et al., 1982) with antimalarial properties (Sahpaz et al., 1994). Previously Cortés et al. (1984) isolated from the stem bark of this species two 7-methylporphines (guattecine type) characteristic of the genus *Guatteria*. Though this extract did not show antimalarial activity in vivo, it should be interesting to verify if the in vitro activity is as a result of this type of compound.

Iryanthera laevis Mkgf. (Myristicaceae): the ethanolic stem bark extract of this species was inactive in vitro (IC₅₀ 40 µg/ml against both strains), while against *P. berghei* it displayed very good antimalarial activity, reducing the parasitaemia by 59% at 100 mg/kg. Previous studies showed the presence of chalcones in the stem bark, confirming the results of Garzon et al. (1987). Chalcones and derivatives are potentially active against malaria (Chen et al., 1994; Li et al., 1995) which have been shown to inhibit glutathione reductase (Elliott et al., 1992), a key enzyme whose inhibition increases the intra-erythrocytic level of H₂O₂, responsible for the oxidative stress leading to the death of *Plasmodium* (Ginsburg, 1990). The antimalarial activity observed could be explained by the presence of these molecules in *I. laevis* stem bark. Further investigations are planned.

Maquira coriacea (Karst.) C.C. Berg (Moraceae): the stem bark extract of this species was active in vitro against the chloroquine-resistant strain (IC₅₀ 9 µg/ml) and inactive against the sensitive F32 strain (IC₅₀ 50 µg/ml). The extract decreased dramatically (92% at 100 mg/kg) the

parasitaemia of *P. vinckei*-infected mice and was inactive against *P. berghei*. At 250 mg/kg the extract showed high toxicity, and killed all the treated mice. Using *Maquira* species from Peru, *M. calophylla* (Poepp. et Endl.) C.C. Berg., Rovinski and Sneden (1984), Rovinski et al. (1987) isolated various cytotoxic compounds, including maquiroside A, cannogenol and some furanocoumarins. The good activity shown in vivo corroborates the traditional use of this plant by the Chacobos, although it seems to be a toxic species which should be used with caution. These results make this species an interesting candidate for further investigation, if it can be established that the active compounds are not the same as those responsible for the toxic effects. This extract should also be tested at lower doses.

Mascagnia macrophylla Rusby (Malpighiaceae): the stem bark extract showed very good activity in vitro (IC₅₀ 1.7 µg/ml against the F32 strain and 2.2 µg/ml against the Indo strain). It displayed moderate antimalarial activity against *P. vinckei* (58% at 472 mg/kg). Therefore, *Mascagnia macrophylla* is worth investigating for its antimalarial principle(s).

Nectandra cuspidata Nees (Lauraceae): the stem bark extract produced very good in vivo antimalarial activity (83% against *P. vinckei*, and 61% against *P. berghei*, at 250 mg/kg). No activity was observed in vitro. Böhlke et al. (1996), isolated costaricine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, from *N. salicifolia* trunk bark which was active against *P. falciparum* chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains in vitro. These results justify further biological and chemical investigation of the stem bark extract of *N. cuspidata*, if the extract still demonstrates antimalarial activity at lower doses.

Prunus amplifolia Pilger (Rosaceae): the ethanolic stem bark extract was inactive in vitro (IC₅₀ > 100 µg/ml) while the in vivo antimalarial activity was good (66% inhibition at 250 mg/kg on *P. berghei*).

This result and the large number of biological activities encountered for the genus *Prunus* make this species worthwhile for further investigation.

Pterocarpus aff. *amazonum* (Benth.) Amsh. (Fabaceae): at 250 mg/kg, the ethanolic stem bark

extract showed good antimalarial activity (98%) against *P. vinckei*. It was inactive against both *Plasmodium* strains in vitro. Due to the in vivo antimalarial activity against *P. vinckei*, and because some *Pterocarpus* species such as *P. rohrii* Vahl are highly valued antimalarial remedies in the Amazon region (Schultes and Raffauf, 1990), *P. aff. amazonum* is considered to be a species worthwhile for further investigation.

Qualea paraensis Ducke (Vochysiaceae): the ethanolic stem bark extract of *Q. paraensis* was inactive in vitro. In vivo, it reduced substantially the parasitaemia of *P. vinckei*-infected mice (67% at 100 mg/kg).

Other studies (Brandao et al., 1985), showed that various extracts of *Q. grandifolia* C. Martius tested against *P. berghei*-infected mice (100 mg/kg, intragastrically) did not show any antimalarial activity.

Sclerolobium aff. guianense Benth. (Fabaceae): the ethanolic stem bark extract displayed good antimalarial activity against *P. vinckei* (82% at 200 mg/kg), but was inactive in vitro. No antimalarial properties have been indicated for members of this genus, and no chemical investigations have been performed on *Sclerolobium aff. guianense*. It is suggested that, if the response level is still good at lower doses, the stem bark of this species is worthy for further biological and chemical investigations.

Sparattanthelium amazonum Mart. (Hernandiaceae): the stem bark extract of *Sparattanthelium amazonum* showed very good activity in vitro (IC_{50} 2 µg/ml against both strains). It was active (52%) in vivo at 250 mg/kg against *P. vinckei*, but was toxic at 250 mg/kg against *P. berghei*-infected mice. Therefore, the traditional Chacobo uses of this species and of related *Sparattanthelium* sp. (Boom, 1987) against diarrhea, stomach ache and vomiting, might be linked to its antiparasitic activity. This species is worth investigating for its antimalarial principle(s).

Tanaecium jaroba Sw. (Bignoniaceae): the stem bark extract of this species displayed good activity in vivo against both *Plasmodium* strains (around 70% at 250 mg/kg, nearly equaling the activity of *Cinchona calisaya* bark extract). In vitro it was inactive. These results should be followed by fur-

ther investigation, first of all testing the extract at lower doses in order to confirm the observed activity, and if still active, identifying the compound(s) responsible for the antimalarial activity.

5. Discussion and conclusion

Of the 30 species tested in vivo against *P. vinckei* and/or *P. berghei*, eleven (36%) displayed an interesting in vivo antimalarial activity, and 21% of the extracts tested in vitro proved to be active. This discrepancy is a common aspect of the antimalarial studies as the metabolic processes are not present in culture. Of the four species designated by the Chacobos to be used against malaria, two showed good antimalarial activity, in vitro and in vivo, therefore, corroborating the traditional Chacobo use. Among the twelve species used traditionally against complaints possibly related to malaria attack, five extracts appear to justify further antimalarial investigation. One extract displayed only good in vitro activity, namely *Mascagnia macrophylla*, while three extracts were active only in vivo. One extract, *Sparattanthelium amazonum*, displayed both in vivo and in vitro activity, making this species a priority for further investigation. Two species used against scabies, in the form of a bath, showed interesting antimalarial in vivo activity, in the same way as four other species used for various medicinal purposes, apparently not related with a *Plasmodium* infection.

Finally, one species (*Derris amazonica*) used as a piscicide displayed good in vitro activity, in a similar manner as one Annonaceae, *Guatteria aff. schomburgkiana*, used for construction purposes.

These results however, must be considered as preliminary in nature and need further confirmation. First of all, some doubts will always remain about the accuracy of the uses of the species traditionally employed by the Chacobo Indians for treating malaria, or any kind of disease. In the traditional Chacobo medicine, when somebody gets sick, a first treatment with one particular plant is administered; if the person does not get well after few days under this treatment, another plant/treatment is administered until the symptoms disappear.

Therefore, it is sometimes hard to deduce as which plant that is really effective against the symptoms, and this is the reason why it seems more appropriate to link those species used for a specific disorder and to test them sequentially, in order to try to correlate this information with the traditional use. Secondly, the efficacy of medicinal plants, and especially those for the treatment of malaria, might also be related with the immunizing potential of the people treated. In cases of *Plasmodium* infections, it is well-known that people living in endemic areas develop a certain immunity against this parasite. Therefore, it is possible that a low antimalarial activity observed in our non-immune mice is sufficient for treating immunized people, or it can also be assumed that some species act as immuno-modulators.

Finally, the lack of *in vivo* activity of some extracts might be as a result of the route of administration (intraperitoneal) performed in our tests, interfering with parameters such as absorption rate, delivery process, metabolism process, or the absence of another compound that should be present in the alimentary diet (Ginsburg et al., 1988). Indeed, the methodology should follow the traditional oral route of administration, because passage through the peritoneal area shunts the tremendous alterations caused by the digestive tract, and therefore avoids structural alterations, possibly essential for the antimalarial activity. It should also be pointed out however, that the intraperitoneal route provides some assurances concerning good reproducibility, in terms of the amount of delivered drug, and is the easiest route of administration in screening tests.

The tests performed in the laboratory do not mirror the conditions for the administration of the medicinal plants *in situ* namely, using dried material instead of fresh, using ethanolic solvents instead of water, using different routes of administration, testing the extracts *in vitro* or *in vivo* on mice, and using *Plasmodium* species which are not the ones encountered in humans, though *P. berghei* has been described as a *P. vivax*-like species (Landau and Boulard, 1978).

However, we consider that the selection of species based on ethnopharmacological investigation, coupled with chemotaxonomic-biological data,

and followed by biological tests, is a very fruitful method to assess the possible antimalarial activity of plants, eventually leading to the development of new antimalarial compounds.

Acknowledgements

This project was financed by the International Foundation for Science, the Fondo Nacional del Medio Ambiente (FONAMA, Cuenta iniciativas para las Americas EIA), the Ministère Français des Affaires Etrangères, and IRD (Institut de Recherche pour le Développement).

The authors wish to thank Dr B. Weniger for his kind help in the bibliographic search, and Rosy Chávez de Michel and the National Herbarium of Bolivia for helping in the management and determination of voucher herbarium specimens.

We express our thanks to members of the Chacobos community who were willing to share with us their knowledge about plants.

References

- Bergeron, S., 1992. *Approche Préliminaire de la Connaissance du Système de Classification Botanique Chacobo*. Editions Institut Français des Etudes Andines, Lima, Peru.
- Bergeron, S., Ortiz, J., Ortiz, B., Soria, C., 1997. *El uso de las Plantas por los Chacobos (Alto Ivón, Beni, Bolivia)*. Editions IBIS Dinamarca, La Paz, Bolivia.
- Böhlke, M., Guinaudeau, H., Angerhofer, C.K., Wongpanich, V., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., et al., 1996. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *J. Nat. Prod.* 59, 576–580.
- Boom, B., 1987. Ethnobotany of the Chacobo Indians, Beni, Bolivia. *Adv. Econ. Botany* 4, 1–68.
- Brandao, M., Botelho, M., Krettli, E., 1985. Antimalarial experimental chemotherapy using natural products. *Cien. Cultura* 37, 1152–1163.
- Buckingham, J., 1998. *Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 6.2.2*. Chapman & Hall, London.
- Chen, M., Theander, T.G., Christensen, S.B., Hviid, L., Zhai, L., Kharazmi, A., 1994. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *Plasmodium yoelii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1470–1475.
- Cortés, D., Ramahatta, A., Dadoun, H., Cavé, A., 1984. La Bélémine, intermédiaire biogénétique potentiel des méthyl-

- 7 aporphines. *Compte-Rendus Hebdomadaires Séances l'Acad. Sci.* 299, 311–314.
- Elliott, A.J., Scheiber, S.A., Thomas, C., Pardini, R.S., 1992. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1603–1608.
- Garzon, L., Cuca, L.E., Martinez, J.C., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1987. Flavonolignoid from the fruit of *Iryanthera laevis*. *Phytochemistry* 26, 2835–2837.
- Ginsburg, H., Landau, I., Baccam, D., 1988. Effect of cholesterol-rich diet on the susceptibility of rodent malarial parasites to chloroquine chemotherapy. *Life Sci.* 42, 7–10.
- Ginsburg, H., 1990. Some reflexions concerning host erythrocyte-malarial parasite interrelationships. *Blood cells* 16, 225–235.
- Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H., 1987. *Pharmacopées Traditionnelles en Guyane*. Editions ORSTOM, Paris, France.
- Kweifio-Okai, G., De Munk, F., Rumble, B.A., Macrides, T.A., Cropley, M., 1994. Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85, 45–55.
- Landau, I., Boulard, Y., 1978. *Life Cycles and Morphology Rodent Malaria*. Academic Press, pp. 53–84.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R., 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21, 2783–2813.
- Li, R., Kenyon, G.L., Cohen, F.E., Chen, X., Gong, B., Dominguez, J.N., et al., 1995. In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem.* 38, 5031–5037.
- Ministerio de Desarrollo Humano, Secretaria Nacional de Salud, Dirección Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades y Riesgos. Departamento Nacional de Control de Vectores, 1996. Informe de Actividades del Programa de Vigilancia y Control de la Malaria. Secretaria Nacional de Salud Edition, La Paz, Bolivia.
- Mitaine, C., 1998. personal communication. Laboratoire de Pharmacognosie UPRESA 6013 CNRS, Centre de Recherche en Physico-chimie et Biotechnologies, Moulin de la Housse-BP 1039-51687 Reims cedex 2-France.
- Moretti, C., Grenand, P., 1982. Les Nivrées ou plantes ichtyotoxiques de la Guyane Française. *J. Ethnopharmacol.* 6, 139–160.
- O'Neill, M., Bray, D.H., Phillipson, J.D., Warhust, D.C., 1985. Plants as source of antimalarial drugs. Part 1. In vitro test method for the evaluation of crude extracts from plants. *Planta Med.* 61, 394–398.
- Peters, W., Robinson, B.L., 1992. The chemotherapy of rodent malaria. XLVII. Studies on pyronaridine and other Mannich base antimalarials. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 455–465.
- Rovinski, J.M., Sneden, A.T., 1984. Furanocoumarins from *Maquira calophylla*. *J. Nat. Prod.* 47, 557.
- Rovinski, J.M., Tewalt, G.L., Sneden, A.T., 1987. Maquiroside A, a new cytotoxic cardiac glycoside from *Maquira calophylla*. *J. Nat. Prod.* 50, 211–216.
- Ruppelt, B.M., Pereira, E.F., Gonçalves, L.C., Pereira, N.A., 1991. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 203–205.
- Rupprecht, J.K., Hui, Y.H., McLaughlin, J.L., 1990. Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.* 53, 237–278.
- Sahpaz, S., Bories, C., Loiseau, P.M., Cortes, D., Hocquemiller, R., Laurens, A., et al., 1994. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Med.* 60, 538–540.
- Sauvain, M., 1989. *Etudes de Plantes Antiparasitaires du Plateau des Guyanes en Amazonie: Antipaludiques et Antileishmaniens*. Doctorat de l'Université de Paris Sud, Châtenay Malabry, France.
- Schultes, R.E., Raffauf, R.F., 1990. *The Healing Forest*. Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- Wright, C.W., Phillipson, J.D., Awe, S.O., Kirby, G.C., Warhust, D.C., Quetin-Leclercq, J., et al., 1996. Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydrium bases. *Phytother. Res.* 10, 361–363.

Activité antimalarique et cytotoxicité de (-) roemrefidine isolée de l'écorce de *Sparattanthelium amazonum*.

PUBLICATION 2

Parmi les 12 espèces végétales utilisées par les Chacobos pour traiter des symptômes en relation avec la malaria, 5 ont montré une bonne activité.

L'extrait d'écorce de *Sparattanthelium amazonum* Martius, montre une activité *in vitro* très bonne (CI₅₀ de 2 µg/ml contre les 2 souches) et une bonne activité *in vivo* contre *P. vinckei* (52% d'inhibition à 250 mg/kg/4J). L'usage traditionnel de cette espèce ainsi que d'autres *Sparattanthelium* sp. comme antidiarrhéique ou contre les douleurs d'estomac et les vomissements (symptômes retrouvés dans le tableau clinique général de la malaria) nous a poussé à faire un bioguidage qui nous a conduit à la purification d'un alcaloïde aporphinique la (-) roemrefidine.

Nous avons étudié l'activité (contre des souches chloroquino résistantes et sensibles de *Plasmodium falciparum* *in vitro*)

L'activité antimalarique a été établie au moyen de l'étude de l'action de la drogue (obtenue par fractionnement biodirigé) sur des cultures de *Plasmodium falciparum* 20/87 (Chloroquino sensible) et Indo (résistant). L'impact de la drogue a été mesuré par lecture au microscope, de frottis (colorés au Giemsa) de cultures traitées par le composé à tester comparés à des frottis de culture recevant le solvant de la drogue.

Les CI₅₀ obtenues sont 0.71 µM et 0.58 µM sur les souches 20/87 et Indo respectivement.

Nous avons également déterminé le stade de développement parasitaire le plus sensible à l'action de la drogue en synchronisant la souche chloroquino résistante FCB1 et en mettant le parasite en contact avec la drogue pendant 24 et 72 heures. La

croissance du parasite a été suivie par incorporation d'hypoxanthine tritiée. Les CI₅₀ ont été déterminées graphiquement après construction de graphique représentant l'inhibition vs la concentration testée.

Quelle que soit le temps de contact, la CI₅₀ obtenue est de 0.17 μ M. Ceci prouve que la drogue agit sur la maturation du parasite mais n'a pas d'effet sur la réinvasion ni d'effet cumulatif.

Nous nous sommes également intéressés à l'effet de la (-) roemrefidine sur *Plasmodium berghei in vivo* chez la souris Swiss.

Cette drogue a, dans les conditions expérimentales du test suppressif de 4 jours, une CI₅₀ de 5.98 mg/kg/jour sans toxicité aiguë apparente chez la souris à cette dose.

La cytotoxicité est faible puisque l'effet toxique de la drogue sur des lignées cellulaires humaines se retrouve pour des CI₅₀ comprises entre 39.5 et 87 μ M.

References

- ¹ Irobi, O. N., Daramola, S. O. (1993) *J. Ethnopharmacol.* 40, 137–140. (1994) *J. Ethnopharmacol.* 42, 39–43.
- ² Benjamin, T. V., Anucha, T. C., Hugbo, P. G. (1986) in: *The State of Medicinal Plant Research in Nigeria*, (Sofowora, A., ed.), Unife Press, Ife, Nigeria, pp. 243–255.
- ³ Ekpendu, T. O., Akah, P. A., Adesomoju, A. A., Okogun, J. I. (1994) *Int. J. Pharmacog.* 32, 191–196.
- ⁴ Harouna, H., Faure, R., Debrauwer, L., Saadou, M., Balansard, G., Boudon, G. (1995) *Phytochemistry* 39, 1483–1484.
- ⁵ Ohgaki, E., Motoyoshiya, J., Navita, S., Kakurai, T., Hayashi, S., Hirakawa, K. (1990) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3109–3112.
- ⁶ Walton, B. T., Ho, C., Ma, C. Y., O'Neil, E. G., Kao, G. L. (1983) *Science* 222, 422–423.
- ⁷ Ma, C. Y., Ho, C., Walton, B. T., Kao, G. L., Guerin, M. R. (1984) *Environ. Sci. Technol.* 18, 362–364.
- ⁸ Solis, P. N., Lang'at, C., Gupta, M. P., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Phillipson, J. D. (1995) *Planta Med.* 61, 62–65.
- ⁹ Clark, A. M., Jurgens, T. M., Hufford, C. D. (1990) *Phyther. Res.* 4, 11–14.
- ¹⁰ Clark, A. M., Hufford, C. D. (1992) in: *The Alkaloids*, (Cordell, G. A., ed.), Academic Press, Inc., San Diego, pp. 117–150.
- ¹¹ Peterson, J. R., Zjawiony, J. K., Liu, S., Hufford, C. D., Clark, A. M., Rogers, R. D. (1993) *J. Med. Chem.* 35, 4069–4077.

Dr. Alice M. Clark

Department of Pharmacognosy
School of Pharmacy
The University of Mississippi
University, MS 38677
U.S.A.
E-mail: pgclark@vm.cc.olemiss.edu

Dr. Adewole L. Okunade

Department of Biology
Campus Box 1137
1 Bookings Drive
Washington University
St. Louis, MO 63130
U.S.A.
E-mail: okunade@biodec.wustl.edu

Antimalarial Activity and Cytotoxicity of (–)-Roemrefidine Isolated from the Stem Bark of *Sparattanthelium amazonum*

V. Muñoz¹, M. Sauvain^{2,*}, P. Mollinedo¹, J. Callapa¹, I. Rojas¹, A. Gimenez³, A. Valentin⁴, and M. Mallié⁴

¹ Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivia

² Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France

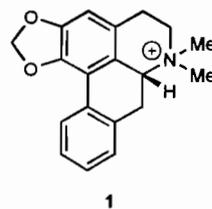
³ Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia

⁴ Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie, UFR Sciences Pharmaceutiques, Montpellier, France

Received: October 22, 1998; Revision accepted: January 31, 1999

Abstract: (–)-Roemrefidine, an aporphine alkaloid isolated from *Sparattanthelium amazonum* Martius (Hernandiaceae) a vine from Bolivia, has been found to be active against both resistant and sensitive strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro* and against *P. berghei* in mice. The compound demonstrated no cytotoxic activity against three cell lines (KB, HEP-2 and HeLa).

Decoction of the stem bark of *Sparattanthelium amazonum* Martius (Hernandiaceae), a vine of the South American subtropical rain forest, is used traditionally by the Chacobo. This native community lives in the Amazonian part of Bolivia and uses the plant for digestive problems, stomach ache, vomiting and diarrhoea. Extracts from the stem bark of *S. amazonum* exhibited antiplasmodial activity *in vitro* (1). Preliminary *in vitro* antimalarial assessment showed that the activity was concentrated in the crude alkaloid mixture extracted from the stem bark. Using a bioguided fractionation of this extract, we isolated (–)-roemrefidine (1), an aporphine alkaloid, isolated previously from species of Papaveraceae (2–4) and Menispermaceae (5), as the active compound. Identification of the alkaloid was carried out by comparison of their spectral data with those reported (2, 3).



In a visual method based test (6), compound 1 possessed an *in vitro* antimalarial activity with an IC_{50} of $0.71 \mu M$ against the chloroquine sensitive strain 2D/87 and of $0.58 \mu M$ against the chloroquine resistant strain INDO of *Plasmodium falciparum* (Table 1). In order to determine at which stage of the *Plasmodium* erythrocytic cycle the alkaloid acts, parasite cultures of a synchronised resistant chloroquine strain FeB1 were incubated with compound 1 and radio-labelled hypoxanthine for two periods representative of the parasite erythrocytic cycle (7). The IC_{50} of (–)-roemrefidine (1) against

Compound	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM) ¹		<i>P. berghei</i> ED ₅₀ (mg/ kg/4day)	Cell lines tested (A)		
	2087 (B)	INDO (B')	NK65	KB (A/B, A/B')	Hep-2 (A/B, A/B')	HeLa (A/B, A/B')
(-)-roemrefidine	0.71	0.58	5.98	39.5 (56, 68)	50.0 (70, 86)	87.1 (123, 150)
chloroquine	0.06	0.22	0.98	> 70 (> 1167, > 318)	> 70 (> 1167, > 318)	50.3 (838, 229)

¹ Measurements were done in triplicate.

the strain FcB1, measured for these two periods was the same, 0.17 μM. This result shows that (-)-roemrefidine (**1**) acts on the level of parasite maturation, has no effect on the erythrocytic reinvasion and that there is no cumulative influence of the compound on the metabolic pathways of the parasite. Compound **1** demonstrated also an interesting antimalarial activity *in vivo* against a *P. berghei* strain with an ED₅₀ value of 5.98 mg kg⁻¹ day⁻¹. In addition, compound **1** exhibited a weak cytotoxicity and good cytotoxic:antiplasmodial ratios as defined by Phillipson (8) (Table 1). Studies on aporphine-type alkaloids as possible antimalarial agents are currently under investigation.

Materials and Methods

Sparattanthelium amazonum was collected in October 1993 during ethnobotanical field work in the north-east region of Bolivia (Alto Ivón). A voucher specimen (Bergeron 819) has been deposited at the National Herbarium of La Paz, Bolivia.

Defatted dried stem bark (700 g) of *S. amazonum* was exhaustively extracted with 2 litres of EtOH (95%) for 72 hours. The combined solutions were made alkaline with NH₄OH and extracted with dichloromethane to afford 0.8 g of crude alkaloid extract (1.14%). The active alkaloid extract was chromatographed (CC) over Sephadex LH-20 (35 g, 1 × 92 cm), eluted with CH₂Cl₂:MeOH (50:50) to give 5 fractions, each of 50 ml. The third fraction (523 mg), as the most active fraction, was chromatographed (CC) over Sephadex LH-20 (35 g, 1 × 92 cm), eluted with MeOH to give 12 fractions, each of 50 ml. Combined CC active fractions (3–5, 318 mg), were submitted to CC on polyamide (Ac-6) 50 g, 2 × 30 cm, eluted with CH₃OCH₃:MeOH (90:10) to give 16 fractions, each of 50 ml. Active fractions were pooled together (5–7, 41 mg) and recrystallized from ethyl acetate:MeOH (70:30) leading to white crystals (31 mg) of **1** ([α]_D²⁰: -26°, CHCl₃, c 0.5).

Antiplasmodial activity assays on extracts, fractions and pure alkaloid were carried out *in vitro*, in triplicate, using the visual method as described by Sauvain et al. (6). Unsynchronised cultures of a sensitive strain /87 and a chloroquine resistant strain INDO of *P. falciparum*, with a dominant trophozoite stage, were used.

The specificity of the (-)-roemrefidine (**1**) activity was measured with a radio-isotopic method using the ringstage form of a chloroquine resistant FcB1-Colombia *P. falciparum* strain. The plasmodia were synchronised by flotation on gelatine and lysed with 5% D-sorbitol. The parasite cultures

were incubated with the extract for 24 and 72 hours. These time periods correspond to the half time and the 1.5 time of the parasite erythrocytic life cycle (7).

A four day suppressive *in vivo* assay in mice was executed against *P. berghei* strain NK 65 (9). The cytotoxic potential of (-)-roemrefidine (**1**) was evaluated in three cell lines, utilizing sulforodamine B. Cell lines HeLa (uterine carcinoma), KB (human epidermoid carcinoma) and HEP-2 (human epidermoid carcinoma, larynx) were cultured as previously described (10). Full details of the isolation and biological procedures, including copies of the original spectra, are available on request from the author of the correspondence.

Acknowledgements

We thank FONAMA, La Paz, Bolivia for financial support.

References

- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., Bravo, J. A., Balderrama, L., Ortiz, B., Gimenez, A., Deharo, E. (1999) *J. Ethnopharmacol.*, submitted.
- Akramov, S. T., Yunusov, S. Y. (1968) *Khim. Prir. Soedin.* 199–200.
- Manushakyan, M. A., Mnastakanyan, V. A. (1977) *Khim. Prir. Soedin.* 713.
- Sariyar, G., Sari, A., Mat, A. (1994) *Planta Med.* 60, 293.
- Kanyinda, B., Diallo, B., Vanhaelen-Fastré, R. (1989) *Planta Med.* 55, 394.
- Sauvain, M., Moretti, C., Bravo, J. A., Callapa, J., Muñoz, V., Ruiz, E., Richard, B., Le Men-Olivier, L. (1996) *Phytother. Res.* 10, 198–201.
- Benoit, F., Valentin, A., Pélissier, Y., Marion, C., Dayuko, Z., Mallié, M., Bastide, J. M. (1995) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 217–218.
- Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M., Hamburger, M. (1995) *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*, Oxford Press, Oxford, pp. 95–135.
- Peters, W. (1970) *Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria*, Academic Press, London, New York, pp. 164–171.
- Likhitwitayawuid, K., Anherhofer, K. C., Cordell, A. G., Pezzuto, M. J. (1993) *J. Nat. Prod.* 56, 30–38.

Dr. Michel Sauvain

Institut de Recherche pour le Développement
(anciennement ORSTOM)
213 rue Lafayette
F-75480 Paris Cedex 10
France
E-mail: sauvain@ind.rio.net
Fax: + 33 1 48 03 78 06

Activité antimalarique et action potentialisatrice sur la chloroquine de certains alcaloïdes aporphiniques

PUBLICATION 3

Après avoir isolé un alcaloïde isoquinoline quaternaire, la (-) Roemrefidine et en raison de la quantité insuffisante de cet alcaloïde pour poursuivre les essais biologiques, deux dérivés furent initialement préparés par hémisynthèse l'oliverine-chloro-N-méthylate et l'oliveridine-chloro-N-méthylate, par la suite furent préparés dix alcaloïdes aporphiniques supplémentaires.

Comme les aporphinoïdes sont connus pour leurs gamme étendue d'activités biologiques en général et antimalariques en particulier, nous nous sommes intéressés à une série de 12 alcaloïdes aporphiniques du point de vue de leur activité antimalarique intrinsèque, en association avec la chloroquine contre des souches de *Plasmodium falciparum* in vitro. Nous avons également étudié leur activité sur la maturation du parasite ainsi que sur la réinvasion. Nous avons enfin étudié l'effet cumulatif.

La N-méthyl olivérine et la N-méthyl olivéridine se sont révélées les plus actives sur une souche chloroquino-résistante (CI₅₀ de 0,5 uM à 72 h), parmi les 12 molécules testées pour leur activité intrinsèque mais aucune d'entre elles ne s'est montrée aussi efficace que la chloroquine.

En association avec la chloroquine, la nuciferine, la pachyconphine et la cassythicine potentialisent l'action de la chloroquine contre la souche chloroquine-résistante D2 à 2,1, 1,7 et 3 μM respectivement.

Un effet additif est mis en évidence avec la glaucine fumarate, la laurotenine et l'isocorituberine. Alors que l'asimilobine, l'isoboldine, la corydine, l'actinodafnine, l'oliverine et l'oliveridine chloro-N-méthylate antagonisent l'effet de la chloroquine.

Aucun des aporphinoïdes potentialisateur testés ne modifient la perméabilité membranaire des hématies parasitées par *Plasmodium*.

Apparemment les alcaloïdes interfèrent avec le processus de réinvasion du parasite dans les érythrocytes. La glaucine montre un fort effet cumulatif.

Les alcaloïdes aporphiniques pourraient être combinés avec un panel de drogues utilisées classiquement en thérapeutique (**Rasoainavo et al., 1998**) ou bien avec de nouveaux métabolites (**Bölke et al., 1996**).

Ces molécules ont cependant l'inconvénient de présenter un index thérapeutique défavorable (**Likhitwitayawuid et al., 1993**). Il pourrait être envisagé des associations entre elles afin de tenter de réduire leur toxicité. De même, leur activité devrait être évaluée in vivo.

ANTIPLASMODIAL ACTIVITY AND CHLOROQUINE POTENTIATING

ACTION OF APORPHINE ALKALOIDS

V Muñoz¹, M Sauvain², A Valentin³, J Callapa¹, E Deharo⁴, B Weniger², P Duret⁵, A Fournet²,
M Mallié³

¹ Instituto Boliviano de Biología de Altura - UMSA, La Paz Bolivia

² Institut de Recherche pour le Développement, 213 rue Lafayette, 75010 Paris, France

³ Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie, UFR Sciences Pharmaceutiques, Montpellier, France.

⁴ Institut de Recherche pour le Développement, La Paz, Bolivie

⁵ Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

key words: aporphinoid alkaloids, antiplasmodial activity, chloroquine potentiating

Abstract

A series of 12 aporphinoids were tested, alone or combined with chloroquine, against *Plasmodium falciparum* in vitro. N-methyl oliverine and N-methyl oliveridine were shown to have the most intrinsic activity but none of them was as active as chloroquine. Nuciferine, pachyconphine and cassythicine potentiated the effect of chloroquine against chloroquine-resistant strain. An additive effect was displayed by glaucine, laurotetanine and isocorytuberine. Assimilobine, isoboldine, corydine, actinodaphnine, N-methyl oliverine and N-methyl oliveridine exhibit an antagonistic effect toward chloroquine.

Introduction

The association of new drugs with current antimalarial molecules constitutes a new trend in malaria chemotherapy (White 1998). Few data have been collected on the chloroquine potentiating action of drugs from vegetal sources, i.e: tetrandrine, (Ye et al. 1989), the ajoene (Perez et al., 1994) and compounds of Madagascarian origin (Rasoanaivo et al., 1994, 1998). As aporphine alkaloids are known for their broad spectrum of pharmacological properties, including antimalarial activity (Likhitwitayawuid et al., 1993 and 1999 ; Böhlke et al., 1996 ; Boustie et al., 1998 ; Muñoz et al., 1999), we decided to investigate the intrinsic antiplasmodial effect and the activity of combinations with chloroquine of 12 of these compounds (1-12) against *P. falciparum* strains.

Materials and methods

In vitro antimalarial test protocols

All the chemicals were obtained from Sigma USA and the *Plasmodium falciparum* strains D2, F32 were kindly provided by Dr. H. Ginsburg, Hebrew University of Jerusalem, Israel.

Alkaloids were dissolved in ethanol with, if needed a mild sonication in a sonicleaner bath (Branson Ltd), and further diluted as required in RPMI 1640 (Biomedica, France). Chloroquine diphosphate was dissolved in the same medium and diluted.

Two chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* ; D2 (IC₅₀: 128 ± 8 nM) and FcM29 (IC₅₀: 290 ± 10 nM), and one chloroquine-sensitive strain F32 (IC₅₀: 29 ± 5 nM) were cultured continuously according to the method of Trager and Jensen (1976). The D2 and FcM29 strains were synchronized by lysis with 5% D-sorbitol (Lambros et al., 1979). The F32 strain was synchronized by gelatin flotation (Pasvol et al., 1978).

The radioactive micromethod described by Desjardins et al. (1979) was modified as described elsewhere (Valentin et al., 1997). Drug testing was performed three times in triplicate in 96-well culture plates (Nunclon) with cultures containing mostly ring stages at 0.5-1% parasitaemia, 1% haematocrit. One hundred microliters of parasitized culture (2% haematocrit) and 100 µl of medium, containing alkaloids, were mixed in each well. [³H]-hypoxanthine was added 18 hours

after incubation to assess parasite growth. For each test, parasite cultures were incubated with extract for 24, 42 and 72 hours. When the experiment ended, the plates were frozen, thawed and the suspension harvested onto nylon filter discs. Radioactivity retained on the filter was measured in a Triathler liquid scintillation spectrometer (LKB Sweden). The incorporation of [^3H]-hypoxanthine by the parasite in the presence of the drugs was compared with control cultures without alkaloids. Fifty per cent inhibitory concentration (IC₅₀) and 90 % inhibitory concentration (IC₉₀) were determined graphically in terms of concentration versus inhibition percentage.

Activity enhancement index (AEI) was calculated by dividing the IC₉₀ for chloroquine alone by the IC₉₀ for chloroquine plus alkaloids (Peters et al., 1989).

In the present study, potentiation of chloroquine was defined as AEI equal to or greater than 1.5. Complete reversal of chloroquine resistance was defined as decrease of IC₅₀ values for chloroquine lesser than or equal to 70nM (similar to the values of IC₅₀ in chloroquine-sensitive parasites) and partial reversal of chloroquine resistance as diminution of IC₅₀ values between 70 and 120 nM. The cut-off point for in vitro chloroquine resistance was 90 –120 nM.

Isobolograms were constructed by plotting a pair of fractional IC₅₀ for each combination of chloroquine and alkaloids (Martin et al., 1987). Chloroquine fractional IC₅₀ was calculated by dividing the IC₅₀ of chloroquine combined with alkaloids by the IC₅₀ of chloroquine alone, and plotted on the horizontal axis. The corresponding alkaloids fractional IC₅₀ was calculated by dividing its fixed concentration by the IC₅₀ of alkaloids alone, and plotted on the vertical axis. A curve was then traced through the resulting pairs of fraction from the ends of both axes on the graph. "Potentiation", "additivity", and "antagonism", classical terms used to describe isobolograms, were defined on the basis of the form of the curves : concave for potentiation, convex for antagonism, and following the diagonal for additivity.

Effect on membrane transport in infected red blood cells.

The effect on the permeability pathways induced in membranes of erythrocytes infected with malaria parasites was evaluated from the technique described by Kutner et al. (1987) and modified

as follows. Briefly, F32 infected cells synchronized by gelatin flotation (parasitaemia >70%) were washed with phosphate-buffered saline (PBS, Na-phosphate 10mM, NaCl 150mM, pH7.4) and resuspended in the same buffer at 0.5% hematocrit with increasing concentrations of the drug and with an isotonic solution of sorbitol (200 mM)+NaCl (50mM) + Na-phosphate (5mM), pH 7.4, at room temperature. Triplicate samples of 0.4 ml were withdrawn at 1, 5, 30, and 60 min, transferred to Ependorff centrifuge tubes and spun for 10 s, after which 0.3 ml aliquots of the supernatants were diluted 5-fold with double distilled water and read on a plate reader (Titer Multiskan) for hemoglobin content at 405 nm. In parallel, 50 μ L of the cell suspension were diluted with 4 ml of double distilled water and their hemoglobin absorbance (maximal lysis) was used for calculating the percentage lysis.

Results and discussion

The IC₅₀ of the 12 alkaloids are summarized in Table 1. Ten alkaloids were tested alone in vitro and then in combination with CQ against *P. falciparum* (D2 strain) and 2 alkaloids against *P. falciparum* (FcM29 strain). None of the alkaloids evaluated alone were as active as was chloroquine.

To differentiate the antimalarial activity of the alkaloids on maturation or on reinvasion, parasites cultures were incubated with alkaloids for 24 and 72 h. This second incubation time allowed the estimation of potentially cumulative effects on essential biochemical pathways of the parasites and the observation of potentially adaptative mechanisms of the parasite to the drug.

The IC₅₀ values of the first 10 alkaloids, after the 24 h contact with the parasites, ranged from 3.2 to 51.4 μ M. After the 42 h contact, the IC₅₀ values were comprised between 3.4 to 45.6 μ M and after the 72 h contact the values ranged from 1.8 to 14.7 μ M. The most active alkaloids, evaluated with the D2 strain were corydine (**9**) and isocorytuberine (**10**) for all three incubation times used.

For glaucine (**1**), the 72 h contact with the parasite revealed a strong cumulative effect. It appeared that the alkaloids interfered with the reinvasion proces of the parasite into the erythrocytes.

The most active alkaloids of this series (3, 7, 9 and 10) show free hydroxyl groups, a N-methyl and the configuration at C-6a is S.

The IC₅₀ of N-methyl oliverine and N-methyl oliveridine (11 – 12) tested on the FcM29 chloroquino-resistant strain, were respectively 1.7 and 1.2 μM after the 24 h incubation time and 0.5 μM after a 72 h incubation. For the Nigerian chloroquino sensitive strain (data not shown), the IC₅₀ were similar for the two drugs. Sensibility of *P. falciparum* in vitro to the two alkaloids did not appear to be modified by the chloroquine status of the strain tested. On the other hand, a clear cumulative effect for both molecules was observed when the incubation was maintained for two erythrocytic cycles. The quaternization of the nitrogen atom as in roemrefidine (Muñoz et al., 1999) leads to an increase in plasmodial activity.

In order to satisfy its intense metabolic needs, the intraerythrocytic parasite induces marked permeability changes in the host cell membrane. Membrane pores are detected 6 h after parasites invaded red cells and *Plasmodium* increases in number with its intraerythrocytic development. It was suggested that the pores subserve parasite development by providing alternative or supplementary routes of passage of vital materials such as carbohydrates, amino acids and carboxylic acids. Those dramatic changes in membrane permeability are indispensable for the parasite to develop (Ginsburg, 1990 ; Kutner et al., 1985). We have demonstrated that the aporphine alkaloids do not perturbate the transport mechanisms created by intraerythrocytic parasites (data not shown).

Rasoainavo et al., 1998 showed that laudanosine, a biosynthesis precursor of aporphinoids potentiates the activity of chloroquine in vivo as well as in vitro. Moreover, an other aporphine alkaloid (-)-roemerine, isolated from *Annona senegalensis* was considered to be a Multi Drug Resistant reversing agent as it was able to enhance the cytotoxicity response mediated by vinblastine on multidrug-resistant KB cells (You et al. 1995). Böhlke et al., 1996 showed an additive effect on *P. falciparum* in vitro with the association of bisbenzylisoquinoline alkaloids (+)-costaricine and aporphine alkaloid (+)-laurolitsine.

In our work, nuciferine (**6**), pachyconphine (**7**) and cassythicine (**5**) potentiated chloroquine action at 2.1, 1.7 and 3 μM respectively against the chloroquine-resistant strain D2 (Fig. 1 and Table 2). Chloroquine resistance was completely reversed with 1.5 μM of **6**, 3.4 μM of **7** and 6 μM of **5** in D2 strain. The best result was obtained with **6** which could therefore be the best potentializing agent of the series. The alkaloids **3**, **4**, **8**, **9** exhibit an antagonistic effect toward chloroquine in a drug combination evaluation as supported by the convex shape of the isobologram curve in D2 strain (Fig. 2). Alkaloids **11** and **12** also showed an antagonistic effect in FcM29 strain (data not shown). With the chloroquine-resistant strain D2, glaucine (**1**), laurotenine (**2**) and isocorituberine (**10**) were additive with chloroquine (fig 3).

The most promising aporphinic alkaloids of this serie has to be evaluated for their in vivo aptitude to restore the chloroquine sensitivity in resistant strains of *Plasmodium* sp:

References

Böhlke M, Guinaudeau H, Angerhofer CK, Wongpanich V, Soejarto DD, Farnsworth NR et al. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *Journal of Natural Products* 1996; 59: 577-580.

Boustie J, Stigliani JL, Montanha J, Amoros M, Payard M, Girre L. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal of Natural Products* 1998; 61: 480 - 484.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD . Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979; 16 : 710-718.

Martin SK, AMJ Oduola, WK Milhous. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamyl. *Science* 1987; 235: 899-901

Ginsburg H. Alterations caused by the intraerythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1990; 95; 1: 31-39.

Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Cabantchik ZI. On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical pharmacology* 1987; 36: 123-129.

Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *Journal of Cellular Physiology* 1985; 125: 521-527.

Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology* 1979; 65: 418-420.

Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *Journal of Natural Products* 1993; 56: 1468-1478.

Likhitwitayawuid K, Dej-adisai S, Jongunprasert V, Krungkrai J. Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Medica* 1999; 65: 754-756.

Muñoz V, Sauvain M, Mollinedo P, Callapa J, Rojas I, Gimenez A, Valentin A et al. Antimalarial activity and cytotoxicity of (-) Roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Medica* 1999; 65: 1-2.

Pasvol GR, Wilson JM, Smalley ME, Brown J. Separation of viable shizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1978; 72: 87-88.

Perez HA, De la Rosa M, Apitz R. In vivo activity of Ajoene against rodent malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38: 337-339.

Peters W, Ekong R, Robinson BL, Warhurst DC, Pan XQ. Antihistaminic drugs that reverse chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 1989; ii: 334-335.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Milijaona R, Rafatro H, Rakoto-Ratsimamanga A, Galeffi C, Nicoletti M. In vitro and in vivo chloroquine-potentiating action of *Strychnos myrtoides* alkaloids against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium malariae*. *Planta Medica* 1994; 60: 13-16.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Rafatro H, Ramanitrahasimbola D, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M. Alkaloids of *Hernandia voyronii*: chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of Herveine D. *Planta Medica* 1998; 64:58-62.

Trager W, Jensen J. Human malarian parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673-675.

Valentin A, Benoit-Vical F, Moulis C, Stanislas E, Mallié M et al. In vitro antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 2305-2307.

White NJ. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 3-9.

Ye Z, Dyke KV, Castranova V. The potentiating action of tetrandrine in combination with chloroquine or qinghaosu against chloroquine-sensitive and resistant *falciparum* malaria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989; 165: 758-765.

Dr. Michel Sauvain

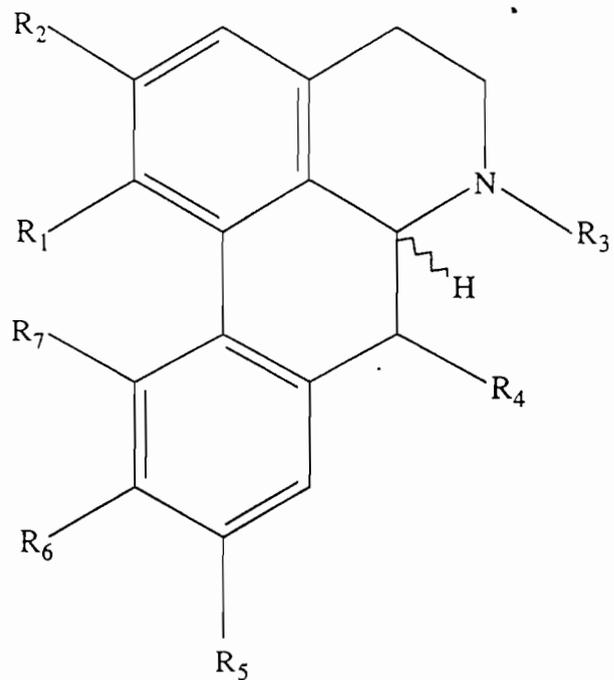
Institut de Recherche pour le Développement

213 rue Lafayette, 75480 Paris Cedex 10

France

email : sauvain@ird.fr

fax: + 33 1 48 03 78 06



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
1	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
2	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H
3	OH	OCH ₃	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H
4	O-CH ₂ -O		H	H	OH	OCH ₃	H
5	O-CH ₂ -O		CH ₃	H	OH	OCH ₃	H
6	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	H	H
7	OCH ₃	OH	CH ₃	OH	H	H	H
8	OCH ₃	OH	CF ₃ - COO	H	H	H	H
9	OH	OCH ₃	CH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃
10	OH	OCH ₃	CH ₃	H	H	OH	OCH ₃
11	O-CH ₂ -O		CH ₃ CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
12	O-CH ₂ -O		CH ₃ CH ₃	OH	OCH ₃	H	H

Table 1. In vitro antimalarial activity of aporphinoids alkaloids against strains of *Plasmodium falciparum*.

Alkaloids	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	24 h	72 h	42 h
Strain D2			
S (+) Glaucine 1	51.4 ± 9.0	12.7 ± 7.0	45.6 ± 3.1
S (+) Laurotetanine 2	24.4 ± 4.3	15.3 ± 8.6	35.1 ± 9.2
S (+) Isoboldine 3	10.4 ± 5.4	4.3 ± 2.6	6.3 ± 2.5
S (+) Actinodaphnine 4	25.7 ± 4.5	9.9 ± 0.4	17.9 ± 4.1
S (+) Cassythicine 5	19.4 ± 7.4	13.4 ± 11.5	10.1 ± 2.8
R (-) Nuciferine 6	11.8 ± 0.4	9.4 ± 0.4	6.6 ± 0.2
S (+) Pachyconfine 7	20.4 ± 4.5	5.2 ± 1.2	9.1 ± 0.3
R (-) Assimilobine 8	23.9 ± 4.6	14.7 ± 4.0	14.5 ± 5.5
S (+) Corydine 9	3.2 ± 1.3	1.8 ± 1.1	3.4 ± 1.7
S (+) Isocorytuberine 10	3.7 ± 0.9	1.8 ± 1.3	5.9 ± 1.4
Strain FcM29			
R (-) N-methyl Oliverine 11	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	
R (-) N-methyl Oliveridine 12	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1	

Table 2. In vitro chloroquine potentiating action of alkaloids against the chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum* D2

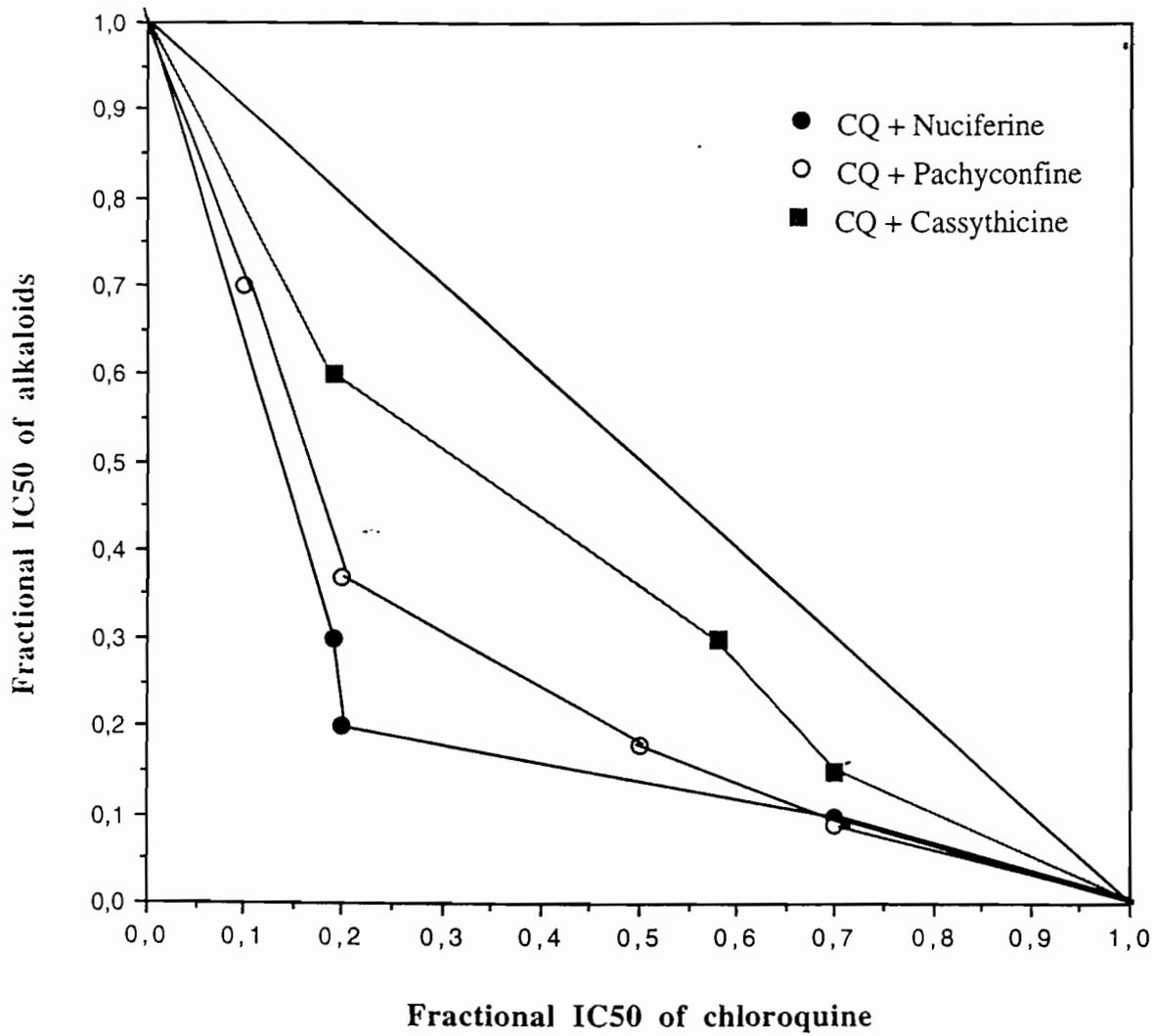
Alkaloids	Concentration (μM)	In vitro chloroquine activity*		
		IC ₅₀ CQ (nM)	IC ₉₀ CQ (nM)	AEI**
Cassythicine 5	0***	134 \pm 8	226 \pm 8	-
	1.5	99 \pm 35	193 \pm 17	1,2
	3.0	79 \pm 13	149 \pm 8	1,5
	6.0	26 \pm 17	127 \pm 63	1,8
Nuciferine 6	0***	105 \pm 4	164 \pm 5	-
	0.6	81 \pm 10	144 \pm 19	1,14
	1.5	22 \pm 5	116 \pm 16	1,4
	2.1	20 \pm 5	57 \pm 17	2,9
Pachyconfine 7	0***	149 \pm 13	238 \pm 3	-
	0.8	116 \pm 21	201 \pm 12	1,2
	1.7	80 \pm 4	145 \pm 3	1,6
	3.4	36 \pm 13	90 \pm 25	2,6
	6.8	17 \pm 4	52 \pm 13	4,6

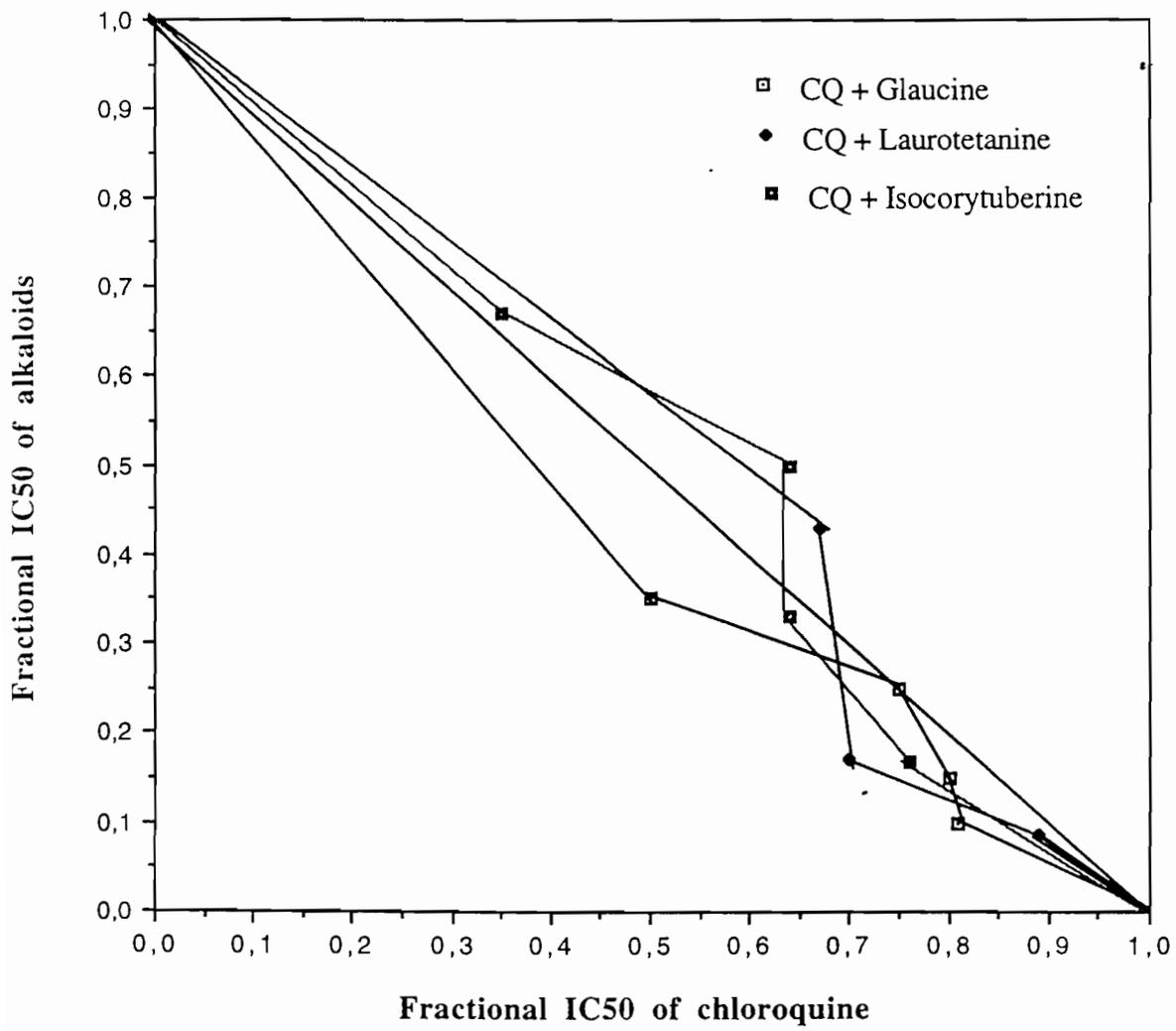
* Mean values of IC₅₀ and IC₉₀ (\pm SEM) were determined by testing each concentration of chloroquine in triplicate.

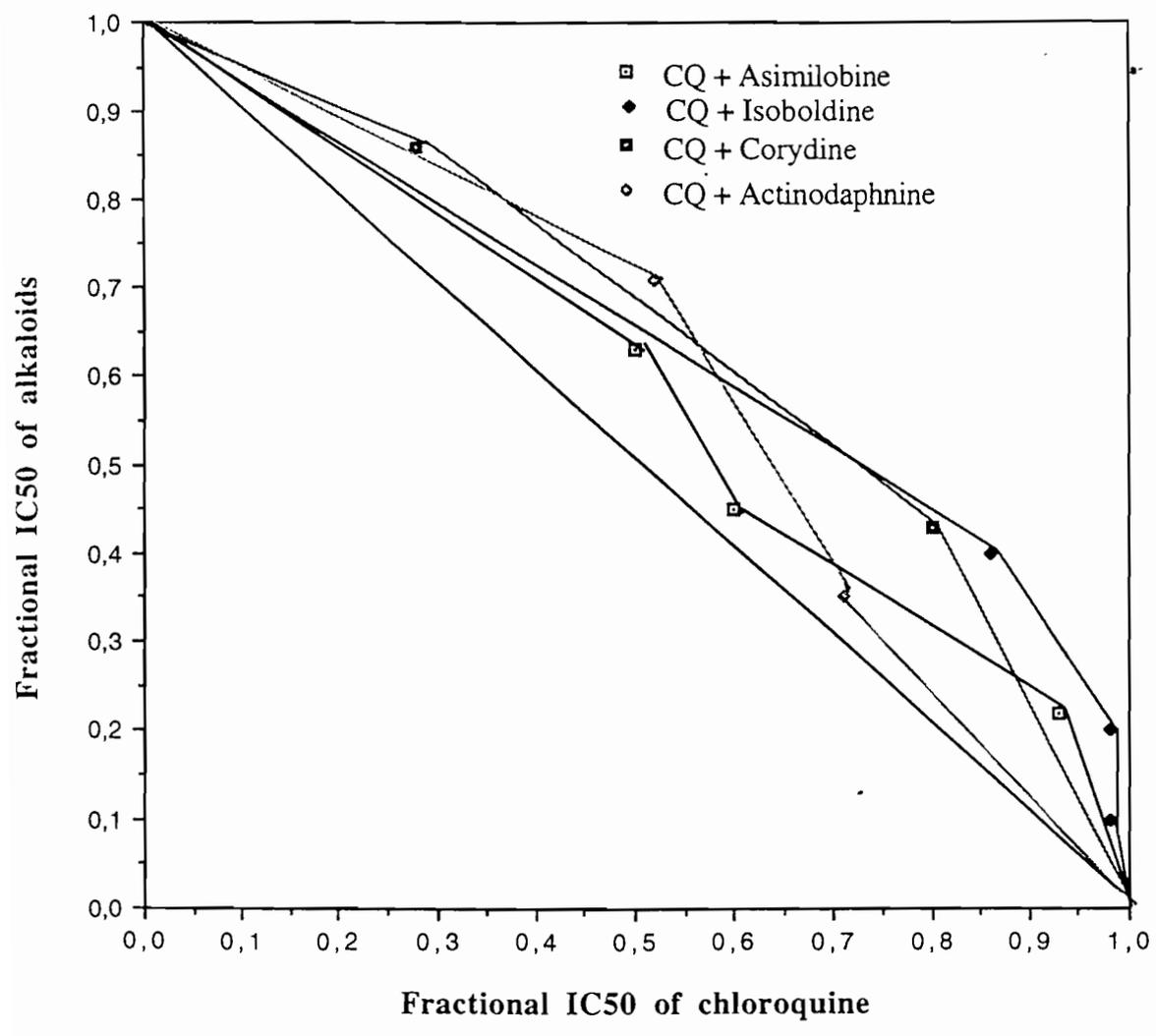
** Activity enhancement index (AEI=IC₉₀ of chloroquine alone divided by IC₉₀ of chloroquine plus alkaloids).

*** Chloroquine alone

Fig. 1 to 3 : Isobolograms of interaction in vitro between chloroquine and aporphinic alkaloids in chloroquine-resistant strain D2. Each point represents a fractional IC50 of the respective alkaloids and its corresponding fractional IC50 of chloroquine.







CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré les nombreux efforts réalisés pour éradiquer le paludisme, l'incidence de cette parasitose s'aggrave de jour en jour en raison, entre autres, de l'apparition de souches de parasites résistantes aux différents antimalariques. La stratégie de développement de nouveaux médicaments est donc essentielle pour le contrôle du paludisme. Dans ce domaine, la médecine traditionnelle occupe une place importante comme source potentielle de nouvelles molécules à activité antiparasitaire.

Depuis plus de 9 ans, le laboratoire de Pharmacognosie de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude de la Faculté de Médecine de l'Université Supérieure de San Andrés s'intéresse à la recherche de substances utilisées dans les pharmacopées traditionnelles boliviennes contre les fièvres en général et contre le paludisme en particulier.

La recherche sur les substances naturelles à activité antiparasitaire repose sur la participation simultanée de plusieurs disciplines scientifiques. C'est pourquoi, depuis 1993, nous collaborons avec plusieurs institutions (Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Químicas) au sein d'un programme intitulé: "Sustancias naturales antiparasitarias" (substances naturelles antiparasitaires) qui a un objectif principal:

- la recherche des alternatives aux traitements classiques qui soient plus efficaces, moins toxiques et plus accessibles au plus démunis, à partir d'espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle.

Nous avons comme objectif secondaire:

- la validation scientifique des connaissances traditionnelles ancestrales à partir d'études phytochimiques et pharmacologiques.
- l'inventaire ethnobotanique et ethnopharmacologique de la flore utilisée par différents groupes ethniques;
- La sélection des plantes les plus actives et les moins toxiques pour l'isolement et l'identification des principes actifs sur la base d'un fractionnement biodirigé.

Évaluation de l'activité antimalarique de plantes utilisées par l'ethnie Chacobo:

La conjonction de la destruction de la forêt amazonienne et du phénomène d'acculturation subi par les populations indigènes conduit à la perte irrémédiable d'informations sur les plantes et leur utilisation dans les thérapeutiques locales. C'est pourquoi il est fondamentale d'étudier cette richesse floristique et ethnopharmacologiques au plus vite avant qu'elle ne disparaisse. Nous avons choisi d'étudier l'ethnie des Chacobo en raison de leur connaissance profonde du milieu et de la diversité biologique qui les entourent. Il subissent également le phénomène d'acculturation qui se traduit par la perte de leurs cérémonies, de leurs modes vestimentaires et de leurs croyances.

Parmi les 156 espèces végétales utilisées par les Chacobo pour soigner ou soulager divers symptômes ou maladies, nous avons sélectionné 30 espèces pour une évaluation de l'activité antimalarique *in vitro* contre 2 espèces plasmodiales (chloroquinorésistante, Indo et sensible F32) et *in vivo* sur 2 espèces de *Plasmodium* de muridé (*P. vinckei petteri* et *P. berghei* NK65).

Sur les 30 espèces végétales évaluées, 11 (36 %) ont montré une activité intéressante *in vivo* (84 % - 53 % d'inhibition entre 50 mg/kg et 250 mg/kg), et 21 % des extraits testés *in vitro* se sont révélés actifs (IC₅₀ entre 1.7 – 10 µg/ml).

Des études phytochimiques biodirigées ont été entreprises sur les plantes les plus actives. De même, a été déterminée la cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires ainsi que les concentrations minimales inhibitrices *in vivo*, de plus nous évaluons de nouveau les extraits par des voies d'administration différentes.

***Sparattanthelium amazonum*. Mart. (Hernandiaceae):**

Parmi les plantes montrant une bonne activité antimalarique nous avons choisi de procéder au fractionnement biodirigé de *Sparattanthelium amazonum*. Ceci nous a permis d'isoler un alcaloïde quaternaire aporphinique la (-)-roemréfidine qui présente une activité antimalarique aussi bien *in vitro* (contre des souches chloroquinosensibles et résistantes) qu'*in vivo* (sur *Plasmodium berghei*). Nous avons pu constater que ce composé agit sur la maturation du parasite et qu'il ne présente pas de toxicité sur les lignées cellulaires KB, Hep - 2 et HeLa.

Alcaloïdes de type aporphinique:

Ces résultats nous ont motivé pour étudier l'activité antimalarique d'autres alcaloïdes de type aporphinique. Ainsi nous avons démontré l'activité intrinsèque de 12 alcaloïdes aporphiniques (fumarate de glaucine, laurotétanine, isoboldine HCl, actinodaphnine, cassythicine, nuciferine HCl, pachyconfine, asimilobine (N-CF₃COOH), corydine, isocorituberine), contre la souche D2 de *Plasmodium falciparum* et (chlorométhylate d'oliverine, chlorométhylate d'oliveridine), contre la souche FcM29, évalués sur différents temps de contact avec le parasite. Nous avons pu mettre en évidence que tous ces alcaloïdes avaient un effet cumulatif. La glaucine fumarate a un fort effet cumulatif, donc elle pourrait agir au niveau de la réinvasion.

Ceci dit, le niveau d'activité observé ne dépasse pas celui de la chloroquine. Par la construction d'isobogrammes, nous avons constaté que le chlorhydrate de nuciferine, la pachyconfine et la cassythicine potentialisent l'action de la chloroquine contre la souche D2 de *P. falciparum* et reverse la résistance à la chloroquine.

Par ailleurs nous avons également montré qu'aucun des alcaloïdes étudiés n'agissaient au niveau de la perméabilité membranaire induite par le parasite. Les

alcaloïdes synergisants sont le fumarate de glaucine, la laurotétanine et l'isocorytuberine.

L'asimilobine, l'isoboldine, la corydine, l'actinodaphnine, l'oliverine et l'oliveridine chloro-N-méthylate antagonisent l'effet de la chloroquine.

Perspectives:

Dans un travail commun avec le Ministère de la Prévision Sociale et de la Santé Publique de Bolivie, nous sommes en train d'isoler à partir de patients des souches de *Plasmodium falciparum* et d'étudier leurs profils de chimiosensibilité sur un panel d'antimalariques. Cette étude a pour objectif de cartographier la sensibilité de *Plasmodium* dans les différentes zones d'endémies du pays. A ce jour, 30 souches ont été isolées. Ce matériel biologique nous permettra de vérifier les activités antimalariques des extraits végétaux sur des souches sauvages.

Nous nous intéressons également aux techniques de détection de l'activité antimalarique qui ne font pas intervenir de matériel radiomarqué afin de réduire l'utilisation de matériel polluant (liquide de scintillation...). Pour cela nous avons adapté à nos conditions opératoires la technique de la lactate déshydrogénase.

Un des métabolites de la glycolyse est le lactate qui est transformé en pyruvate à l'aide d'une enzyme, la lactate déshydrogénase.

En effet, la lactate déshydrogénase du stade érythrocytaire de *Plasmodium* (pLDH) est capable d'utiliser le 3-acetyl pyridine NAD (APAD) comme coenzyme dans la réaction conduisant à la formation de pyruvate à partir du lactate.

La LDH permet de réduire le NAD (Nicotinamide dinucléotide) en NADH ou bien l'APAD en APADH. A son tour le NADH ou l'APADH peut réduire le Nitro Bleu de Tetrazolium (NBT) en Formazan bleu qui absorbe à 650 nm.

Les profils d'inhibition de croissance de souches plasmodiales par la chloroquine montrent des résultats comparables avec les méthodes classiques comme la mesure de l'incorporation de la ³H-hypoxanthine ou bien la lecture de frottis colorés au Giemsa.

Le test de la pLDH est reproductible, facilement interprétable, nettement moins coûteux que le test à l'hypoxanthine marquée et beaucoup plus rapide que le comptage au microscope.

Notre domaine d'activité nous conduit également à aborder l'étude des mécanismes d'action. C'est pourquoi nous avons mis au point une technique d'étude de la formation d'une hemozoïne de synthèse, la Béta-hématine. Dans sa phase érythrocytaire, *Plasmodium* consomme de l'hémoglobine, utilisant les acides aminés de la globine pour ses synthèses protéiques et se débarrasse des noyaux héminiques toxiques en les polymérisant sous forme d'hemozoïne. Selon certains auteurs, il est possible de fabriquer une hemozoïne "like" sans culture de parasite. Il devient alors commode d'étudier l'impact d'une drogue sur la synthèse de la bêta-hématine. Tout composé bloquant sa formation est alors potentiellement antimalarique.

A l'avenir, pour tenter de faire face aux problèmes de renouvellement des médicament antipaludique; la chimiothérapie devra faire appel à des associations médicamenteuses; qui reste le moyen en théorie le plus satisfaisant de retarder l'émergence des résistances, des associations de molécules suppose aussi que l'arsenal thérapeutique s'enrichisse suffisamment et que les mécanisme d'action des médicaments soit connus.

BIBLIOGRAPHIE

Acton N, Klayman DL, 1985. Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxyde from *Artemisia annua*. *Planta Med.* **51**:441-442.

Almeida Alves TM, Nagem TJ, Carvalho LH, Krettli AU, Zani CL, 1997. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliensis*. *Planta Med.* **63**:554-555.

Ajaiyeoba EO, Abalogu UI, Krebs HC, Oduola AMJ, 1999. In vivo antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.* **67**:321-325.

Amador R, Moreno LA, 1992. Safety and immunogenicity of the synthetic malaria vaccine Spf66 in a large field trial. *J. Infect. Dis.* **166**:139-144.

Anderson MM, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC, 1991. In vitro cytotoxicity of a series of quassinoids from *Brucea javanica* fruits against KB cells. *Planta Med.* **57**:62-64.

Ang HH, Chan KL, Mak JW, 1995. In vitro antimalarial activity of quassinoids from *Eurycoma longifolia* against Malaysian chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates. *Planta Med.* **61**:77-178.

Angerhofer CK, Guinaudeau H, Wongpanich V, Pezzuto JM, Cordell GA, 1999. Antimalarial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* **62**:59-66.

Avila JC, 1993. Prueba de sensibilidad *in vivo* de *Plasmodium falciparum* a la cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina. Informe presentado al Ministerio de Previsión Social y Salud Pública. Dirección Nacional de Epidemiología. Servicio Nacional Control de la Malaria.

Barennes H, Munjakazi J, Verdier F, Clavier F, Pussard E, 1998. An open randomized clinical study of intrarectal versus infused Quinimax® for the treatment of childhood cerebral malaria in Niger. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**:437-440.

Barnwell JW, Galinski MR, 1998. Invasion of vertebrate cells. Erythrocytes. In: Malaria. Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. Ed. Irwin W. Sherman. ASM Press, Washington DC, 93-134.

Basco LK, Ringwald P, Le Bras J, 1991. Chloroquine-potentiating action of antihistaminics in *Plasmodium falciparum* in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **85**:223-228.

Basco LK, Ruggeri C, Le Bras J, 1994. Molécules antipaludiques : mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins. Ed. Masson, Paris.

Basco LK, Ringwald P, 1999. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and polymorphisme of the CG2 gene. *J. Infect. Dis.* **180**:1979-1986.

Benoit F, Valentin A, Pélissier F, Diafouka F, Marion C, Kone-Bamba D, Kone M, Mallié M, Yapo A, Bastide JM, 1996a. In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in west african traditional medicine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**:67-71.

Benoit F, Valentin A, Pélissier Y, Marion C, Dakuyo Z, Mallié M, Bastide JM, 1995. Antimalarial activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**:217-218.

Benoit-Vical F, Valentin A, Pelissier Y, Marion C, Castel D, Milhau M, Mallié M, Bastide JM, Diafouka F, Kone-Bamba D, Malan A, Kone M, Loukou Y, Monet D, Ake-Assi L, Yapo A, 1996b. Confirmation, in vitro, de l'activité antimalarique de certaines plantes d'origine africaine utilisées en médecine traditionnelle. *Méd. Afr. Noire.* **43**:393-400.

Benoit-Vical F, Valentin A, Mallié M, Bastide JM, Bessière JM, 1999. In vitro antimalarial activity and cytotoxicity of *Cochlospermum tinctorium* and *C. planchonii* leaf extracts and essential oils. *Planta Med.* **65**:378-381.

Bergeron S, 1993. Approche Préliminaire de la Classification Botanique Chacobo. (Departement du Beni, Province Vaca Diez, Bolivie). Ed., Institut Français des Etudes Andines. Lima, Peru.

Bergeron S, 2000. El uso de las plantas por los Chacobos (Alto-Ivon, Beni, Bolivia). Ed., IBIS Dinamarca, La Paz, Bolivia. (En cours d'impression).

Bitonti AJ, Sjoerdsma A, McCann PP, Kyle DE, Oduola AMJ, Rossan RN, Milhous WK, Davidson DE, 1988. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science.* **242**:1301-1303.

Björkman A, Willcox M, Marbiah N, Payne D, 1991. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to different doses of quinine in vivo and to quinine and quinidine in vitro in relation to chloroquine in Liberia. *Bull. WHO.* **69**:459-465.

Böhlke M, Guinaudeau H, Angerhofer CK, Wongpanich V, Soejarto DD, Farnsworth NR, Mora GA, Poveda LJ, 1996. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *J. Nat. Prod.* **59**:577-580.

Boom BM, 1987. Ethnobotany of the Chácobo Indians, Beni, Bolivia. *Edv. Econ. Bot.* **4**:1-68.

Boom BM, 1988. Los Indios Chacobos y su selva: Etnobotánica de una tribu panoan en el noreste de Bolivia. *Mus. Nac. His. Nat.* (Bolivia) Communication No. 7:3-23.

Botero D, Restrepo M, 1995. Parasitosis humana. Ed., Corporación para Investigaciones Biológicas. Bogotá, Colombia.

Boulos M, Dutra AP, Di Santi SM, Shiroma M, Amato Neto V, 1997. Clinical evaluation of quinine for the treatment of falciparum malaria. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30**:211-213.

- Bray DH, Boardman P, O'Neill MJ, Chan KL, Phillipson JD, Warhurst DC, Suffness M, 1987. Plants as a source of antimalarial drugs. 5. Activities of *Ailanthus altissima* stem constituents and of some related quassinoids. *Phytother. Res.* **1**:22-24.
- Bray DH, O'Neill MJ, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, 1985. Structure related in vitro antimalarial activities of some quassinoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**:142.
- Bray DH, Warhurst DC, Connolly JD, O'Neill MJ, Phillipson JD, 1990. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytother. Res.* **4**:29-35.
- Bringmann G, Saeb W, Aké Assi L, François G, Narayanan ASS, Peters K, Peters EM, 1997. Betulinic acid: Isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med.* **63**:255-257.
- Brossi A, Venugopalan B, Gerpe LD, Yeh HJC, Flippen-Anderson JL, Buchs P, Luo XD, Milhous W, Peters W, 1988. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *J. Med. Chem.* **31**:645-650.
- Brown GD, 1993. Annulide, a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* **32**:391-393.
- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2nd ed., Technique et Documentation: Lavoisier, Paris.
- Bryskier A, Labro MT, 1988. Paludisme et médicaments. Ed. Arnette, Paris.
- Cabral JA, McChesney JD, Milhous WK, 1993. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *J. Nat. Prod.* **56**:1954-1961.
- Campbell WE, Nair JJ, Gammon DW, Bastida J, Codina C, Viladomat F, Smith PJ, Albrecht CF, 1998. Citotoxic and antimalarial alkaloids from *Brunsvigia littoralis*. *Planta Med.* **64**:91-93.
- Carme B, 1995. Facteurs de gravité du paludisme en Afrique sub-Saharienne. Aspects épidémiologiques. *Méd. Mal. Infect.* **25**:815-822.
- Carvalho LH, Brandão MGL, Santos-Filho D, Lopes JLC, Krettli AU, 1991. Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **24**:1113-1123.
- Chaiwisut B, 1998. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria: a preliminary report. *J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents.* **15**:69-73.
- Chan KL, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC, 1986. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 3: *Eurycoma longifolia*. *Planta Med.* **2**:105-107.

Chang HM, But PP, 1986-1987. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, volumes 1 (1986) and 2 (1987), Singapore: World Scientific.

Chanphen R, Thebtaranonth Y, Wanauppathamkul S, Yuthavong Y, 1998. Antimalarial principles from *Artemisia indica*. *J. Nat. Prod.* **61**:1146-1147

Chavez de Michel R, 1999. Observations faites selon les etiquetes d'herbier de l'Herbario Nacional de Bolivia (LPB).

Chawira AN, Warhurst DC, Peters W, 1986. Artemisinin (qinghaosu) combinations against chloroquine-sensitive and resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**:335.

Chawira AN, Warhurst DC, 1987. The effect of artemisinin combined with standar antimalarials against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Trop. Med. Hyg.* **90**:1-8.

Chen M, Theander TG, Christensen SB, Hviid L, Zhai L, Kharazmi A, 1994. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1470-1475.

Chen YT, Ma L, Mei Q, Tang Y, Liao XG, 1994. An experimental trial of artemether in treatment of *Pneumocystis carinii* in immunosupressed rats. *Chin. Med. J.* **107**:673-677.

China Cooperative Research Group on Qinghaosu and its Derivatives as Antimalarials 1982. Antimalarial efficacy and mode of action of qinghaosu and its derivatives in experimental models. *J. Tradi. Chin. Med.* **2**:17-24.

Chotivanich KT, Udomsangpetch R, Pipitaporn B, Angus B, Suputtamongkol Y, Pukrittayakamee S, White NJ, 1998. Rosetting characteristics of uninfected erythrocytes from healthy individuals and malaria patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**:45-56.

Chou AC, Chevli R, Fitch CD, 1980. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasite. *Biochemistry.* **19**:1543-1549.

Clark IA, Cowden WB, Butcher GA, 1983. Free oxygen radical generators as antimalarial drugs. *Lancet.* **1**:234.

Clark JT, Donachie S, Anand R, Wilson CF, Heidrich HG, McBride JS, 1989. 46-53 kilodalton glucoprotein from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**:15-24.

Coatney GR, 1963. Pitfalls in a discovery: The chronicle of chloroquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **12**:121-128.

Colwell WT, Brown V, Christie P, Lange J, Reece C, Yamamoto K, Henry DW, 1972. Antimalarial arylaminopropanols. *J. Med. Chem.* **15**:771-775.

Couto AA, Calvosa VS, Santos MA, Souza JM, 1993. Resistência in vitro de cepas do *Plasmodium falciparum* isoladas no sul do estado do Pará, em diferentes períodos: emergência de casos de multirresistência. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **26**:5-9.

Couto M, 1908. Les injections endo-veineuses de bleu de méthylène dans le paludisme. *Bull. Soc. Pathol. Exot. et ses filiales.* **1**:292-295.

Creasey WA, 1976. Biochemical effects of d-tetrandrine and thalictarpine. *Biochem. Pharmacol.* **25**:1887-1891.

Cumming JN, Ploypradith P, Posner GH, 1997. Antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu) and related trioxanes: mechanisms of action. *Adv. Pharmacol.* **37**:253-297.

Deharo E, Sauvain M, Moretti C, Richard B, Ruiz E, Massiot G, 1992. Activité antipaludique du n-hentriacontanol isolé de *Cuatresia* sp (Solanaceae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **67**:126-127.

Delaveau P, 1990. Armoise annuelle. *Actual Pharm.* **277**:48-49.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes D, Chulay JD, 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**:710-718.

Dreyfuss G, Allais DP, Guinaudeau H, Bruneton J, 1987. Recherche de l'activité antimalarique de divers alcaloïdes isoquinoléiques chez la souris. *Ann. Pharmaceutiques Françaises.* **45**:361-366.

Druilhe P, Brandicourt O, Chongsuphajaisiddhi T, Berthe J, 1988. Activity of a combination of three Cinchona bark alkaloids against *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**:250-254.

Ekong R, Partridge SJ, Anderson MM, Kirby GC, Warhurst DC, Russell PF, Phillipson JD, 1991. *Plasmodium falciparum* effects of phaeanthine, a naturally occurring bisbenzylisoquinoline alkaloid, on chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites in vitro, and its influence on chloroquine activity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**:753-742.

Ekong R, Warhurst DE, 1990. Synergism between arteether and mefloquine or quinine in a multidrug-resistant strain of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:757-758.

El-Ferally FS, Al-Meshal IA, Khalifa SI, 1989. Epi-deoxyarteannuin B and 6,7-dehydroartemisinic acid from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* **52**:196-198.

Elford BC, 1986. L-glutamine influx in malaria-infected erythrocytes: a target for antimalarials? *Parasitol. Today.* **2**:309-312.

Elford BC, Roberts MF, Phillipson JD, Wilson RJM, 1987. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**:434-436.

- El Tahir A, Satti GM, Khalid SA, 1999. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam) Exell. *J. Ethnopharmacol.* **64**:227-233.
- Farnsworth NR, 1984. How can the well be dry when it is filled with water? *Econ. Bot.* **38**:4-13.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z, 1985a. Medicinal plants in therapy. *Bull. W. H. O.* **63**:965-981.
- Farnsworth NR, Morris RW, 1976. Higher plants, the sleeping giant of drug development. *American Journal of Pharmacy.* **148**:46-52.
- Farnsworth NR, Soejarto DD, 1985b. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Econ. Bot.* **39**:231-240.
- Figueiredo JN, Ráz B, Séquin U, 1998. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. *J. Nat. Prod.* **61**:718-723.
- Fitch CD, 1984. Mode of action of antimalarial drugs. In: Malaria and the red cell. Ciba Foundation Symposium 94. PITMAN. Ed. London, 222-232.
- Fitch CD, Chevli R, Kanjananggulpan P, Dutta P, Chevli K, Chou AC, 1983. Intracellular ferriprotoporphyrin IX is a lytic agent. *Blood.* **62**:1165-1168.
- Fitch CD, Kanjananggulpan P, 1987. The state of ferriprotoporphyrin-IX in malarial pigment. *J. Biol. Chem.* **262**:15552-15555.
- Fitch CD, 1998. Involvement of heme in the antimalarial action of chloroquine. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **109**:97-105.
- Foley M, Tilley L, 1998. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol. Ther.* **79**:55-87.
- Foster S, Phillips M, 1998. Economics and its contribution to the fight against malaria *Ann. Trop. Med. Par.* **92**:391-398.
- François G, Bringmann G, Phillipson JD, Aké Assi L, Dochez C, Rübenacker M, Schneider C, Wéry M, Warhurst DC, Kirby GC, 1994. Activity of extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *A. barteri* against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytochemistry.* **35**:1461-1464.
- François G, Timperman G, Holenz J, Aké Assi L, Geuder T, Maes L, Dubois J, Hanocq M, Bringmann G, 1996a. Naphthylisoquinoline alkaloids exhibit strong growth-inhibiting activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* in vitro-Structure-activity relationships of dioncophylline C. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **90**:115-123.

- François G, Passreiter CM, Woerdenbag HJ, Van Looveren M, 1996b. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med.* **62**:126-129.
- Frédérich M, Tits M, Hayette MP, Brandt V, Penelle J, DeMol P, Llabrès G, Angenot L, 1999. 10⁷-Hydroxyusambarensine, a new antimalarial bisindole alkaloid from the roots of *Strychnos usambarensis*. *J. Nat. Prod.* **62**:619-621.
- Gakunju DMN, Mberu EK, Dossaji SF, Gray AI, Waigh RD, Waterman PG, Watkins WM, 1995. Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2606-2609.
- Gessler MC, Msuya DE, Nkunya MHH, Schär A, Heinrich M, Tanner M, 1995a. Traditional healers in Tanzania: the perception of malaria and its causes. *J. Ethnopharmacol.* **48**:119-130.
- Gessler MC, Msuya DE, Nkunya MHH, Mwasumbi LB, Schär A, Heinrich M, Tanner M, 1995b. Traditional healers in Tanzania: the treatment of malaria with plant remedies. *J. Ethnopharmacol.* **48**:131-144.
- Gessler MC, Nkunya MHH, Mwasumbi LB, Heinrich M, Tanner M, 1994. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Trop.* **56**:65-77.
- Gessler MC, Tanner M, Chollet J, Nkunya MHH, Heinrich M, 1995c. Tanzanian medicinal plants used traditionally for the treatment of malaria: in vivo antimalarial and in vitro cytotoxic activities. *Phyther. Res.* **9**:504-508.
- Ginsburg H, 1988. Effect of calcium antagonists on malaria susceptibility to chloroquine. *Parasitol. Today.* **4**:209-211.
- Ginsburg H, 1990a. Antimalarial drugs: Is the lysosomotropic hypothesis still valid? *Parasitol. Today.* **6**:334-337.
- Ginsburg H, 1990b. Alterations caused by the intraerythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. *Comp. Biochem. Physiol.* **95**:31-39.
- Ginsburg H, Stein WD, 1987b. New permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of its host erythrocyte: Potential routes for targeting drugs into infected cells. *Biosci. Report.* **7**:455-463.
- Ginsburg H, Stein WD, 1987a. Biophysical analysis of novel transport pathways induced in red blood cell membranes. *J. Memb. Biol.* **96**:1-10.
- Goodson JA, Henry TA, Mac Fie JWS, 1930. Action of chinchona and other alkaloids in bird malaria. *Biochem. J.* **28**:874-890.
- Greenwood BM, Marsk K, Snow R, 1991. Why do some African children develop severe malaria? *Parasitol. Today.* **7**:277-281.

- Grellier P, Ramiamanana L, Millerioux V, Deharo E, Schrevel J, Frappier F, Trigalo F, Bodo B, Pousset JL, 1996. Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytother. Res.* **10**:317-321.
- Gu HM, Warhurst DC, Peters W, 1983. Rapid action of qinghaosu and related drugs on incorporation of [³H] isoleucine by *Plasmodium falciparum* in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **32**:2463-2466.
- Gu HM, Warhurst DC, Peters W, 1984. Uptake of [³H]-dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**:265-270.
- Guignard JL, 1994. Abrégés de botanique. 9^e éd. Masson. Paris.
- Hakizamungu E, Weri M, 1988. L'usage de plantes médicinales dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle rwandaise. *Bull. Méd. Trad. Pharm.* **2**:11-17.
- Harant H, Delange A, 1980. Parasitologie médicale et pathologie exotique. 6^e ed. Maloine. Paris.
- Hien T, Phu NH, Mai NTH, Chau TTH, Trang TTM, Loc PP, Cuong BM, Dung NT, Vinh H, Waller DJ, White NJ, 1992. An open randomized comparison of intravenous and intramuscular artesunate in severe falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:584-585.
- Hien TT, Day NPJ, Phu NH, Mai NTH, Chau TTH, Loc PP, Sinh DX, Chuong LV, Vinh H, Waller D, Peto TEA, White NJ, 1996. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **335**:76-83.
- Hofheinz W, Merkli B, 1984. Quinine and quinine analogs. In: Antimalarial Drug II. Current antimalarial and new drug development. Peters W, Richard WHG. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg, New York and Tokyo: 60-81.
- Hooper M, Kirby GC, Kulkarni MM, Kulkarni SN, Nagasampagi BA, O'Neill MJ, Phillipson JD, Rojatkari SR, Warhurst DC, 1990. Antimalarial activity of parthenin and its derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **25**:717-723.
- Howard RJ, 1987. Vaccination against malaria: recent advances and the problems of antigenic diversity and other parasite evasions mechanisms. *Int. J. Parasitol.* **17**:17-29.
- Inselburg J, Banyal H, 1984. *P. falciparum*: Synchronization of asexual development using aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor. *Exp. Parasitol.* **10**:48-54.
- Jacobsen PH, Heegaard PM, Koch C, Wasniowska K, Lemnge MM, Jensen JB, Sim BK, 1998. Identification of an erythrocyte binding peptide from the erythrocyte binding antigen, EBA-175, which blocks parasite multiplication and induces peptide-blocking antibodies. *Infect. Immun.* **66**:4203-4207.

- Jensen JB, 1978. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1274-1276.
- Jeremic D, Jokie A, Behbud A, Stefanovic M, 1973. A new type of sesquiterpene lactone isolated from *artemisia annua* L. artemisinin B. *Tetrahedron Letters*. **32**:3039-3042.
- Kain KC, 1993. Antimalarial chemotherapy in the age of drug resistance. *Current Opin. Infect. Dis.* **6**:803-811.
- Kamchonwongpaisan S, Nilanonta C, Tarnchompoo B, Thebtaranonth C, Thebtaranonth Y, Yuthavong Y, Kongsaree P, Clardy J, 1995. An antimalarial peroxide from *Amomum krervanh* Pierre. *Tetrahedron Letters*. **36**:1821-1824.
- Kapadia GJ, Angerhofer CK, Ansa-Asamoah R, 1993. Akuammine: An antimalarial indolemonoterpene alkaloid of *Picralima nitida* seeds. *Planta Med.* **59**:565-566.
- Ke OY, Krug EC, Marr JJ, et Berens et al, 1990. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by qinghaosu and derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1961-1965.
- Kelner M, 1999. Quina. *Fitociencia*. **2**:10-12.
- Killeen TJ, Garcia E, Beck S, 1993. Guia de Arboles de Bolivia. Publie par Herbario Nacional de Bolivia. 958p.
- Kitagawa I, Mahmud T, Simanjuntak P, Hori K, Uji T, Shibuya H, 1994. Indonesian medicinal plants. VIII. Chemical structure of three new triterpenoids, bruceajavanin A, dihydrobruceajavanin A, and bruceajavanin B, and a new alkaloidal glycoside, bruceacanthinoside, from the stems of *Brucea javanica* (Simaroubaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **42**:1416-1421.
- Kitagawa I, Minagawa K, Zhang R, Hori K, Doi M, Inoue M, Ishida T, Kimura M, Uji T, Shibuya H, 1993. Dehatrine, and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloid from the Indonesian medicinal plant *Beilschmiedia madang*, isolated as a mixture of two rotational isomers. *Chem. Pharm. Bull.* **41**:997-999.
- Klayman DL, 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. **228**:1049-1055.
- Klayman DL, Lin AJ, Acton N, 1984. Isolation of artemisinin from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.* **47**:715-717.
- Koffi AA, Darriet F, N'Gressan R, Doannio JM, Carnevale P, 1999. Evaluation au laboratoire de l'efficacité insecticide de l'alpha-cyperméthrine sur les populations d'*Anopheles gambiae* de Côte d'Ivoire résistantes à la deltaméthrine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **92**:62-66.

- Koopmans R, Duc DD, Kager PA, Khanh NX, Dien TK, de Vries PJ, Van Boxtel CJ, 1998. The pharmacokinetics of artemisinin suppositories in Vietnamese patients with malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**:434-436.
- Krogstad DJ, Schlesinger PH, 1987. The basis of antimalarial action: non-weak base effects of chloroquine on acid vesicle pH. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**:212-220.
- Kubitzki K, 1982. "Hernandiaceae". In: Flora de Venezuela, Instituto Nacional de Parques. Dirección investigación biológicas. Volumen IV., Segunda Parte. Ed. Fundación-Educación Ambiental. 317-324.
- Kuile F, White NJ, Holloway P, Pasvol G, Krishna S, 1993. *Plasmodium falciparum*: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp Parasitol.* **76**:85-95.
- Kutner S, Baruch D, Ginsburg H, Cabantchik ZI, 1982. Alterations in membrane permeability of malaria-infected human erythrocytes are related to the growth stage of the parasite. *Biochem. Biophysica Acta.* **687**:113-117.
- Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Aley SB, Cabantchik ZI, 1985. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *J. Cell. Physiol.* **125**:521-527.
- Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Cabantchik ZI, 1987. On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* **36**:123-129.
- Kyle DE, Oduola AMJ, Martin SK, Milhous WK, 1990. *Plasmodium falciparum*: modulation by calcium antagonist of resistance to chloroquine, desethylchloroquine, quinine, and quinidine in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:474-478.
- Lai H, Singh NP, 1995. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Lett.* **91**:41-46.
- Lambros C, Vanderberg JP, 1979. Synchronisation of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **65**:418-420.
- Landau I, Gautret PH, 1998. Animals Models: Rodents. In: Malaria Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. Ed. Irwin. W. Sherman, ASM Press, Washington DC, 401-417.
- Le Bras J, Coulaud JP, 1986. Evolution de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique entre 1983 et 1985. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **44**: 618-625.
- Le Bras M, Malvy D, 1998. Vaccination antipaludique: acquis et controverses. *Rev. Prat.* **48**: 291-295.
- Lee IS, Hufford CD, 1990. Metabolism of antimalarial sesquiterpene lactones. *Pharmacol. Ther.* **48**:345-355.

Lesieur D, Moreau S, 1990. "Les antipaludiques" *Le Moniteur internat*, 15.

Li QG, Peggins JO, Fleckenstein LL, Masonic K, Heiffer MH, Brewer TG, 1998b. The pharmacokinetic and bioavailability of dihydroartemisinin, arteether, artemether, artesunic acid and artelinic acid in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **50**:173-182.

Li QG, Peggins JO, Lin AJ, Masonic KJ, Trotman KM, Brewer TG, 1998. Pharmacology and toxicology of artelinic acid: preclinical investigations on pharmacokinetics, metabolism, protein and red blood cell binding, and acute and anorectic toxicities. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**:332-340.

Li R, Kenyon GL, Cohen FE, Chen X, Gong B, Dominguez JN, Davidson E, Kurzban G, Miller RE, Nuzum EO, Rosenthal PJ, McKerrow JH, 1995. In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem.* **38**:5031-5037.

Li Y, Yu P, Chen Y, Li L, Gai Y, Wang D, Zheng Y, 1981. Studies on analogs of artemisinin.I. The synthesis of ethers, carboxylic esters and carbonates of dihydroartemisinin. *Acta Pharmaceut. Sinica.* **16**:429-439.

Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA, 1993b. Citotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *J. Nat. Prod.* **56**:1468-1478.

Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA, 1993c. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J. Nat. Prod.* **56**:1331-1338.

Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Cordell GA, Pezzuto JM, 1993a. Citotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *J. Nat. Prod.* **56**:30-38.

Likhitwitayawuid K, Kaewamatawong R, Ruangrunsi N, Krungkrai J, 1998. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med.* **64**:237-341.

Likhitwitayawuid K, Dej-adisai S, Jongbunprasert V, Krungkrai J, 1999. Antimalarial from *Stephanie venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Med.* **65**:754-756.

Lin AJ, Klayman DL, Milhous WK, 1987. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. *J. Med. Chem.* **30**:2147-2150.

Lin AJ, Lee M, Klayman DL, 1989. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 2. Stereospecificity of the ether side chain. *J. Med. Chem.* **32**:1249-1252.

Lin AJ, Li L-Q, Klayman DL, George CF, Flippen-Anderson JL, 1990. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 3. Aromatic amine analogues. *J. Med. Chem.* **33**:2610-2614.

- Lin LZ, Shieh HL, Angerhofer CK, Pezzuto JM, Cordell GA, 1993. Citotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*. *J. Nat. Prod.* **56**:22-29.
- Looareesuwan S, Wilairatana P, Chocejindachai W, Chalermrut K, Wernsdorfer W, Gemperli B, Gathmann I, Royce C, 1999. A randomized, double-blind, comparative trial of a new oral combination of artemether and benflumetol (CGP 56697) with mefloquine in the treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **60**:238-243.
- Looareesuwan S, Wilairatana P, Molunto W, Chalermrut K, Olliaro P, Andrial M, 1997. A comparative clinical trial of sequential treatment of severe malaria with artesunate suppository followed by mefloquina in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**:348-353.
- Looareesuwan S, Wilairatana P, Vanijanonta S, Viravan C, Andrial M, 1995. Efficacy and tolerability of a sequential, artesunate suppository plus mefloquine of severe falciparum malaria. *Ann. Trop. Med. Par.* **89**:469-475.
- Looareesuwan S, Wilairatana P, Vanijanonta S, Pitisuttithum P, Viravan C, Kraissintu K, 1996. Treatment of acute, uncomplicated falciparum malaria with oral dihydroartemisinin. *Ann. Trop. Med. Par.* **90**:21-28.
- Mabertis S, 1960. Desarrollo de resistencia a la pirimetamina. Presentación de 15 casos estudiados en Trujillo, Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop.* **3**:239-259.
- Mapaba E, Hellgren U, Landberg-Lindgren A, Rombo L, 1995. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to quinine in vitro: effects of drug concentrations and time of exposure. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**:85-89.
- Marshall VMA, Silva A, Foley M, Cranmer S, Wang L, McColl DJ, Kemp DJ, Coppel RL, 1997. A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infect. Immun.* **65**:4460-4467.
- Marshall PB, 1945. Absorption of cinchona alkaloids in the chicks and its relation to antimalarial activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **85**:299-309.
- Martin GJ, 1995. Etnobotany. Ed. Chapman & Hall.
- Martin SK, Oduola AMJ, Milhous WK, 1987. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science.* **235**:899-901.
- Mason JA, 1950. The languages of South American Indians. In: J.H. Steward. Ed. Handbook of South American Indians **6**:157-318.
- Mazier D, Landau I, Druilhe P, Milgen F, Gughen-Guillouzo C, Baccam D, Baxter J, Chigot JP, Gentilini M, 1984. Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature.* **307**:367-369.

Mc Gready R, Cho T, Cho JJ, Simpson JA, Luxemburger C, Dubowitz L, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, 1998a. Artemisinin derivatives in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**:430-433.

McGready R, Cho T, Hkirijaroen L, Simpson J, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ, Nosten F, 1998b. Quinine and mefloquine in the treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy. *Ann. Trop. Med. Par.* **92**:643-653.

McIntosh HM, Olliaro P, 1998a. Artemisinin derivatives in the treatment of uncomplicated malaria. The Cochrane Library, London, BMJ Publishing.

McIntosh HM, Olliaro P, 1998b. Artemisinin derivatives in the treatment of severe malaria. The Cochrane Library, London, BMJ Publishing.

Merali S, Meshnick SR, 1991. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to artemisinin in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1225-1227.

Meshnick SR, Thomas A, Ranz A, Xu C-M, Pan H-Z, 1991. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemozoin in its mechanism of antimalarial action. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**:181-190.

Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, Kuypers F, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, 1993. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1108-1114.

Mietzsch F, Mauss H, 1930. Verfahren zur Darstellung N-substituierter 2-alkoxy-6-halogen-9-aminoacridine. German Patents. 1.6. Farben Ind. A. 6 553072 et 1934, 571449.

Miller KD, Greenberg AE, Campbell CC, 1989. Treatment of severe malaria in the United States with a continuous infusion of quinidine gluconate and exchange transfusion. *New Engl. J. Med.* **321**:65-70.

Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF, 1993. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**:1-14.

Ministerio de Salud y Previsión Social, Prefectura de Beni, Gobiernos Municipales, Fondo de Inversión Social, Unicef. 1999. Plan Estratégico de Vigilancia y Control de la Malaria en Beni y Pando. Proyecto de Capacitación, Vigilancia y Control de la Malaria en el Municipio de Guayaramerín. Período 1999 – 2000.

Ministerio de Salud y Previsión 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. Período 1998 – 2002.

Misra LN, 1986. Arteannuin C. a sesquiterpene lactone from *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* **25**:2892-2893.

Mollinedo PA, 1995. Estudio Fitoquímico Biodirigido de la Especie *Sparattanthelium amazonum* Martius (Hernandiaceae). Thèse de Licenciatura. 113pp.

Moore DV, Lanier JE, 1961. Observations of two *Plasmodium. falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **10**:105-109.

Moretti C, Deharo E, Sauvain M, Jardel C, Timon David P, Gasquet M, 1994. Antimalarial activity of cedronin. *J. Ethnopharmacol.* **43**:57-61.

Moretti C, Sauvain M, Lavaud C, Massiot G, Bravo J, Muñoz V, 1999. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. *J. Nat. Prod.* **61**:1390-1393.

Mpandi M, Makita C, Ndolo J, Mbemba LM, Loumouamou, Kibamba V, P'Pele P, 1998. Study of the efficacy and tolerance of Cotecxin® (Dihydroartemisinin) in the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Méd. Afr. Noire.* **45**:543-545.

Mukherjee T, 1991. Antimalarial herbal drugs. A review. *Fitoterapia.* **62**:197-204.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas I, Bravo JA, Balderrama L, Ortiz B, Gimenez A, Deharo E. 2000. The search of natural bioactive compounds in Bolivia, through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo indians. *J. Ethnopharmacol.* **69**:127-137.

Muñoz V, Sauvain M, Mollinedo P, Callapa J, Rojas I, Gimenez A, Valentin A, Mallié M, 1999. Antimalarial activity and cytotoxicity of (-) Roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Med.* **65**:1-2.

Muñoz V, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Deharo E, Fournet A, Weniger B, Duret P, Mallié M, 2000. Antiplasmodial activity and chloroquine potentiating action of same aporphinic alkaloids. In press.

Murphy GS, Basri H, Purnomo, Endersen EM, Bangs MJ, Mount DL, Gorden J, Lal AA, Purwokusumo AR, Harjosuwarno S, Sorensen K, Hoffman SL, 1993. Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet.* **341**:96-100.

Murphy S, English M, Waruiri C, Mwangi I, Amukoye E, Crawley J, Newton C, Winstanley P, Peshu N, Marsh K, 1996. An open randomised trial of artemether versus quinine in the treatment of cerebral malaria in African children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**:298-301.

Nair MSR, Basile DV, 1993. Bioconversion of arteannuin B to artemisinin. *J. Nat. Prod.* **56**:1559-1566.

Nkunya MHH, Weenen H, Bray DH, Mgani QA, Mwasumbi LB, 1991. Antimalarial activity of Tanzanian plants and their active constituents: The genus *Uvaria*. *Planta Med.* **57**:341-343.

Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, Ballou WR, Wittes J, Wah E, Chongsuphajaisiddhi T, Gordon DM, White NJ, Sadoff JC, Heppner DG, 1996. Randomized double-blind

placebo-controlled trial of Sp66 malaria vaccine in children in northwestern thailand. Shoklo Sp66 malaria vaccine trial group. *Lancet*. **348**:701-707.

Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto L, Tartar A, Druilhe P, 1994. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **89**:77-80.

O'Neill MJ, Boardman P, Chan KL, Phillipson JD, Warhurst DC, 1985. Antimalarial activity of *Brucea javanica* fruits. *J. Pharm. Pharmacol.* **37** (suppl): 49.

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Chan KL, Phillipson JD, 1987. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 4. Activity of *Brucea javanica* fruits against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro and against *Plasmodium berghei* in vivo. *J. Nat. Prod.* **50**:41-48.

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, Peters W, Suffness M, 1986. Plants as sources of antimalarial drugs : In vitro antimalarial activities of some quassinoides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:101-104.

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Wright CW, Phillipson JD, Warhurst DC, Gupta MP, Correya M, Solis P, 1988. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6 : Activities of *Simarouba amara* fruits. *J. Ethnopharmacol.* **22**:183-190.

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, 1985. Plants as sources of antimalarial drugs Part. 1. In vitro test method for the evaluation of crud extracts from plants. *Planta Med.* **5**:394-398.

Ohigashi H, Huffman MA, Izutsu D, Koshimizu K, Kawanaka M, Sugiyama H, Kirby GC, Warhurst DC, Allen D, Wright CW, Phillipson JD, Timmon-David P, Delnas F, Elias R, Balansard G, 1993. Toward the chemical ecology of medicinal plant-use in chimpanzees: the case of *Vernonia amygdalina*, a plant used by wild chimpanzee for parasite-related diseases. *J. Chem. Ecol.* **20**:541-553.

Ohnmacht CJ, Patel AR, Lutz RE, 1971. Antimalarials 7-bis (trifluoromethyl)(2-piperidyl)4-quinoline methanols. *J. Med. Chem.* **14**:926-928.

Oketch-Rabah HA, Brogger Christensen S, Frydenvang K, Dossaji SF, Theander TG, Cornett C, Watkins WM, Kharazmi A, Lemmich E, 1998. Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalyxolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Med.* **64**:559-562

Omalulokoli E, Khan B, Chhabra SC, 1997. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **56**:133-137.

Partridge SJ, Russell PF, Kirby GC, Bray DH, Warhurst DC, Phillipson JD, O'Neill MJ, Schiff PL, 1988. In vitro antimalarial activity of *Triclisia patens* and of its constituent alkaloids. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**:53.

Partridge SJ, Russell PF, Kirby GC, Warhurst DC, Phillipson JD, O'Neill MJ, Schiff PL, 1989. In vitro antimalarial activity of *Triclisia dictyophylla* and some of its constituent. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**:92.

Pasvol G, Wilson RJM, Smalley ME, Brown J, 1978. Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**:87-88.

Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Guzman F, Romero P, Tascon R, Franco A, Murillo LA, Ponton G, Trujillo G, 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* **332**:158-161.

Pelletier P, Caventou J, 1820. Recherche chimique sur les quinquinas. *Ann. Chim. Phys.* **15**:289-318 et 337-367.

Perez HA, De la Rosa M, Apitz R, 1994. In vivo activity of Ajoene against rodent malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:337-339.

Perrot E, Paris R, 1971. Les plantes médicinales. Ed. Presse universitaire de France.

Peters W, 1987. Chemotherapy and drug resistance in malaria. 2 Ed. 2vol. Ac. Press, Londres.

Peters W, 1990. The prevention of antimalarial drug resistance. *Pharmacol. Ther.* **47**:499-508.

Peters W, 1988. Chemotherapy of malaria. Ed. Ac. Press, New York.

Peters W, Li ZL, Robinson BL, Warhurst DC, 1986, The chemotherapy of rodent malaria. XL. The action of artemisinin and related sesquiterpenes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **80**:483-489.

Peters W, 1999. The chemotherapy of rodent malaria. LVI. Studies on the development of resistance to natural and synthetic endoperoxides. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **93**:325-339.

Phillips RE, Warrell DA, White NJ, Looareesuwan S, Karbwang J. 1985. Intravenous quinidine for the treatment of severe falciparum malaria. *New Engl. J. Med.* **312**:1273-1278.

Phillipson DJ, 1994. Natural products as drugs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**:17-19.

Phillipson JD, 1986a. The cas for "Plant Medicines". *Parasitol. Today.* **2**:327-328.

Phillipson JD, O'Neill MJ, 1986b. Novel antimalarial drugs from plants. *Parasitol. Today.* **2**:358.

Phillipson JD, Wright CW, Kirby GC, Warhurst DC, 1995. Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the treatment of protozoal diseases. *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. **37**:95-135.

PNUD/Banque Mondiale/OMS Programme Special pour la Recherche et Formation en Maladies Tropicales (TDR). The development of qinghaosu and its derivatives as antimalarial drugs. Fourth Meeting fo the Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria, October 6-10, 1981, Beijing, China. TDR/CHEMAL-SWG (4)/(QHS)/81.3, 1981, Genève.

Pousset JL, 1984. Elements de pharmacopée sénégalaise. *Méd. Afr. Noire*. **31**:7.

Pouvelle B, Spiegel R, Hsiao L, Howard RJ, Morris RL, Thomas AP, Tarasche TF, 1991. Direct access of serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature*. **353**:73-75.

Prelog V, Sewerth P, Hienbach-Juhasz S, Stern P, 1941. Synthetische Versuche in der Reine der China-Alkaloide.II Mitteil. Uber die Synthese der 6'-methoxy-cubanoles. *Chem. Ber.* **74**:647-652.

Prince RN, Nosten F, Luxemburger C, 1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*. **347**:1654-1658.

Prince RN, Nosten F, Luxemburger C, Van Vugt M, Phaipun L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ, 1997. Artesunate-mefloquine treatment of multi-drug resistant falciparum malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:574-577.

Prince RN, Luxemburger C, Van Vugt M, Nosten F, Kam A, Simpson J, Looareesuwan S, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ, 1998. Artesunate and mefloquine in the treatment of uncomplicated multidrug-resistant hyperparasitaemic falciparum malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**:207-211.

Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. 1979. Antimalarial studies on qinghaosu. *Chinese Med. J.* **92**:811-816.

Rabe P, 1908. Zur kenntniss der China alkaloide VIII-über die Konstitution das Chinchonins. *Chem. Ber.* **41**:62-70.

Rahman NN, Furuta T, Kojima S, Takene K, Ali Mohd M, 1999. Antimalarial activity of extracts fo Malaysian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **64**:249-254.

Ranasinghe A, Swatlock JD, Cooks RG, 1993. A rapid screening method for artemisinin and its congeners using ms/ms: search for new analogues in *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* **56**:552-563.

Randriamahary-Ramialiharisoa A, Ranaivoravo J, Ratsimamanga-Urverg S, Rasoanaivo P, Rakoto-Ratsimamanga A, 1994. Evaluation en clinique humaine de l'action potentialisatrice d'une infusion de *Strychnos myrtoides* vis-à-vis d'antipaludeens. *Rev. Méd. Pharm. Afr.* **8**:123-131.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Frappier F, 1996. Résultats récents sur la pharmacodynamie d'alcaloïdes de *Strychnos* malgaches. *Santé*. **6**:249-253.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Milijaona R, Rafatro H, Rakoto-Ratsimamanga A, Galeffi C, Nicoletti M, 1994. In vitro and in vivo chloroquine-potentiating action of *Strychnos myrtoïdes* alkaloids against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium malariae*. *Planta Med.* **60**:13-16.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Rafatro H, Ramanitrahasimbola D, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M, 1998. Alkaloids of *Hernandia voyronii*: chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of Herveline D. *Planta Med.* **64**:58-62.

Rasoanaivo R, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A, 1992. Quatre ans de recherche en chimiothérapie antipaludique. – Bilan et perspectives. *Med. Pharm. Afr.* **6**:95-101.

Ratsimamanga-Urverg S, Rasoanaivo P, Ramiaramanana L, Milijaona R, Rafatro H, Verdier F, Rakoto-Ratsimamanga A, Le Bras J, 1992. In vitro antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermun penduliflorum*. *Planta Med.* **58**:540-543.

Ratsimamanga-Urverg S, Rasoanaivo P, Milijaona R, Rakotoarimanga J, Rafatro H, Robijaona B, Rakotoratsimamanga A, 1994. In vitro antimalarial activity, chloroquine potentiating effect and cytotoxicity of alkaloids of *Hernandia voyronii* Jum. (Hernandiaceae). *Phytother. Res.* **8**:18-21.

Rea L, Gimenez A, Ruiz E, Angelo A, Muñoz V, Sauvain M, 1993. Alkaloids contents of plants from *Cinchonae* tribu collected in the oriental valleys of Bolivian Andes, poster présenté au symposium "Phytochemistry of Plants used in Traditionnal Medicine", Lausanne, Suisse, 29 septembre - 1 octobre.

Renan R, 1986. Identification of traditional Chinese materia medica. Shanghai Scientific and Technical Publishing House, Peoples's Republic of China. 109-113.

Ribera AM, 1992. Regiones Ecológicas. Conservación de la Diversidad Biológica de Bolivia. CDC-USAID. Bolivia. Ed. Marconi, La Paz.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC, 1989. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? *Lancet* **2**:1183-1184.

Roninson BL, 1992. The role of the *mdr1* (p-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **43**:95-102.

Roth RJ, Acton N, 1987. Isolation of epi-deoxyarteannuin B from *Artemisia annua*. *Planta Med.* **53**:576.

Rubstov MV, Volskova VA, 1953. Synthesis of [5-ethyl-2-quinuclidinyl](2-pyridyl) carbinol. *V. Ch. Obshch. Khim.* **23**:1688-1691 et 1893.

- Sanjib Mohanty Mishra SK, Satpathy SK, Sanghamitra Dash, Jayakrisna Patnaik, 1997. α -Artemether for the treatment of complicated falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:328-330.
- Sano M, Akyol CV, Tungtrongchitr M, Ito M, Ishih A, 1993. Studies on chemotherapy of parasitic helminths: efficacy of artemether on Japanese strain of *Schistosoma japonicum* in mice. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* **24**:53-56.
- Sauvain M, 1989. Etudes de plantes antiparasitaires du plateau des guyannes en amazonie: Antipaludiques et antileishmaniens. Thèse de doctorat. France.
- Sauvain M, 1997. Plantas antipalúdicas de América Latina. In: Tópicos en Productos Naturales: La Biodiversidad como fuentes de moléculas activas, Actas del V Congreso Colombiano de Fitoquímica. Ed. Echeverri F. y Quiñones F.D.
- Sauvain M, Moretti C, Bravo JA, Callapa J, Muñoz V, Ruiz E, Richard B, Le Men-Olivier L, 1996. Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus tubulosus*. *Phytother. Res.* **10**:198-201.
- Savioli L, De Felici A, Paglia MG, Visco G, 1985. Mixed malaria infection due to *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Br. Med. J.* **291**: 23-24.
- Schmid G, Hofheinz W, 1983. Total synthesis of qinghaosu. *J. Am. Chem. Soc.* **195**:624.
- Schneider J, 1951. Etude pharmacodynamique et thérapeutique des antipaludiques de synthèse. *Actual Pharmacol.* **3**:105-155.
- Seaton RA, Trevett AJ, Wembri JP, Nwokolo N, Naraqi S, Black J, Laurenson IF, Kevau I, Saweri A, Lalloo DG, Warrell DA, 1998. Randomized comparison of intramuscular artemether and intravenous quinine in adult, Melanesian patients with severe or complicated, *Plasmodium falciparum* malaria in Papua New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92** : 133-139.
- Sherman IW, 1968. Characterisation of the malarial pigment (hemozoin) from the avian malaria parasite, *Plasmodium lophurae*. *J. Protozool.* **15**:158-164.
- Sittie AA, Lemminch E, Olsen CE, Hviid L, Kharazmi A, Nkrumah FK, Brogger Christensen S, 1999. Structure-activity studies: In vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. *Planta. Med.* **65**:259-261.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:1107-1112.
- Skinner TS, Manning LS, Johnston WA, Davis TM, 1996. In vitro stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int. J. Parasitol.* **26**:519-525.
- Sowunmi A, Salako LA, Laoye OJ, Aderounmu AF. 1990. Combination of quinine, quinidine and cinchonine for the treatment of acute falciparum malaria : correlation with

the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to the cinchona alkaloids in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:626-629.

Spencer CF, Koniuszy FR, Rogers EF, Shavel J, Eanston NR, Kaczka A, Kuehl FA, Phillips RF, Walti A, Folkers K, 1947. Survey of plants for antimalarial activity. *J. Nat. Prot. (Lloydia)*. **10**:145-174.

Spencer HC, 1986. Epidemiology of Malaria. *Clin. Trop. Med. Comm. Dis.* **1**:1-28.

Steele JCP, Simmonds MSJ, Veitch NC, Warhurst DC, 1999. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Med.* **65**:413-416.

Su S, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE, 1997. Complex polymorphisms in an approximately kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*. **91**:593-603.

Sy LK, Brown GD, 1998. Three sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. **48**:1207-1211.

Tan RX, Zheng WF, Tang HQ, 1998. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* **64**:295-302.

Tawfik AF, Bishop SJ, Ayalp A, el Feraly FS, 1990. Effects of artemisinin, dihydroartemisinin and arteether on immune responses of normal mice. *Int.J. Immunopharmacol.* **12**:385-389.

Teja-Isavadharm P, Nosten F, Kyle DE, Luxemburger C, Ter Kuile F, Peggins JO, Brewer TG, White NJ, 1996. Comparative bioavailability of oral, rectal, and intramuscular artemether in healthy subjects: used of simultaneous measurement by high performance liquid chromatography and bioassay. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **42**:599-604.

Thompson PE, Werbel LM, 1972. Antimalarial agents: chemistry and pharmacology. Academic Press, New York.

Trager W, Polonsky J, 1981. Antimalarial activity of quassinoids against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**:531-537.

Trager W, Jensen J, 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. **193**:673-675.

Trigg PI, Kondrachine AV, 1998. The Current Global Malaria Situation. In: Malaria Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. Ed. Irwin W. Sherman. ASM Press, Washington DC. 11-22.

Trigg PI, 1998. La lutte antipaludique dans les années 90. *Bull WHO*. **76**. Number 1.

Turner RB, Woodward RB, 1953. The chemistry of the cinchona alkaloids. In: The Alkaloids, MANSKE R.H.F. HOLMES H.L. Ed. Academic Press. 1-63.

Udomsangpetch R, Pipitaporn B, Krishna S, Angus B, Pukrittayakamee S, Bates I, Suputtamongkol Y, Kyle DE, White NJ, 1996. Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* **173**:691-698.

Ulevelen A, Halfon B, 1976. Phytochemical investigation of the herb of *Artemisia annua*. *Planta Med.* **29**:258-260.

UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 1986. Report of a Meeting of the Scientific Working group on the Chemotherapy of Malaria. TDR/CHEMAL/ART/86.3.Genova, WHO/TDR.

Unzueta QO, 1975. Mapa Ecológico de Bolivia. Memoria explicativa. La Paz: Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios.

Valentin A, Benoit-Vical F, Moulis C, Stanislas E, Mallié M, Fouraste I, Bastide JM, 1997. In vitro antimalarial activity of Penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2305-2307.

van Hensbroek MB, Onyiorah E, Jaffar S, Schneider G, Palmer A, Frenkel J, Enwere G, Forck S, Nusmeijer A, Bennett S, Greenwood B, Kwiatkowski D, 1996. A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria. *N. Engl. J. Med.* **335**:69-75.

van Vianent PH, Klayman DL, Lin AJ, Lugt CB, Van Engen AL, Van Der Kaay HJ, Mons B, 1990. *Plasmodium berghei*: The antimalarial action of artemisinin and sodium arteminate in vivo and in vitro, studied by flow cytometry. *Exp. Parasitol.* **70**:115-123.

Vial H, Ancelin ML, 1994. Recherches de nouvelles molécules antipaludéennes : une urgence, un espoir. *Pathol. Biol.* **42**:138-144.

Vigneau C, 1985. Plantes médicinales. Ed. Masson, Paris.

Wang ZG, Liu GZ, 1985. Advances in natural products in China. *Trends Pharmacol. Sci.* **6**:423-426.

Warell DA, 1992. Cerebral Malaria. *Journal Suisse de Médecine.* **122**: 879-886.

Warhurst DC, 1986. Antimalarial schizontocides: why a permease is necessary? *Parasitol. Today.* **2**:331-333.

Weenen H, Nkunya MHH, Bray DH, Mwasumbi LB, Kinabo LS, Kilimali VAEB, 1990. Antimalarial activity of Tanzanian medicinal plants. *Planta Med.* **56**:368-370.

Wei ZX, Jian-Ping P, Li X, 1992. Artemisinin G: a sesquiterpene from *Artemisia annua*. *Planta Med.* **58**:300.

Wellem TE, Wootton JC, Fujioka H, Su K, Cooper R, Baruch D, Fidock DA, 1998. *P. falciparum* CG2, linked to chloroquine resistance, does not resemble Na⁺/H⁺ exchangers. *Cell.* **94**:285-286.

- Were O, Benn M, Munavu R, 1997. Chinchona alkaloid from *Dendrosenecio kilimanjari* subsp. *cottonii*. *Planta Med.* **63**: 90-92.
- Wernsdorfer WH, Kouznetsov RL, 1980. Paludisme pharmaco-résistant: Apparition, Lutte et Surveillance. *Bull. O.M.S.* **58**:341-352.
- WHO, 1988. Epidémiologie de la pharmacorésistance des plasmodies : Memorandum d'une réunion de l'OMS. **66**:303-325.
- Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF, 1993. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**:151-160.
- Win K, Than M, Thwe Y, 1992. Comparison of combinations of parenteral artemisinin derivatives plus oral mefloquine with intravenous quinine plus oral tetracycline for treating cerebral malaria. *Bull. WHO.* **70**:777-782.
- Wiselogle FY, 1946. A survey of antimalarial drugs, 1941-1945, Vol. 1 J.W. Edwards Publ. Ann. Arbor. Michigan.
- Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingre TM, Feraly FS, Kampinga HH, Konings AW, 1993. Cytotoxicity of artemisinin related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *J. Nat. Prod.* **56**:849-856.
- Wongsrichanalai C, Nguyen TD, Trieu NT, Wimonwattrawatee T, Sookto P, Heppner DG, Kawamoto F, 1997. In vitro susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates in Vietnam to artemisinin derivatives and other antimalarials. *Acta Trop.* **63**:151-158.
- Wright CW, Allen D, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, Massiot G, Le Men-Olivier L, 1993. *Alstonia* species: are they effective in malaria treatment? *J. Ethnopharmacol.* **40**:41-45.
- Xiao SH, Catto BA, 1989. In vitro and vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1557-1562.
- Xu XX, Zhu J, Huang DZ, Zhou WS, 1983. *Huaxue Xuebao* **41**: 574.
- Yang DM, Liew FY, 1993. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology.* **106**:7-11.
- Yang SL., Roberts MF, O'Neill MJ, Bucar F., Phillipson JD, 1995. Flavonoids and chromenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* **38**:255-257.
- Ye Z, Dyke KV, 1989a. Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**:242-248.
- Ye Z, Dyke KV, Castranova V, 1989b. The potentiating action of tetrandrine in combination with chloroquine or qinghaosu against chloroquine-sensitive and resistant *falciparum* malaria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **165**:758-765.

Ye Z, Dyke KV, Yang B, 1993. Interaction of berberine and chloroquine of artemisinin againsts chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Drug Development Research*. **30**:229-237.

Yound MD, More DV, 1971. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10:317-320.

Yu HW, Wright CW, Cai Y, Yang SL, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, 1994. Antiprotozoal activities of *Centipeda minima*. *Phytother. Res.* **8**:436-438.

Zhang F, Gosser DK Jr, Meshnick SR, 1992. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). *Biochem. Pharmacol.* **43**:1805-1809.

Zhao KC, Chen AM, Song ZY, 1986. Studies on the pharmacokinetics of qinghaosu and two of its active derivatives in dogs. *Acta Pharmaceut. Sinica.* **21**: 736-739.

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

Le Président de l'Université MONTPELLIER I

Alain UZIEL

Nom de l'auteur : Victoria MUÑOZ-ORTIZ

Année : 2000

Titre de la thèse :

Evaluation de l'activité antimalarique *in vitro* et *in vivo* de plantes et molécules antiparasitaires issues de la flore bolivienne.

L'étude conduite sur 156 espèces végétales utilisées par les Chacobo, ethnie amérindienne de Bolivie, pour soigner ou soulager divers symptômes ou maladies, a permis la sélection de 30 espèces afin d'en évaluer l'activité antimalarique *in vitro* contre 2 souches de *Plasmodium falciparum* sensible et résistante à la chloroquine et *in vivo* sur 2 espèces de *Plasmodium* de muridé (*P. vinckei* et *P. berghei*). Sur les 30 espèces végétales testées, 11 (36 %) ont montré une activité intéressante *in vivo* (84 % - 53 % d'inhibition entre 50 mg/kg et 250 mg/kg), et 21 % des extraits testés *in vitro* se sont révélés actifs (IC₅₀ entre 1.7 – 10 µg/ml).

Des études phytochimiques biodirigées ont été entreprises sur les plantes les plus actives. Parmi les plantes montrant une bonne activité antimalarique, nous avons choisi de procéder au fractionnement biodirigé de *Sparattanthelium amazonum*, liane médicinale de la famille des Hernandiaceae. Ceci nous a permis d'isoler un alcaloïde quaternaire aporphinique la (-)-roemréfidine qui présente une activité antimalarique aussi bien *in vitro* (contre des souches chloroquinosensibles et résistantes) qu'*in vivo* (sur *Plasmodium berghei*). Nous avons pu constater que ce composé agit sur la maturation du parasite et qu'il ne présente pas de toxicité sur les lignées cellulaires KB, Hep - 2 et HeLa.

Les résultats précédents ont motivé l'étude de l'activité antimalarique d'autres alcaloïdes de type aporphinique. Ainsi nous avons démontré l'activité intrinsèque de 12 alcaloïdes aporphiniques (glaucine, laurotétanine, isoboldine, actinodaphnine, cassythicine, nuciférine, pachyconfine, asimilobine, corydine, isocoritubérine) contre la souche D2 de *Plasmodium falciparum* et (N-méthyl olivérine, N-méthyl olivéridine), contre la souche FcM29, évalués à différents temps de contact avec le parasite. Nous avons pu mettre en évidence que ces alcaloïdes avaient un effet cumulatif. La glaucine a un fort effet cumulatif, elle pourrait donc agir au niveau de la réinvasion. Par la construction d'isobologrammes, nous avons constaté que la nuciférine, la pachyconfine et la cassythicine potentialisent l'action de la chloroquine contre la souche D2 de *P. falciparum* et réverse la résistance à la chloroquine. Les alcaloïdes à effet additif sont la glaucine, la laurotétanine et l'isocoritubérine. L'asimilobine, l'isoboldine, la corydine, l'actinodaphnine, la N-méthyl olivérine et la N-méthyl olivéridine antagonisent l'effet de la chloroquine.

L'ensemble de ces résultats montre que certaines des plantes utilisées par les populations amérindiennes de l'amazonie bolivienne peuvent être une source potentielle de nouvelles structures moléculaires antipaludiques.

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*, *vinckei*, *berghei*, activité antipaludique, Bolivie, alcaloïdes aporphiniques, potentialisation, *Sparattanthelium amazonum*, Chacobo.