

UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO
FACULTÉ DES SCIENCES d'Antananarivo
Département de Physiologie Animale et de Pharmacologie Laboratoire de Pharmacologie
Générale et de Pharmacocinétique
Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches en Sciences Naturelles
Option : Pharmacologie

RECHERCHE & DÉVELOPPEMENT D'UN MÉDICAMENT ANTIPALUDIQUE : LA MALAGASHANINE ISSUE DE *Strychnos* DE MADAGASCAR

Présenté et soutenu publiquement le 13 janvier 2007

Par

RAFATRO Herintsoa Docteur de Troisième Cycle

Rapporteurs : Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy Professeur
Suzanne RATSIMAMANGA-URVERG
Professeur Roger Karel VERBEECK

Examineur: Professeur Michel LESNE

Table des matières

REMERCIEMENTS .	1
FINTINA .	3
RÉSUMÉ .	5
ABSTRACT .	7
RÉSUMÉ .	9
CHAPITRE I : PARCOURS SCIENTIFIQUES . .	11
A. PREMIÈRE PARTIE : RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT . .	12
1. PHASE PRÉLIMINAIRE .	12
2. ÉTUDE PHARMACODYNAMIQUE . .	15
3. ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE ET DE BIOTRANSFORMATION . .	19
4. APPROCHE INTÉGRÉE . .	21
5. EXPLORATION DE LA FLORE DE MADAGASCAR ET D'AFRIQUE . .	22
6. BILAN DE LA RECHERCHE . .	25
B. DEUXIÈME PARTIE : FORMATION DE JEUNES RELÈVES .	25
1. LISTE DES ACTIVITÉS D'ENCADREMENTS SCIENTIFIQUES .	26
2. VALORISATION DES PLANTES MÉDICINALES . .	30
3. TRAVAUX D'EXPERTISES SCIENTIFIQUES .	37
4. TRAVAUX DE COLLABORATION .	37
5. BILAN DE LA FORMATION .	39
C. TROISIÈME PARTIE : ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES CORRÉLATIVES . .	39
CHAPITRE II : SYNTHÈSE D'ACTIVITÉS DE DÉVELOPPEMENT MÉDICAMENTEUX .	41
A. ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES . .	43
B. PALUDISME . .	44
C. PLANTES MÉDICINALES .	47
1. Choix de l'étude des plantes médicinales .	47
2. Compilation d'informations .	48

3. Exploration de la flore de Madagascar .	49
D. TESTS DE CHIMIOSENSIBILITÉ .	50
1. Méthodes . .	50
2. Détermination des effets inhibiteurs .	51
3. Chimiosensibilité des alcaloïdes de Strychnos myrtoïdes sur les isolats de Plasmodium falciparum (données non détaillées dans ce manuscrit) . .	52
4. Activité in vivo de la strychnobrasiline . .	53
5. Chronothérapie in vitro .	53
6. Chronothérapie in vivo . .	54
E. PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES . .	55
F. MÉTABOLISME DE LA MALAGASHANINE . .	58
G. MÉCANISME D'ACTION .	60
1. Relation structure chimique - activité antipaludique .	61
2. Relation paramètres pharmacocinétiques/propriétés pharmacodynamiques .	63
H. RÉSISTANCE MÉDICAMENTEUSE .	64
I. TENDANCE .	67
1. Approche actuelle .	67
2. Approche intégrée .	67
J. APERÇU ET PERSPECTIVES . .	68
CONCLUSION GÉNÉRALE .	69
BIBLIOGRAPHIE : . .	71
LISTE DE PUBLICATIONS . .	71
DOCUMENTATION .	74
RÉSUMÉ .	83

REMERCIEMENTS

Tout d'abord,

« **GRAND MERCI À ZANAHARY 'ZAY NANDAHATRA – CRÉATEUR QUI A ORDONNÉ** »

Ensuite, mes vifs remerciements et sincères reconnaissances s'adressent à l'endroit :

de Monsieur RANDRIANTSOA Adolphe, Professeur Titulaire en Pharmacodynamie, qui est un des mes formateurs dans cette spécialité, qui est toujours à notre écoute pour discuter ou donner des conseils et qui a bien voulu prendre la responsabilité de présider les membres du Jury lors de la soutenance de ce mémoire ;

de Monsieur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy, Professeur Titulaire en Pharmacocinétique, Responsable du Laboratoire de Pharmacologie Générale et de Pharmacocinétique – Faculté des Sciences et Secrétaire Général du Ministère de L'Éducation Nationale et des Recherches Scientifiques Malagasy, qui m'a accueilli dans son laboratoire il y a seize ans de cela, qui m'a initié, qui m'a permis de me lancer dans cette spécialité "**pharmacologie**", qui m'a aussi aidé à rédiger ce mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches et qui, malgré ses multiples occupations, a accepté d'être le Directeur de ce mémoire pour défendre les travaux décrits dans ce manuscrit ;

de Madame Suzanne RATSIMAMANGA-URVERG, Professeur Titulaire de Chaire de Biochimie – Faculté de Médecine et Présidente de la Fondation Albert Rakoto-Ratsimamanga, qui a bien voulu me recevoir parmi les membres de l'équipe scientifique de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées et plus qui m'a couvé comme son propre enfant, qui m'a beaucoup aidé et qui m'a tout le temps soutenu pour surmonter toutes les difficultés à franchir dans cette carrière de chercheur et qui, malgré ses multiples engagements, a aussi bien voulu être le rapporteur de ce mémoire ;

de Monsieur Roger Karel VERBEECK, Professeur Ordinaire de Pharmacocinétique qui a bien voulu accepter que je travaille dans son laboratoire pour apprendre la partie pratique de la pharmacocinétique, qui a aussi accepté d'expertiser les travaux réalisés dans ce manuscrit et qui a pu se dégager de son emploi du temps au sein de l'Université Catholique de Louvain – Faculté de Pharmacie – Unité Pharmacocinétique/Métabolisme/Nutrition/Toxicologie et venir spécialement à Madagascar pour défendre ce mémoire ;

de Monsieur Michel LESNE, Professeur Ordinaire honoraire à la Faculté de Médecine de l'Université Catholique de Louvain et Senior Scientific Advisor au Lilly Research Laboratories, qui m'a aidé à trouver une université partenaire pour réaliser une partie des travaux de cette recherche, qui m'a accueilli comme leur fils quand j'étais en Belgique, qui a aussi donné son avis d'expert et surtout de bien vouloir venir spécialement à Madagascar pour siéger parmi les membres du Jury en tant qu'examineur lors de la soutenance de ce mémoire ;

de l'UNICEF / UNDP / World Bank / WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) for the financial support to accomplish some tasks described in the present manuscript;

de tous mes collaborateurs qui ont permis à la réalisation de tous les travaux cités dans ce manuscrit

et à tous ceux qui d'ici ou d'ailleurs, de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre, d'un

moment à l'autre, m'ont éduqué, m'ont formé et m'ont aidé à réaliser mes études aboutissant à la présentation de ce mémoire.

Je dédie l'honneur de ce travail au nom **“RAFATRO”**

FINTINA

Ny tanjona lohalaharan'ny asakaroka dia roa sosona : eo aloha, amin'ny maha-mpikaroka ahy, dia ny fandraisana anajara teo amin'ny asa fihariam-pamokarana mialoha ny andrana aman'olona izay mety ho fanafody enti-miady amin'ny tazomoka amin'ny alalan'ny fanamarinana ny vaikany. Ary eo, amin'ny maha-mpanabe ny tena, ny voalohan'adidy dia ny fitarihan-dàlana ireo asam-pikarohana ataon'ireo tanoran'ny Anjerimanontolo manomana asakaroka ahazoana diplaoma famaranana dinganezaka ny taom-pianarana na ho dokotera amin'ny alalan'ny fanaporofaona ny herim-baikana'ny zavamaniry Malagasy fanao raokandro.

Ny zavamaniry fanao ody tazo dia nosivanina sy nanganina. Ireo raha mahery vaika ahafahana miady amin'ny otrikaretin'ny tazomoka ao amin'izy ireo dia trandrahana. Ny tondromarika ara-parmakôlôjia sy ny fiovanendry dia aseho amin'ny alalan'ny andrana aina volena sy aina velona. Asa maromaro teo anivon'ny laboratoara mba handrindrana ny fomba fanandramana ny vaikan'ny raha trandrahana avy amin'ny zavamaniry raokandro fanao fanafody enti-manaporofa ny heriny no notanterahina sy nofotorana, sady nitarika koa ny mpianatra ny Anjerimanontolo.

Malagashanine no voafidy teo anivon'ny maro ary nanaovana fandalinana lasa lavidavitra kokoa noho ny hafa. Izy dia alikalôida ao anatin'ny rafitra antsoina hoe Nb,C(21)-*sécocurane*. *Malagashanine*, izay tsy nampiseho vaika nanimba teo amin'ny biby mpikiky nanaovana fanandramana, dia tsy nampiseho ihany koa anefa hery mamono otrikaretin'ny tazo mivantana fa mampitombo kosa ny herimbaikan'ireo fanafody medikaly efa mahazatra enti-mitsabo ny tazomoka. Raha aiditra anaty vatana indray ny *malagashanine* dia mijanona ao fotoana vitsy ihany ary tafavadika ho raha ara-tsimika vaovao hafa karazany telo farafahakeliny alohan'ny ivoahan'izy ireo ivelan'ny vatana.

Raha teo amin'ny sehatra fitarihana ny zatovon'ny Anjerimanontolo dia iraika amby telopolo (31) ny tambatra ny asa tontosa : roapolo (20) nahavita ny dingan-taom-pianarana hatramin'ny farany ka ny iraika ambin'ny folo (11) amin'ireo no lasa dokotera. Andiany iraika ambin'ny folo (11) hafa kosa notsaraina ny asa tohana nataony ary ny iray tamin'ireo dia dokotera.

Ny vokatra azo nandritra izay fotoana izay dia narakitra tao anaty boky miisa fito amby roapolo izay izaho dia isan'ireo voalohany na mpanaraka ao amin'ny andiam-panoratra ny asa vita. Ireo ezaka rehetra ireo no tontosa dia vokatra ny fifanomezan-tànana sy ny asa vadin-drano nifandrimbonan'ny orinasa maro teto antoerana sy avy any ivelany, tsy latsadanja amin'izany anefa ny toeran'ny fiofanana narahiko sy ny fianarana notovoziko.

Tao anatin'ny enina ambin'ny folo taona teo amin'ny sehatra ny fikarohana fanafody enti-miady amin'ny tazomoka, dia afaka nanolotra ny kirakira mirakitra ny valin'asam-pikarohana ara-parmakôlôjia momba ny *malagashanine* ny tenako. Io raha io dia azo aroso ho ody mpiaraka amin'ireo fanafody efa fantatra fa miady amin'io aretina io raha tojo fanoherana avy amin'ny otrikaretina na ny tsy fahombiazana teo amin'ny fotoam-pitsaboana, mba ahafahana miroso lalindalina kokoa eo amin'ny sehatra ifotorana.

Mitohy ny fikarohana nataoko : efa manangasanga ny vokatra manaraka taorian'ny nahitana ny *malagashanine* ary andian-jatovo mihoatra ny efaolo no voaofana afaka hanohy ny asa natomboka.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de mes travaux scientifiques est double : tout d'abord, en tant que chercheur, mes activités consistent à contribuer au développement pré clinique d'un futur candidat de médicament antipaludique par la mise en évidence de ses propriétés pharmacologiques. Ensuite, en tant qu'enseignant, le rôle primordial est d'encadrer les travaux de laboratoire des jeunes étudiants d'Université préparant leurs mémoires de fin d'études ou leurs thèses de doctorat par la mise en évidence des effets pharmacologiques des extraits de plantes médicinales.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme ont été sélectionnées et collectées. Les molécules biologiques capables d'entraver le cycle de développement de l'agent causal de cette maladie ont été extraites puis isolées. Leurs paramètres pharmacologiques (pharmacodynamique et pharmacocinétique), ainsi que leur mode de biotransformation, ont été démontrés utilisant des modèles expérimentaux *in vitro*, *ex & in vivo*. Des travaux de laboratoire ont été aussi réalisés mettant en place des protocoles expérimentaux afin de valoriser quelques plantes médicinales Malagasy et encadrant ainsi des étudiants d'Universités.

La malagashanine a été choisie parmi les dizaines de molécules actives isolées et identifiées au laboratoire. Elle a fait l'objet d'une étude plus poussée. C'est un alcaloïde indolique qui a une structure chimique de type Nb,C(21)-sécocurane. La malagashanine, avec une toxicité faible chez les rongeurs, n'a pas d'activité antiplasmodiale directe bien prononcée ; par contre, elle potentialise principalement l'effet des antipaludéens conventionnels. Une fois administrée dans l'organisme, elle y séjourne pendant une courte période et se transforme au moins en trois types de dérivés.

A la suite de cette étude pharmacologique de malagashanine, d'autres espèces de plantes endémiques de Madagascar ont été explorées : trois molécules actives ont été isolées et leurs structures chimiques seront bientôt dévoilées.

Parallèlement à ces activités de développement médicamenteux, trente et un (31) travaux d'encadrement des étudiants ont été réalisés dont vingt (20) ont abouti à la présentation des mémoires de fin de premier et de second cycle de niveau universitaire, et onze (11) ont conduit à la soutenance des thèses de doctorat d'Université, médical et scientifique. Puis, j'ai été aussi appelé à siéger parmi les membres du Jury lors de la soutenance de onze (11) mémoires de fin d'études.

Les résultats de tous ces travaux ont fait l'objet de vingt sept publications scientifiques de niveau national et international dans lesquels j'ai été auteur ou co-auteur. Ces activités ont été réalisées grâce à la collaboration interinstitutionnelle et multipartite de niveaux national et international, mais aussi aux stages que j'ai effectués et aux formations que j'ai assistées.

En seize années de ma carrière dans la recherche de médicament antipaludique, j'ai pu mettre à la disposition des scientifiques quelques données pharmacologiques sur l'étude pré clinique de la malagashanine. Cette molécule pourrait être proposée, comme médicament adjuvant des antipaludéens conventionnels pour combattre la multi résistance médicamenteuse des souches plasmodiales en cas de paludisme à répétition ou à la suite d'un échec thérapeutique, et évaluée en phase plus avancée du développement médicamenteux.

Les études pharmacologiques d'autres molécules antiplasmodiales isolées après la découverte de la malagashanine ont été aussi entamées et une quarantaine de jeunes chercheurs a

été formée et qui pourraient prendre la relève dans le domaine de l'exploration des plantes médicinales Malagasy.

ABSTRACT

The principal objective of my scientific work is double: first of all, as a researcher, my activities consist in contributing to the pre clinical development of a future candidate of antimalarial drug by the description of its pharmacological properties. Then, as a teacher, the paramount role is to frame work of laboratory of the young students of University preparing their memories of end of studies or their doctorate theses by the description of the pharmacological effects of the extracts of medicinal plants.

Plants used in traditional medicine to treat malaria were selected and collected. The biological molecules able to block the cycle of development of the causal agent of this disease were extracted then isolated. Their pharmacological parameters (pharmacodynamic and pharmacokinetic), like their mode of biotransformation, were shown using *in vitro*, *ex & in vivo* experimental models. Works of laboratory were also realized setting up experimental protocols in order to develop some medicinal plants Malagasy and thus framing University students.

Malagashanine was selected among tens of active molecules isolated and identified at the laboratory. It was the subject of a more thorough study. It is an indole alkaloid which has a chemical structure of type Nb,C(21)-secocurane. Malagashanine, with a low toxicity in the rodents, does not have a quite marked direct antiplasmodial activity; on the other hand, it potentiates mainly the effect of the conventional drugs. Once managed in the organism, it there remains for a short period and changes with at least into three types of derivatives.

Following this pharmacological study of malagashanine, other species of endemic plants of Madagascar were explored: three active molecules were isolated and their chemical structures will be elucidated sooner.

Parallel to these activities of drug development, thirty and one (31) work of framing of the students were carried out of which twenties (20) led to the presentation of the memories of end of first and second cycle of university level, and eleven (11) led to the sustenance of University doctorate theses in medical and scientific areas. Then, I was also demanded to be sat among the members of the Jury at the time of the defence of eleven (11) memories of end of studies.

The results of all this work were the subject of twenty seven scientific publications of national and international level in which I was author or co-author. These activities were carried out thanks to inter-institutional and multi-party of national and international collaboration levels, but also with the training courses which I carried out and with the trainings that I assisted.

In sixteen years of my career in searching for antimalarial drug, I could place at the disposal of the scientists some pharmacological data on the pre clinical study of malagashanine. This molecule could be proposed, like adjuvant antimalarial of the conventional drugs to fight the multi drug resistance of the plasmodial strains in the event of repetitive malaria crises or following a therapeutic failure, and evaluated in more advanced phase of drug development.

Pharmacological studies of other antiplasmodial molecules isolated after the discovery of malagashanine were also engaged and more than forty young researchers were trained and could take the relief in the field of the exploration of Malagasy medicinal plants.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de mes travaux scientifiques est double : tout d'abord, en tant que chercheur, mes activités consistent à contribuer au développement pré clinique d'un futur candidat de médicament antipaludique par la mise en évidence de ses propriétés pharmacologiques. Ensuite, en tant qu'enseignant, le rôle primordial est d'encadrer les travaux de laboratoire des jeunes étudiants d'Université préparant leurs mémoires de fin d'études ou leurs thèses de doctorat par la mise en évidence des effets pharmacologiques des extraits de plantes médicinales.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme ont été sélectionnées et collectées. Les molécules biologiques capables d'entraver le cycle de développement de l'agent causal de cette maladie ont été extraites puis isolées. Leurs paramètres pharmacologiques (pharmacodynamique et pharmacocinétique), ainsi que leur mode de biotransformation, ont été démontrés utilisant des modèles expérimentaux *in vitro*, *ex & in vivo*. Des travaux de laboratoire ont été aussi réalisés mettant en place des protocoles expérimentaux afin de valoriser quelques plantes médicinales Malagasy et encadrant ainsi des étudiants d'Universités.

La malagashanine a été choisie parmi les dizaines de molécules actives isolées et identifiées au laboratoire. Elle a fait l'objet d'une étude plus poussée. C'est un alcaloïde indolique qui a une structure chimique de type Nb,C(21)-sécocurane. La malagashanine, avec une toxicité faible chez les rongeurs, n'a pas d'activité antiplasmodiale directe bien prononcée ; par contre, elle potentialise principalement l'effet des antipaludéens conventionnels. Une fois administrée dans l'organisme, elle y séjourne pendant une courte période et se transforme au moins en trois types de dérivées.

A la suite de cette étude pharmacologique de malagashanine, d'autres espèces de plantes endémiques de Madagascar ont été explorées : trois molécules actives ont été isolées et leurs structures chimiques seront bientôt dévoilées.

Parallèlement à ces activités de développement médicamenteux, trente et un (31) travaux d'encadrement des étudiants ont été réalisés dont vingt (20) ont abouti à la présentation des mémoires de fin de premier et de second cycle de niveau universitaire, et onze (11) ont conduit à la soutenance des thèses de doctorat d'Université, médical et scientifique. Puis, j'ai été aussi appelé à siéger parmi les membres du Jury lors de la soutenance de onze (11) mémoires de fin d'études.

Les résultats de tous ces travaux ont fait l'objet de vingt sept publications scientifiques de niveau national et international dans lesquels j'ai été auteur ou co-auteur. Ces activités ont été réalisées grâce à la collaboration interinstitutionnelle et multipartite de niveaux national et international, mais aussi aux stages que j'ai effectués et aux formations que j'ai assistées.

En seize années de ma carrière dans la recherche de médicament antipaludique, j'ai pu mettre à la disposition des scientifiques quelques données pharmacologiques sur l'étude pré clinique de la malagashanine. Cette molécule pourrait être proposée, comme médicament adjuvant des antipaludéens conventionnels pour combattre la multi résistance médicamenteuse des souches plasmodiales en cas de paludisme à répétition ou à la suite d'un échec thérapeutique, et évaluée en phase plus avancée du développement médicamenteux.

Les études pharmacologiques d'autres molécules antiplasmodiales isolées après la découverte de la malagashanine ont été aussi entamées et une quarantaine de jeunes chercheurs a

été formée et qui pourraient prendre la relève dans le domaine de l'exploration des plantes médicinales Malagasy.

Mots-clés: Paludisme, Malagashanine, Strychnos de Madagascar, Pharmacodynamie, Pharmacocinétique, In vivo

Encadreur: Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy

CHAPITRE I : PARCOURS SCIENTIFIQUES

Ce chapitre du manuscrit décrit, par ordre chronologique possible, les différentes étapes de mes activités scientifiques.

Ce document est divisé en trois parties :

La première partie traite deux sujets : tout d'abord, les différentes étapes franchies pour l'étude pharmacologique (pharmacodynamie, pharmacocinétique et métabolisme) des alcaloïdes de *Strychnos myrtoides*. Puis, la synthèse de mes activités réalisant un projet de recherche scientifique financé par l'Organisation Mondiale de la Santé. Ensuite, je termine cette partie par le bilan scientifique de mes activités ;

La deuxième partie énumère mes activités d'encadrement scientifique pour la formation de jeunes relèves et les travaux d'expertises scientifiques en tant que examinateur des mémoires. J'ai détaillé aussi les travaux que j'ai menés pour la valorisation de certaines plantes médicinales impliquées en phytothérapie. Je termine également cette partie par le bilan de l'activité de formation ;

La dernière partie mentionne les autres activités scientifiques qui m'ont permis d'assumer le rôle d'enseignant-chercheur.

A. PREMIÈRE PARTIE : RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT

Les éléments décrits dans cette partie du manuscrit sont le fruit des travaux scientifiques réalisés à la suite de mon intégration au sein d'une collaboration pluripartite formée à la base entre le Laboratoire de Pharmacologie Générale et de Pharmacocinétique (Département de Physiologie Animale et de Pharmacologie – Faculté des Sciences – Université d'Antananarivo – Madagascar) et le Laboratoire de Pharmacologie Parasitaire (Département de Recherche Scientifique – Institut Malgache de Recherches Appliquées – Fondation Albert Rakoto-Ratsimamanga – Antananarivo – Madagascar).

Ce programme a débuté en 1991 aboutissant à la création du Laboratoire de Phytochimie et de Pharmacologie Cellulaire et Parasitaire. L'objectif principal de la création de ce laboratoire est de réaliser des travaux scientifiques dans le but de contribuer à la lutte antipaludique à Madagascar par la recherche des médicaments issus particulièrement de la valorisation de la flore Malagasy en espérant de découvrir des molécules antipaludiques isolées des extraits préparés à partir de quelques plantes médicinales Malagasy et de démontrer leurs propriétés pharmacologiques.

A cette époque, cette institution a lancé un appel d'offre pour rechercher des étudiants de l'Université d'Antananarivo afin d'étoffer son équipe scientifique. Ainsi, j'ai pu bénéficier de la mise en place de ce programme de collaboration interinstitutionnelle. Et pour réaliser quelques travaux scientifiques spécialisés, cette collaboration nationale devenait par la suite internationale.

Le but principal de ce travail de collaboration est de développer des médicaments issus des plantes de Madagascar à valeur médicinale. En effet, dans la médecine traditionnelle, les plantes sélectionnées pour réaliser cette étude ont des vertus thérapeutiques et elles ont été utilisées comme remède pour traiter l'une des plus mortelles des maladies courantes à Madagascar. Et ma participation dans ces travaux d'équipe consiste à contribuer à la détermination des propriétés pharmacologiques de quelques extraits isolés des plantes antipaludiques.

1. PHASE PRÉLIMINAIRE

En 1991, quand j'ai débuté au sein de l'équipe scientifique de l'IMRA, nous les jeunes chercheurs avons hérité un programme de recherche qui a été déjà commencé par nos aînés du laboratoire.

Les infrastructures, les matériels, les équipements et les consommables nécessaires pour démontrer la chimiosensibilité des souches plasmodiales (le *Plasmodium falciparum* FcM29/C1 pour le modèle *in vitro* et le *Plasmodium yoelii* var. *nigeriensis* pour le modèle *in vivo*) vis-à-vis de l'extrait de plantes comparée à celle des produits de référence, telle que la chloroquine – quinine – méfloquine – halofantrine et artémisinine, ont été déjà

disponibles. Tout d'abord, je me suis investi dans l'installation et la mise en fonction du laboratoire. Ensuite, j'ai appris rapidement les différentes techniques avec les différents modèles d'expérimentations, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Et, quelques mois plus tard, nous avons mis en pratique ce qu'on a appris par la finalisation des tests de chimiosensibilité *in vitro* des deux molécules actives extraites chacune de deux plantes : le *Strychnopsis thoursii* (7-O-déméthyletetrandrine) et le *Spirospermum penduliflorum* (limacine), dont leur étude a été déjà entamée quelques années auparavant. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication, c'était l'article où j'ai été co-auteur pour la première fois de ma carrière scientifique (**Ratsimamanga et al., 1992**).

Ces résultats ont été aussi présentés à la séance scientifique lors de la tenue du 5ème atelier sur les produits naturels organisé par le NAPRECA Madagascar. Dans l'article, moi et mon collègue avons été remerciés d'avoir réalisé la partie technique des travaux (**Rasoanaivo et al., 1993**).

Ayant terminé cette partie d'étude sur ces deux plantes, on nous a tout de suite confié les tests de chimiosensibilité des extraits de deux autres plantes utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme. Les résultats obtenus ont été fait l'objet de deux articles scientifiques où dans chacun d'eux j'ai été mis comme co-auteur (**Rasoanaivo et al., 1994 ; Ratsimamanga et al., 1994a**). Les deux plantes en question sont le *Hernandia voyroni* et le *Strychnos myrtoides*. De cette dernière plante, les deux molécules actives ont été isolées et leurs structures chimiques ont été élucidées. Ce sont des alcaloïdes indoliques que nous avons nommées malagashanine et strychnobrasiline.

Jusque là, les tests de chimiosensibilité ont été réalisés dans le but de démontrer l'activité antipaludique des molécules actives. Ces tests ont été effectués aussi vis-à-vis d'autres souches de *Plasmodium falciparum*, sensibles (clones : 3D7, FcB1) et résistantes (W2) aux antipaludiques courants de référence, telle que la chloroquine en particulier. Les souches plasmodiales pour les rongeurs que nous utilisons au laboratoire sont le *Plasmodium berghei* (chloroquino-résistante), le *Plasmodium vinckei petteri* et le *Plasmodium chabaudi* (chloroquino-sensibles). C'est moi qui ai ramené toutes ces différentes souches de France à la suite de mon stage dans les laboratoires de parasitologie du Muséum National d'Histoire Naturelle et l'ex-Hôpital Bichat à Paris.

Ma carrière scientifique a vraiment démarré quand on m'a confié l'étude des trois molécules actives isolées de l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Hernandia voyroni*. Ces molécules appartiennent à la famille des bisbenzylisoquinoléines et nous les avons nommées : Hervéline A, B et C. Leurs chimiosensibilités ont été testées vis-à-vis des souches plasmodiales sur modèles *in vitro* et *in vivo* pour démontrer leur activité antipaludique et évaluer le niveau de leur toxicité. Ils ont été aussi publiés dans des journaux scientifiques et j'ai été co-auteur (**Ratsimamanga et al., 1994b**). Les données obtenues en étudiant les activités antipaludiques de ces cinq alcaloïdes ont fait l'objet d'une conférence lors du 7^{ème} atelier organisé par le NAPRECA en Tanzanie. Dans l'article j'ai été mis en deuxième auteur (**Rasoanaivo et al., 1997**).

Une autre molécule a été aussi isolée de *Hernandia voyroni*, elle a été nommée Hervéline D. Son activité antipaludique a été étudiée et comparée avec les autres alcaloïdes isolés auparavant de la même plante. Suite à ce travail, un article scientifique a été publié quelques années plus tard et j'ai été co-auteur (**Ratsimamanga et al., 1998**).

Les résultats obtenus à partir de ces trois molécules (les Hervéline A, B et C) de l'*Hernandia voyroni* ont été retenus comme sujet de ma thèse de Doctorat de Troisième Cycle. Dans ces travaux, j'ai mis en évidence la relation structure chimique de ces alcaloïdes en fonction de leurs activités biologiques. Comme la structure chimique de ces alcaloïdes ressemble beaucoup à celle de la vérapamil, leur mécanisme d'action a été élucidé et il semblerait que ce mode d'action passe et mettrait en œuvre les canaux calciques. Ainsi, craignant que les Hervélines auraient pu nous surprendre par leurs effets probables sur le système cardiovasculaire, leur étude a été suspendue et nous avons focalisé notre travail sur l'investigation des alcaloïdes isolés de *Strychnos myrtoïdes* qui sembleraient être plus prometteuse.

Parallèle à tous ces travaux réalisés, plus de sept cents extraits issus d'une centaine de plantes collectées dans différentes régions de Madagascar ont été aussi testés. Les résultats ont été publiés en deux temps, dans lesquels j'ai été co-auteur (**Rasoanaivo et al., 1999 & 2004**).

Notre objectif pour la réalisation de ce travail a été de rechercher de nouvelles molécules issues de la flore de Madagascar dont les plantes ont été collectées pour des raisons bien fixées d'avance : qu'elles soient tout d'abord endémiques mais aussi qu'elles ont été empiriquement utilisées pour tout au moins traiter le paludisme et ses symptômes caractéristiques.

En réalisant ce travail, nous avons constaté qu'en fixant d'avance un tel objectif, ceci restreindrait les axes de recherche de nouvelles molécules. Mais, nous étions parti d'une base et nous avons rectifié les démarches au fur et à mesure de l'avancement des travaux.

Ainsi, les renseignements que nous avons enregistrés à partir de la médecine traditionnelle indiquent que quelque fois chaque remède utilisé pour traiter une quelconque maladie est composé essentiellement d'un décocté préparé à partir de l'association d'une ou plusieurs plantes. Parfois même cette association se fait avec un ou deux comprimés de médicament conventionnel. Ce qui nous a amené à orienter notre recherche vers l'étude de la combinaison d'un extrait de plante avec un médicament antipaludique de référence, principalement la chloroquine, espérant ainsi de trouver une association bénéfique pour lutter contre la résistance médicamenteuse des souches plasmodiales.

Un autre problème que nous avons rencontré c'est qu'en médecine traditionnelle, on utilise surtout un décocté qui est une solution aqueuse obtenue à la suite de la macération dans de l'eau bouillante d'une partie de plante. Avec un tel procédé, nous avons juste une vague idée sur la structure chimique exacte des principes actifs d'un extrait de plante. Alors, pour les tests antipaludiques au laboratoire, évitant l'action de la chaleur qui pourrait abîmer la structure chimique des molécules actives thermolabiles, différents types de solvants organiques ont été utilisés pour extraire les molécules actives d'une plante étudiée. Les résultats obtenus montrent que dans la plupart des cas, les molécules actives sont plutôt solubles dans des solvants moyennement polaires tel que le chloroforme et l'acétate d'éthyle.

Cette observation a renforcé les critères de base de notre choix sur le *Strychnos*

myrtoïdes. C'est une plante endémique de Madagascar, son décocté est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement du paludisme et ceci en co-administration avec quelques comprimés de médicament antipaludique. Les molécules actives ont été extraites par le chloroforme. Les détails de ses études sont présentés dans les prochains paragraphes.

2. ÉTUDE PHARMACODYNAMIQUE

Les quelques années qui suivent la période de mon intégration au sein du Laboratoire de pharmacologie parasitaire de l'IMRA ont été marquées par la réalisation d'un programme pré établi dont la recherche a été antérieurement engagée bien longtemps d'avance. Mais à partir d'ici, on m'a nommé comme responsable de l'étude *in vivo*, d'un bout à l'autre, des molécules à activité antipaludique sortant du laboratoire de Phytochimie. Ceci concerne particulièrement les deux molécules majoritaires issues de l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes*.

Partant des informations recueillies lors des enquêtes ethnobotaniques, le choix de la plante à étudier a été basé sur le fait que le Retendrika a été utilisé en médecine traditionnelle pour le contrôle du paludisme. En plus, c'est aussi et surtout une plante endémique de Madagascar. Puis, des criblages pharmacologiques et du fractionnement bio guidé ont amené à l'identification de ses deux molécules actives : la malagashanine et la strychnobrasiline.

A la suite de cette première étape, des séries d'expérimentations ont été réalisées au laboratoire afin de démontrer l'activité antipaludique *in vitro* des alcaloïdes isolés de *Strychnos myrtoïdes*. De ma part, j'ai plutôt focalisé mes activités aux différentes expérimentations sur modèle animal vivant, ou étude *in vivo* dont les démarches sont données par la suite.

a Étude de l'activité antipaludique

Les informations fournies par les tradipraticiens indiquent que le décocté de l'écorce de tige de cette plante a été utilisé comme remède antipaludique. De ce fait, au laboratoire et avec des solvants organiques adéquats, un extrait total de cette partie de la plante a été préparé. Les résultats du fractionnement bioguidé associé au test phytochimique ont conduit vers une phase active constituée essentiellement des alcaloïdes. Les tests biologiques, qui ont conduit vers cette partie active, voire même les principes actifs de *Strychnos myrtoïdes*, ont été pratiquement réalisés à l'aide des expérimentations *in vitro* : *i.e.* par contact direct de l'extrait avec les parasites, le *Plasmodium falciparum*, cultivés au laboratoire dans des boîtes contenant du milieu synthétique et sous une atmosphère conditionnée. Ce test, dit de chimiosensibilité, consiste à évaluer la valeur de la concentration de l'extrait qui serait capable d'inhiber la croissance parasitaire par rapport à celle des témoins non traités.

Comme résultats de ces tests biologiques *in vitro*, la valeur des concentrations inhibitrices des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* est mille fois supérieure à celle des produits antipaludiques de référence, telle que la chloroquine. Donc, par rapport à ces

produits témoins positifs, l'activité antiplasmodiale de l'extrait alcaloïdique de *Strychnos myrtoïdes* est très faible. Il faut signaler que la strychnobrasiline et la malagashanine sont les composés qui se trouvent en quantité majoritaire dans cet extrait d'alcaloïdes totaux. Et même, testée seule (la strychnobrasiline ou la malagashanine), cet ordre de grandeur du rapport est retrouvé.

A la suite de cette étude *in vitro*, les expérimentations *in vivo* ont été réalisées. Elles consistent à déterminer la capacité de ces alcaloïdes à inhiber la croissance parasitaire dans le sang. Des souris Suisses albinos impaludées de *Plasmodium yoelii* var. *nigeriensis* ont été utilisées comme modèle expérimental. Pour ce faire, le test de suppression de parasitémie en quatre jours de Peters a été appliqué. Au premier jour, les animaux testés ont été impaludés avec un nombre de 10^7 parasites par animal. Ensuite, ils ont été traités : les produits à tester ont été administrés chez les souris qui ont été préalablement inoculées. Ces souris ont été ensuite traitées une fois par jour pendant quatre jours. A la fin du test, *i.e.* au cinquième jour, des frottis sanguins ont été réalisés pour chaque souris et la parasitémie a été déterminée. Les résultats obtenus ont été exprimés en taux ou en pourcentage de suppression de la parasitémie chez les souris impaludées et traitées en comparaison avec celle des souris impaludées du lot témoin mais non traitées.

Un test préliminaire a été effectué : une gamme de doses allant de 0 à 100 mg de la malagashanine ou de la strychnobrasiline par kilo de poids corporel de souris a été testée. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'y a pas de différence significative de suppression parasitaire par rapport au lot d'animaux témoins non traités. Cette constatation a été encore confirmée même en utilisant une dose de 500 mg/kg d'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes*.

Ayant observé que les éléments isolés de *Strychnos myrtoïdes* s'avèrent actifs en test *in vitro* mais ce n'est pas le cas lors des résultats des tests *in vivo*, même à une dose très élevée d'alcaloïdes, les chercheurs du laboratoire ont reconsidéré les renseignements collectés au cours des enquêtes ethnobotaniques. Une information essentielle et complémentaire a été fournie plus tard indiquant que l'efficacité en médecine traditionnelle lors du traitement du paludisme a été plutôt due à l'association d'un ou de deux comprimés de chloroquine avec la prise du décocté de l'écorce de tige de la plante. Le choix de cette association a été surtout opté dans le cas de crises de paludisme à répétition ou à la suite d'un échec thérapeutique par le traitement à la chloroquine seule.

De ce fait, l'objectif des tests a été modifié afin de déterminer si on bénéficierait d'une synergie d'action en combinant la chloroquine et l'extrait alcaloïdique de la plante. Effectivement, les résultats d'étude *in vitro* ont montré que l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes* renforce l'activité antiplasmodiale de la chloroquine. En effet, *in vitro*, la strychnobrasiline et la malagashanine potentialisent l'action de la chloroquine, en particulier vis-à-vis des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à ce médicament. Cet effet potentialisateur vis-à-vis de la chloroquine n'est pas très marqué lors des tests effectués sur des souches de *Plasmodium falciparum* dites sensibles à la chloroquine.

Sur un modèle *in vivo*, d'une part, la chloroquine seule inhibe de $15,0 \pm 2,0\%$ et de $80,0 \pm 8,0\%$ la croissance parasitaire aux doses respectives de chloroquine de 0,75 et de

1,5 mg/kg. D'autre part, les alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes*, la strychnobrasiline ou la malagashanine administrée seule à 10 mg/kg, suppriment respectivement la parasitémie de $8,0 \pm 0,7\%$ et de $14,8 \pm 1,2\%$. Mais en co-administrant la chloroquine (0,75 mg/kg) et la malagashanine (10 mg/kg), le pourcentage d'inhibition de la parasitémie est à plus de 50% au lieu de 29,8% (c'est la somme des valeurs individuelles des pourcentages d'inhibition obtenus après le traitement de la chloroquine seule et de la malagashanine seule). Cet effet potentialisateur est aussi plus marqué vis-à-vis d'une souche parasitaire résistante à la chloroquine que sur celle chloroquino-sensible. Par contre, aucune augmentation d'effet n'est observée en associant la chloroquine avec la strychnobrasiline à la dose de 10 mg/kg, ni à une dose plus élevée de 50 mg/kg, ni avec les dérivés qui ont été élaborés et synthétiques par les chimistes du laboratoire en collaboration avec les chercheurs partenaires étrangers de l'IMRA (Trigalo et al., 1999), j'étais aussi co-auteur.

En effet, sur un modèle animal *in vivo*, à elle seule, la strychnobrasiline ou la malagashanine présente un effet antiplasmodial très faible. Mais en plus, la malagashanine renforce l'action de la chloroquine, et ceci dans le cas où la souche plasmodiale est résistante à ce médicament. Par contre, ce n'est pas le cas pour la strychnobrasiline : elle est dépourvue d'effet potentialisateur de la chloroquine, aussi bien vis-à-vis d'une souche résistante que sensible. Tous ces résultats ont été publiés et j'étais premier auteur (Rafatro et al., 2000a) pour la toute première fois.

b Étude de la chronothérapie

Puisque l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes* est dépourvu d'activité antiplasmodiale directe, il est difficile de démontrer leur mécanisme d'action intrinsèque une fois administré seul. Ainsi, lors de la réalisation de cette partie d'étude, cet extrait a été co-administré avec la chloroquine.

C'est la raison pour laquelle, pour mettre en évidence l'effet potentialisateur de ces alcaloïdes, une étude de chronothérapie a été effectuée afin d'identifier le moment exact de l'action potentialisatrice si celle-ci coïnciderait avec la période d'activité optimale de la chloroquine. Pour ce faire, un modèle expérimental répondant à cette exigence a été utilisé : une souche plasmodiale a été choisie, dont l'évolution d'une forme parasitaire à l'autre au cours d'un cycle biologique de développement complet est marquée par l'apparition parfaitement synchrone d'une forme à l'autre et du début jusqu'à la fin du cycle biologique.

Le *Plasmodium vinckei petteri*, une souche plasmodiale pour les rongeurs, a été utilisé : c'est un parasite à croissance presque synchrone du moment que la valeur de la parasitémie soit inférieure à 1%. Le début d'un cycle correspond à l'heure de l'impaludation (Ho) des souris et la fin du premier cycle est caractérisée par la période de l'éclatement des hématies ou la schizogonie qui coïncide à l'heure de l'inoculation, le lendemain, et ainsi de suite. Un cycle biologique dure 24 heures et ceci peut être divisé en plusieurs phases selon l'apparition d'une forme parasitaire en proportion majoritaire et prédominante : à savoir, les stades avec l'apparition de l'aspect en anneau (R à Ho+3), en trophozoïtes [jeunes (YT à Ho+6) – moyens (MT à Ho+12) – âgés (OT à Ho+18)] et la forme schizonte (S).

Ainsi, la chronothérapie consiste à traiter les souris impaludées au début du cycle biologique et à chaque début d'un stade de développement. Ensuite, l'observation de la cinétique du taux de la parasitémie et de l'évolution de la forme parasitaire dure 24 heures, à partir de l'heure du traitement.

Les résultats obtenus montrent que la période d'activité optimale pour la chloroquine (par voie sous cutanée à 2,5 mg/kg) se situe entre le passage des formes parasitaires prédominantes des trophozoïtes moyens vers les trophozoïtes âgés. A cette dose utilisée, une baisse du taux de parasitémie chez les souris traitées est observée au fur et à mesure du temps qu'on avance dans le cycle de développement du parasite. Mais à la fin d'une durée de 24 heures de traitement, une reprise de la parasitémie est observée.

Par contre, le traitement avec l'alcaloïde de *Strychnos myrtoïdes* seul par voie orale à 100 mg/kg ne présente aucune activité antiplasmodiale. L'allure de la cinétique du taux de la parasitémie, à la suite de l'heure du traitement et au cours du premier cycle biologique, ressemble exactement à celle observée chez les souris du lot contrôle non traitées.

Mais, la co-administration de la chloroquine (par voie sous cutanée à 2,5 mg/kg) avec l'extrait de *Strychnos myrtoïdes* (par voie orale à 100 mg/kg) améliore l'activité antipaludique de la chloroquine : le pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire est significativement plus élevé par rapport à celui obtenu à la suite du traitement à la chloroquine seule. Cette action est maximale quand le traitement a été fait au début du stade des trophozoïtes moyens. A la fin du premier cycle de 24 heures de ce traitement, une suppression totale de la parasitémie est observée. Ce qui n'était pas le cas lors du traitement à la chloroquine seule. Le fait marquant observé à la suite de cette étude de chronothérapie est la rémanence de cette activité antipaludique exprimée par l'annulation de toutes les formes parasitaires dans le sang des souris traitées à la combinaison chloroquine plus extrait au moment de la phase prédominante de la forme trophozoïte moyen. Celle-ci persistait jusqu'à 72 heures, voire même 96 heures, après le traitement.

Toutes ces données font partie des résultats présentés lors de ma conférence à l'Académie Nationale Malagasy (**Rafatro et al., 2006b**).

c Évaluation de la toxicité

Sachant que la structure chimique des éléments actifs du *Strychnos myrtoïdes* appartient à la famille des alcaloïdes, une étude s'impose pour évaluer la toxicité, du moins aiguë, de ces molécules à la suite de leur administration au sein de l'organisme.

L'évaluation de la toxicité consiste à administrer une gamme de doses croissantes d'alcaloïde ; puis, la réaction des animaux traités (souris et rats) a été observée et notée. La dose mortelle a été aussi enregistrée.

Les résultats obtenus au laboratoire montrent que :

Pour une injection intraveineuse rapide (IVR) de malagashanine, qui a duré approximativement 15 s, la dose maximale tolérée est de 8 mg/kg. Sous cette même condition d'injection, à 10 mg/kg une crise convulsive est observée ; par contre, la dose de 20 mg/kg est subitement mortelle à tous les coups. Les résultats obtenus à partir des études antérieures démontraient que la dose létale aux 50% des rats testés (DL₅₀) pour

la malagashanine est de 60 mg/kg par voie intrapéritonéale et la dose maximale tolérée (DMT) est de 400 mg/kg après administration par voie orale. Ces données ont constitué le point de départ pour évaluer la dose utilisée lors des études des paramètres pharmacocinétiques.

L'administration de la strychnobrasiline jusqu'à la dose de 10 mg/kg par voie IVR ne donne aucun effet secondaire ni de toxicité aiguë apparente chez les rats. La dose maximale tolérée pour la strychnobrasiline est de 200 mg/kg(*per os*). De ce fait, la strychnobrasiline est deux fois plus toxique que la malagashanine.

Ces résultats sont décrits dans l'article publié à l'Académie Nationale Malagasy (**Rafatro et al., 2006b**).

3. ÉTUDE PHARMACOCINÉTIQUE ET DE BIOTRANSFORMATION

Les résultats obtenus à la suite de l'étude pharmacodynamique des alcaloïdes de *Strychnos myrtoides* ont soulevé beaucoup de questions venant des chercheurs du laboratoire. Par exemple : pourquoi la malagashanine a été la seule molécule active sur modèle animal vivant, pourquoi ce n'est pas le cas pour la strychnobrasiline ? C'est la raison pour laquelle l'étude pharmacocinétique a été abordée afin de déterminer le devenir de la malagashanine une fois qu'elle soit administrée à l'intérieur de l'organisme. L'étude préliminaire de détermination des paramètres pharmacocinétiques de la strychnobrasiline a été réalisée si jamais des réponses pouvaient être attendues afin d'expliquer le mécanisme d'action de la malagashanine.

A l'époque, la réalisation d'une telle étude n'était pas encore possible dans notre laboratoire. Alors, à l'aide des contacts arrangés par les Directeurs de mon mémoire, j'ai préparé un dossier répondant à l'appel à la candidature proposé par l'Agence Universitaire de la Francophonie pour l'octroi d'une bourse d'excellence, année scolaire 1998 - 1999.

C'était un projet d'étude post-doctorale afin de rapprocher deux Universités, une du Nord et l'autre du Sud. Le dossier a été présenté sous forme de demande de bourse de mobilité, pour quelques mois, d'un étudiant du Sud vers une Université du Nord. Les deux Universités travaillent ensemble sur un sujet de recherche. Ainsi, elles donnent en même temps une formation à l'étudiant maintenu afin qu'il puisse transférer les techniques apprises dans son pays d'origine.

Mon dossier a été retenu et je suis parti pour une année à Bruxelles, à l'Université Catholique de Louvain de Belgique, plus précisément au sein de l'Unité de PMNT de l'École de Pharmacie.

Partant de mon pays, j'étais venu à Bruxelles avec une certaine quantité de malagashanine et de strychnobrasiline, et un programme pour déterminer leurs paramètres pharmacocinétiques, les métabolites de ces alcaloïdes et le mode de leur biotransformation.

Plusieurs publications ont été issues de cette collaboration, elles sont citées dans les paragraphes qui suivent.

a Mise au point des méthodes analytiques

Avant d'entamer l'étude proprement dite des paramètres pharmacocinétiques, les méthodes d'analyses chimiques des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* ont été d'abord mises au point. La technique appliquant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été développée.

Ainsi, les paramètres de validation et les conditions chromatographiques pour l'analyse CLHP des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* ont été déterminés.

La validation de cette méthode d'analyse par CLHP a été publiée (**Rafatro et al., 2000b**).

b Détermination des paramètres pharmacocinétiques

Au cours de cette partie d'étude, les méthodes d'analyses par CLHP ont été appliquées pour quantifier en fonction du temps les alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* qui sont parvenus dans les différents fluides biologiques (plasma et urine) à la suite de leur administration chez les rats par différentes voies. Cette étude a surtout porté sur la détermination du devenir de la malagashanine.

Cette partie de résultats a été soumise pour publication puis présentée dans ma conférence lors du 9^{ème} atelier de NAPRECA qui avait lieu au Kenya (**Rafatro et al., 2001a**).

Observant tous les paramètres obtenus dans cette partie d'étude, le profil pharmacocinétique de la malagashanine peut être assimilé au modèle ouvert à un compartiment, ajustement par le programme WinNonlin 1.5 (1997). Mais d'une manière générale, en comparant les paramètres obtenus après injection intraveineuse (IV) et administration extravasculaire (EV), quelques remarques sont à souligner :

les valeurs moyennes de CL et de V_d obtenues suite à une IVR et une perfusion IVL ne sont pas significativement différentes. Les demi-vies d'élimination plasmatique de la malagashanine sont significativement plus longues après une administration IP et PO comparées aux différentes administrations IV ;

les biodisponibilités absolues suite à des administrations IP et PO, estimées par division de la moyenne de AUC après administration IP ou PO par la moyenne de AUC suite à une injection IVR et en tenant compte de la différence des doses administrées, sont respectivement de 1,03 et de 0,62 ;

le taux d'excrétion par voie urinaire de la forme inchangée de malagashanine est très faible et est seulement aux alentours de 2%, même moins, de la dose administrée.

c Étude de certains facteurs influençant la pharmacocinétique

La dernière remarque citée dans le paragraphe précédent stipule un faible taux d'élimination de la forme inchangée de la malagashanine par voie urinaire. Ceci indiquerait que l'excrétion de la malagashanine pourrait être par voie extra rénale, *i.e.* soit elle serait fixée ou séquestrée quelque part dans l'organisme, soit elle serait éliminée par

voie biliaire et/ou métabolique. C'est la raison pour laquelle l'influence de quelques facteurs qui pourraient influencer le profil et les paramètres pharmacocinétiques de la malagashanine a été étudiée, à savoir : le taux de fixation *in vitro* de la malagashanine aux protéines plasmatiques, la possibilité de l'accumulation de la malagashanine dans le milieu intra érythrocytaire et l'influence du cycle entérohépatique sur les paramètres pharmacocinétiques de la malagashanine a été étudiée. Les données observées font partie des résultats publiés à l'Académie Nationale Malagasy (**Rafatro et al., 2006**).

d Identification des métabolites

Lors de l'étude de la détermination des paramètres pharmacocinétiques, en analysant les échantillons de plasma ou de l'urine, un énorme pic inconnu marquant la sortie d'un autre produit dans le chromatogramme apparaissait avant celle de la malagashanine. Il a été remarqué aussi que plus on collecte les échantillons de fluides biologiques plus tard après le traitement des rats à la malagashanine, plus la surface du pic de ce dérivé observée sur le chromatogramme augmente de valeur tandis que celle de la malagashanine diminue au fur et à mesure. Ainsi, nous avons pensé que c'était le métabolite principal et majoritaire de la malagashanine.

Ainsi, ces produits ont été isolés et l'élucidation de leurs structures chimiques a permis d'identifier les formes N-déméthylée, hydroxylée et dimère de la malagashanine. Ces résultats ont fait l'objet d'un article de publication (**Rafatro et al., 2000c**).

e Identification de l'enzyme responsable de la biotransformation

Sachant qu'à la suite de l'administration de la malagashanine chez les rats, elle a été transformée en plusieurs types de dérivés. Ainsi, il est intéressant de savoir quel(s) serait(aient) le(s) enzyme(s) responsable(s) de cette biotransformation ? La publication associée aux résultats de cette étude est l'article que j'ai publié à l'AcNALS (**Rafatro et al., 2006b**).

4. APPROCHE INTÉGRÉE

Quand nous avons accumulé plusieurs années de travail dans le domaine de développement de médicaments antipaludiques, nous avons constaté que quelquefois, nous nous sommes confrontés à une certaine incohérence entre les renseignements fournis par la médecine empirique et les résultats des tests biologiques / pharmacologiques pré cliniques.

Par conséquent, les années d'expériences accumulées au fil des temps dans la recherche et la découverte des molécules antiplasmodiales d'origine végétale nous ont permis de tirer des leçons de la vie scientifique. Ces leçons nous ont conduit à l'élaboration d'une approche scientifique pour la recherche et le développement des médicaments antipaludiques.

Cette approche est basée surtout sur la cible des molécules actives et leur aboutissement dans ces différentes étapes de développement médicamenteux, soit :

- Elles agissent directement sur l'agent du paludisme :

En affectant le mécanisme spécifique et d'une manière sélective, ce sera donc une molécule antiplasmodiale ;

En agissant d'une manière non sélective sur les structures similaires à toutes les cellules biologiques, ce sera bon pour un anticancéreux ;

- Elles interviennent sur le mécanisme de réponse de l'hôte (défense de l'organisme humain contre l'invasion microbienne), conséquent à l'infection du parasite du paludisme ; une telle découverte pourrait ouvrir des portes vers de nouvelles débouchées.

Ainsi, au laboratoire, à la suite de la mise en place de cette approche, tout programme souhaitant découvrir un médicament antipaludique passe systématiquement par un criblage pharmacologique étudiant au moins l'activité antiplasmodiale et/ou cytotoxique.

Les démarches suivies pour retenir de telle approche ont fait l'objet de quelques articles que nous avons publiés dans des journaux internationaux, dans lesquels j'ai été mis co-auteur (**Rasoanaivo et al., 2001b-c** ; **Ramanitrahasimbola et al., 2004**). Mais le premier article que nous avons produit pour publier cette approche a fait l'objet d'une communication que j'ai présentée à Lille – France lors de la 3^{ème} réunion biennale de parasitologie (**Rafatro et al., 2001a**), puis le contenu du papier a été traduit en anglais et a été présenté lors d'un colloque sur le VIH/SIDA et le paludisme qui avait lieu à Abuja, Nigeria (**Rafatro et al., 2000d**).

5. EXPLORATION DE LA FLORE DE MADAGASCAR ET D'AFRIQUE

Toutes les expériences acquises jusqu'ici ont été mises pour réaliser le programme développé dans ce thème du manuscrit. En faite, le mois de juillet 2002, à la suite de la diffusion d'un appel d'offre sur Internet proposée par l'Organisation Mondiale de Santé – Genève – Suisse, j'ai pris l'initiative de présenter et de soumettre une proposition de recherche scientifique.

Le mois d'avril 2003, en moins d'un an plus tard, le projet a été accepté pour être financé par le programme spécial du WHO/RCS/TDR et porte le n°A20769.

Quand ma proposition a été acceptée, en mois de juin 2003 (Dar es Salaam, Tanzanie) et en mois d'août 2005 (Nairobi, Kenya), j'ai été invité en tant qu'investigateur principal de ce projet pour assister respectivement à une formation et à un atelier organisés par l'OMS sur les thèmes intitulés : "*Project Planning and Evaluation in Biomedical Research*" et "*Pre clinical safety testing on traditional medicines*". Le mois d'avril 2003, j'ai suivi une formation à l'Université de Marseille (France) qui m'a valu le « Diplôme Universitaire de Lutte Antipaludique ». Ces stages sont essentiels pour moi et m'ont beaucoup aidé à la réalisation de ce projet.

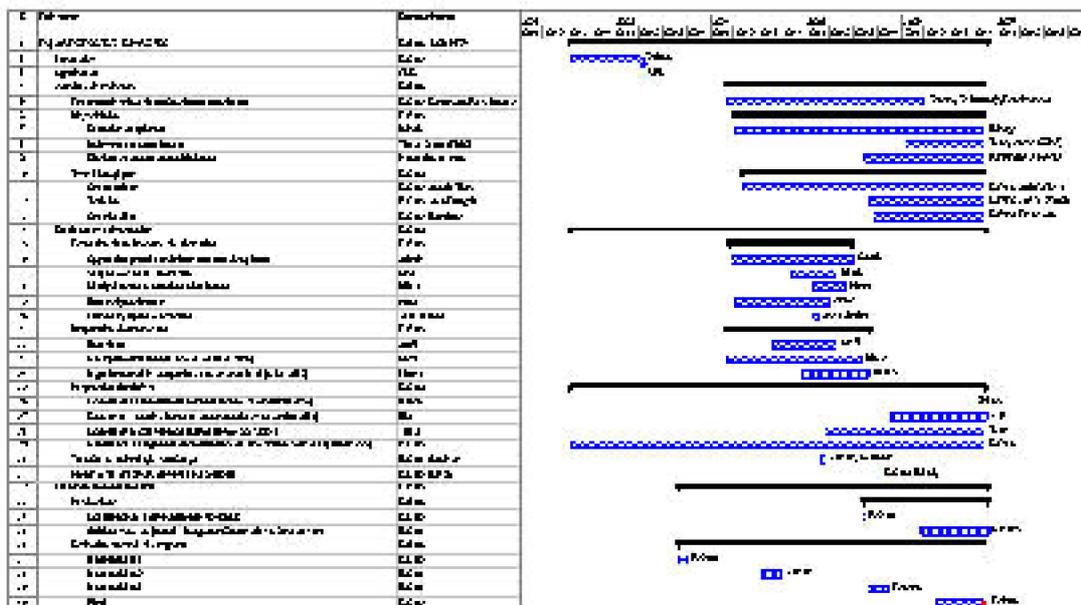
Le but principal du projet est de contribuer à la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques en prenant l'avantage de la ressource issue de la médecine traditionnelle. Ainsi, avant la fin du projet en décembre 2006, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Déterminer l'activité antiplasmodiale des extraits de plantes utilisant la technique de semi micro test radioactif sur une culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* et le test de suppression de parasitémie en quatre jours sur le *Plasmodium yoelii* chez les souris ;
- Évaluer le niveau de toxicité des extraits de plantes actives ;
- Isoler et élucider la structure chimique des molécules actives ;
- Développer la ressource humaine renforçant la capacité collaborative pour la lutte antipaludique.

En trois ans d'activités, le coût total du financement reçu par le laboratoire que j'ai géré a été de 100'000 US\$ de la part de l'OMS et la participation de l'IMRA a été estimée à 10'000 USD. Le diagramme ci-après synthétise la réalisation de ce projet.

Diagramme de réalisation du projet de recherche scientifique financé par l'Organisation Mondiale de la Santé (Avril 2003 – Novembre 2006)

dont j'étais l'Investigateur Principal : Étude *in vitro* et *in vivo* (souris) d'activité antiplasmodiale des extraits de plantes antipaludiques de Madagascar et d'Afrique



Le programme WHO/RCS/TDR consiste à renforcer la capacité d'une institution pour accomplir un plan d'action de lutte contre une maladie tropicale, dans notre cas : le développement de médicament pour lutter contre le paludisme. L'organisation a porté aide pour subvenir au manquement en matériels et équipements, approvisionner les besoins en consommables et combler les lacunes en budget de fonctionnement du laboratoire.

Les activités de recherche réalisées pour ce projet portent sur les rubriques suivantes :

- Botanique :
 - Expéditions forestières (huit missions) : pour la collecte des plantes choisies à la suite

des enquêtes ethnobotaniques, au cours desquelles j'ai été huit fois chef de mission d'une équipe pluridisciplinaire composée de botaniste, médecin, biologiste, chimiste, stagiaire, tradipraticiens (guérisseurs, connaisseurs des plantes et leurs utilisations, « *zokiolona* » ou personnes âgées, habitués des forêts), chauffeur et aide-jardinier. Enquête ethnobotanique, collecte et conservation de plante patrimoine sous forme d'herbiers (physique et électronique) ;

Préparation des plantes : à la suite d'une mission d'expédition, une fois arrivé au laboratoire, j'ai mis en place une équipe qui va s'organiser pour l'identification botanique des espèces de plantes prises, le séchage, le broyage et la conservation des poudres de plantes séchées et broyées ;

- Phytochimie : j'ai composé une équipe de chimistes expérimentés et amateurs pour faire la macération des parties de plantes collectées, l'extraction, le partage liquide-liquide, le fractionnement et l'isolement par chromatographies sur colonne combinée à la méthode de celle sur couche mince. J'ai fait moi-même les analyses par CLHP ;

- Biologie : j'ai dirigé une équipe de biologistes pour déterminer les paramètres pharmacologiques (CI_{50} , DE_{50} , DL_{50}) des extraits de plantes étudiées ;

- Renforcement de capacité :

J'ai monté et formé le personnel pour faire le travail dont les membres sont surtout constitués des étudiants sortant des Universités de Madagascar. Et pendant leur passage au laboratoire pour réaliser le programme du projet, ils ont profité pour achever la partie travaux pratiques pour la préparation de leurs mémoires de fin de cycle ou de leurs thèses de doctorat.

Nous avons reçu aussi la visite d'un Chercheur venant de l'École de Pharmacie de l'Université de la République Démocratique de Congo. Il était venu pour apprendre la technique des tests antipaludiques (*in vitro* et *in vivo*). Je lui ai appris ces deux méthodes et il a profité de son passage au laboratoire pour tester 54 extraits issus de 26 plantes collectées et utilisées en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme dans son pays.

Les quelques résultats pertinents issus directement de la réalisation de ce projet sont :

- La création du Laboratoire de Criblage Pharmacologique au sein de l'IMRA, approuvé par le Conseil d'Administration et reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé (Genève – Suisse), dont je suis l'Investigateur Principal et le Premier Responsable ;

- L'assistance à la formation multidisciplinaire des diplômés d'Université : un technicien supérieur en radioprotection, un chercheur en botanique, un ingénieur en chimie organique, un docteur ingénieur en chimie minérale, un docteur en médecine dentaire, un docteur en biochimie (en cours) et un docteur habilité à diriger des recherches en pharmacologie ;

- La découverte de quelques molécules et fractions à la fois actives (antiplasmodiales) *in vitro* et *in vivo*, leur toxicité est pratiquement faible. Pour une raison de sécurité et pour le respect des accords de collaboration, les noms des plantes actives sont pour l'instant gardés confidentiels.

Tout le déroulement, ainsi que notre approche et les résultats pertinents en réalisant ce projet ont fait l'objet d'une conférence que j'ai présentée lors du 11^{ème} atelier de NAPRECA qui s'est tenu à Antananarivo – Madagascar (**Rafatro et al., 2005a**).

Le rapport final, des trois années d'activités menées pour réaliser les travaux de recherche scientifique décrits dans le projet en question, a été envoyé au siège de l'OMS à Genève – Suisse le 15 novembre 2006.

6. BILAN DE LA RECHERCHE

En seize années d'activités dans le domaine de la recherche scientifique, je suis auteur de quatorze (14) et co-auteur de treize (13) publications nationales et internationales produites par des établissements à comité de lecture : ce qui représente une moyenne de 1,6875 articles par an pour la période entre mai 1991 et décembre 2006. A ces articles, s'ajoutent six communications scientifiques et trois rapports d'activités de recherche. J'ai participé également aux deux débats télévisés sur les thèmes suivants : « *La médecine parallèle* » et « *La médecine traditionnelle face à la médecine scientifique moderne* ».

J'ai contribué aussi aux travaux scientifiques portant sur le développement d'une molécule adjuvante des médicaments antipaludiques. Cette molécule a fait l'objet d'un dépôt de brevet scientifique international au mois de mai 2002.

Je suis également porteur d'un projet de recherche scientifique et biomédicale de base financé par une organisation internationale œuvrée dans le domaine de la santé publique.

Entre temps, j'ai aussi participé - préparé ou monté huit dossiers et programmes de recherche scientifique, plus formation, pour demande de financement auprès des bailleurs de fonds internationaux. Ma dernière œuvre a été soumise au « TWAS – the academy of sciences for the developing world » en décembre 2005. La proposition a été acceptée pour être financée et constituera la moitié du temps de ma préoccupation pour l'année 2007. Elle porte sur l'étude pharmacocinétique plus approfondie des alcaloïdes de *Strychnos myrtoides* – Loganiaceae.

B. DEUXIÈME PARTIE : FORMATION DE JEUNES RELÈVES

Après que j'ai eu mon diplôme de Maîtrise ès Science en Biologie Appliquée (Options : Biologie Animale, Biologie Végétale et Biochimie Pharmacodynamie et Génétique) au mois de juillet 1990. Je me suis inscrit afin de préparer mon mémoire pour obtenir le Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Pharmacologie et j'ai été accueilli par le Professeur Randimbivololona dans le Laboratoire de Pharmacologie Générale et Pharmacocinétique. La soutenance avait lieu en juin 1992. Quand j'ai passé cette étape, j'ai été engagé comme moniteur vacataire pour diriger les travaux pratiques réalisés au

laboratoire. Mon rôle consistait à assister les étudiants à pratiquer des manipulations ou des tests biologiques. A la fin de chaque manipulation, j'ai donné des directives pour les aider à rédiger le compte rendu qui devrait être noté par après.

Mon intégration parmi les enseignants de l'Université m'a permis d'avoir une autre vision sur la façon de mener les expériences sous forme de travaux pratiques en laboratoire. Puis, j'ai adapté et amélioré les techniques de manipulation pour permettre aux étudiants d'atteindre et de mieux comprendre l'objectif des tests biologiques qu'ils réalisaient.

Cette nouvelle vision m'a poussé aussi à aller plus loin dans mes études afin de donner les meilleurs de moi-même dans le domaine de l'enseignement. Ainsi, tout de suite après mon DEA, je me suis inscrit pour préparer ma thèse de Doctorat de Troisième Cycle, je l'ai soutenue deux ans et demi plus tard. L'acquisition de ce nouveau diplôme m'a donné beaucoup d'opportunité et m'a ouverte des portes dans ma carrière d'enseignant-chercheur, entre autres, la préparation de ce mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches.

Aussi, en 2003, j'ai été appelé à disposer des cours théoriques de Pharmacologie Générale au sein du département. Puis, un an plus tard, j'ai été chargé d'une partie de l'enseignement théorique de Pharmacocinétique à l'École Vétérinaire de la Faculté de Médecine.

En plus de mes expériences de moniteur, j'ai découvert aussi la difficulté des étudiants à saisir les cours qu'on les donne. Par conséquent, j'ai amélioré au fil des temps ma technique pédagogique en variant les différentes approches pour expliquer aux étudiants les cours que j'ai disposé.

Étant à la fois à l'Université pour donner des cours théoriques et travaillant dans un laboratoire de recherche, j'ai pu avoir les privilèges de suivre de près les évolutions technologiques, à la fois en théorie qu'en pratique, de la science.

1. LISTE DES ACTIVITÉS D'ENCADREMENTS SCIENTIFIQUES

Profitant de l'avantage en terme d'environnement infrastructurel, technique et financier, de ma compétence, j'étais aussi venu en aide aux étudiants, provenant de quelques départements des différentes Universités de Madagascar, qui cherchaient un laboratoire pour réaliser la partie "travaux pratiques" de leurs mémoires ou de leurs thèses.

ENCADREMENT DES TRAVAUX DE THÈSES

RAKOTOARIMANANA Hajatiana : « Mise en évidence des propriétés pharmacologiques de quelques molécules issues de trois plantes utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme ». Thèse de Doctorat de Troisième Cycle en Biochimie – Université d'Antananarivo. Dans le cadre du projet financé par l'OMS, j'ai donné ce programme à cet étudiant et il était sous ma direction depuis le mois de mars 2005 pour réaliser la partie des travaux de laboratoire du projet mais aussi pour préparer son Doctorat de Troisième Cycle. La soutenance est prévue pour l'année 2007.

RAMANAMPAMAHARANA Rija Herindrainy : « Activité antalgique et sur mobilité

dentaire des extraits de *Paederia thouarsiana* Baill. et *Danais cernua* Baker ». Travaux de laboratoire conduisant à la soutenance d'une thèse de Docteur d'Etat en Chirurgie Dentaire – Université de Mahajanga le 30 Novembre 2006. J'ai supervisé les travaux de laboratoire en proposant un protocole expérimental d'étude pré clinique pour prouver les propriétés pharmacodynamiques de l'extrait de ces plantes sur modèle animal, le rat. Il est Lieutenant militaire, donc, il sera plus tard placé dans un cabinet médical de l'État.

ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy : « Chimie analytique par spectrométrie utilisant la fluorescence X à réflexion totale pour la sauvegarde de *Norhonia ovalifolia* et *Norhonia divaricata* deux espèces, endémiques de Madagascar et plantes antipaludiques menacées de la forêt littorale de Tampolo et d'Andevoranto ». Thèse de Docteur Ingénieur en Chimie Minérale de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo, soutenance le 21 Décembre 2005. J'ai monté ce programme et ai supervisé les travaux de laboratoire et des études écologiques sur terrain, en tant qu'Investigateur Principal d'un projet de recherche scientifique, aboutissant à la soutenance de cette thèse. Elle se prépare aussi en ce moment pour soutenir son mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches.

Manoela Fihevera Pascal : « Relation entre l'activité biologique et les compositions élémentales contenues dans l'Aferontany ou *Mollugo nudicaulis* (Molluginaceae) ». Thèse de Doctorat de troisième cycle en Physique Nucléaire soutenue le 10 février 2005. Cet étudiant était venu me voir quelques années auparavant car il cherchait à valoriser les plantes de Madagascar en favorisant le bénéfice de la technique nucléaire et je lui ai donné ce sujet. A l'heure actuelle, il vient de déposer sa candidature pour être un enseignant-chercheur à l'Université de Toliary.

RANDRIANTOANDRO Hanitra : « Contribution à l'étude d'une poly malformation: en relation avec un cas observé au service pédiatrique de l'hôpital ou de CHU de Mahajanga (à la suite de l'abus d'un décocté de plante) ». Thèse de Doctorat en Médecine Chirurgie Dentaire – Diplôme d'Etat présenté à l'Institut d'Odonto-Stomatologie Tropicale de Madagascar à l'Université de Mahajanga le 8 Août 2003. Elle travaille actuellement dans un cabinet clinique dentaire de l'État dans la région de SAVA – Antsiranana.

RABESANDRATANA Henintsoa Nirilanto Razakandisa : "Etude préliminaire de l'activité antalgique de l'extrait brut de la racine de *Xerosicyos danguyi* Humb. « Tapisaka » en odontologie" et RATSIMBAZAFY Jean Delphin : "Etude préliminaire des effets hémostatique et cicatrisant de l'extrait brut de l'écorce de tige de *Jatropha mahafalensis* « Hatatra » en odontostomatologie". Thèses de Doctorat en Chirurgie Dentaire, Diplôme d'Etat soutenues le 3 Septembre 2001. La demoiselle est en France à l'instant pour préparer une spécialité.

Randriamanantena Davidson Martin : "*Erigeron naudinii* : propriété hémostatique de l'extrait butanolique". Thèse de Doctorat en Médecine Chirurgie Dentaire, Diplôme d'Etat, soutenance le 2 Août 1996. Il travaille actuellement dans un cabinet dentaire, ici à Antananarivo.

ANDRIANETRAZAFY Rodolphi : "*Erigeron naudinii*: activité cicatrisante post-avulsionnelle et effet antalgique sur l'aphte buccale", et Mme RAVAOMIARANALY Victorine: "Etude de l'activité cariostatique, cicatrisante et antalgique de *Paederia*

thoarsiana à la suite des études pharmacodynamiques". Thèses de Doctorat en Médecine Chirurgie Dentaire, Diplôme d'Etat présentées le 12 Août 1997. Il tient actuellement un cabinet dentaire dans la région de Marovoay – Mahajanga et elle, pour ma dernière nouvelle, est embauchée dans une institution missionnaire religieuse de la capitale.

ENCADREMENT DES TRAVAUX DE NIVEAU DEA

RAZAFINDRALAMBO Emmanuël : « Valorisation économique du Ravintsara de Madagascar de 1995 à 2010 ». Mémoire de fin d'étude niveau IV de l'Institut Malgache des Techniques de Planification – Antananarivo soutnu le 19 octobre 2006. J'ai dirigé les travaux de terrain de cet étudiant et lui ai aidé à monter un projet de planification et à rédiger son manuscrit. C'est un fonctionnaire de l'État, donc, l'acquisition de ce diplôme lui permettra de se classer dans une catégorie plus élevée.

MANOELA Fihevera Pascal : "Etude de la teneur en éléments de quelques plantes médicinales malagasy par la technique de la fluorescence-X à réflexion totale". Diplôme d'Etudes Approfondies (Option: Physique nucléaire, physique appliquée et théorique) à l'INSTN obtenu le 15 Juin 2000. Cette étape lui a permis de préparer son Doctorat de Troisième Cycle.

RASOLOFONIRINA Mamiseheno : "Etude de la masse d'échantillon. Analyse par fluorescence-X des sels et quelques plantes médicinales malagasy". Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (option: Physique nucléaire, physique appliquée et théorique) à l'INSTN soutenu le 11 Décembre 1997. Après ce diplôme, il a préparé son Doctorat de Troisième Cycle et il vient d'être recruté en tant qu'enseignant-chercheur dans le Département de Physique.

ENCADREMENT DES TRAVAUX DE MÉMOIRES DE FIN DE CYCLE

RAKOTONDRABE Miora Harivony : « Place de la radioprotection dans un service de radiologie (CHU Androva) et dans un laboratoire de recherche (URPA-IMRA) ». Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Brevet de Technicien Supérieur (B. T. S.) en radioprotection, présentée à l'Institut National des Sciences et des Techniques Nucléaires le 29 Juillet 2005.

RAZAFIMAHEFA Mirana Verohanitra : « Isolement de deux produits antipaludiques de *Brachylaena ramiflora* var. *ramiflora* – Asteraceae ». Mémoire de fin d'étude soutenu et en vu d'obtention du Diplôme d'Ingénieur en Génie chimique, présentée à l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo le 18 Juillet 2005. Elle continue maintenant pour passer à l'étape suivante de ses études.

RAKOTONDRABE Miora Harivony : « Pratique de gestion des déchets radioactifs au sein de deux laboratoires de recherche à Madagascar tels que ceux de l'IMRA et du FOFIFA » : Mémoire de fin du premier cycle en radioprotection, présentée à l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires le 16 Juillet 2004. Cette étape lui a donné l'opportunité de suivre ses études et terminer le cycle de formation.

ANDRIANTSOA Elisoa : « Contribution à l'étude d'une plante endémique de Madagascar: *Brachylaena ramiflora* var. *ramiflora* (Asteraceae) ». Mémoire de fin d'étude, pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur en Génie chimique, présenté à l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo le 30 Mai 2003. Après avoir son diplôme, elle était partie à

Toulouse – France pour continuer ses études, elle y est encore.

RAKOTONIRAINY Niramalala, RAMORASATA Nampoina : "Une valorisation de *Centella asiatica*". Mémoire de fin du premier cycle pour l'obtention d'un Diplôme de B.T.S. en Biotechnologie, soutenance le 20 Septembre 1997. La demoiselle est actuellement une représentante commerciale dans une filiale à Madagascar d'une société internationale et le Monsieur dirige un projet sur les produits naturels qu'il a monté en famille.

TRAVAUX D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE

La plupart du temps, par ma compétence, j'ai été appelé à juger la partie de travail scientifique réalisé au cours de la préparation des mémoires de fin de cycle ou de fin d'études. Je profite l'occasion pour critiquer les travaux, donner des suggestions pour une amélioration des techniques appliquées et avancer des perspectives pour de nouvelles ouvertures. Les sujets traités dans ce domaine sont diversifiés, mais ils tournent autour des plantes et les produits naturels.

Suivi de la préparation d'un dossier de financement pour l'Exploitation des produits cosmétiques à base d'huile de fruit d'avocat (*Persea sp*, Lauraceae) en vue d'obtenir le diplôme de fin d'étude au sein de l'Institut Malgache de Gestion et de l'Art en Management, Antananarivo. Soutenance le 26 Mai 2004.

Suivi de la mise en place d'un dossier de financement pour l' « Extraction et valorisation commerciale de l'huile d'avocat (*Persea sp.*, Lauraceae) » en vue de préparer le diplôme de fin d'étude au sein de l'Institut Malgache de Gestion et de l'Art en Management, Antananarivo. Soutenance le 13 Mai 2004.

Membre du Jury lors de la soutenance des mémoires pour l'obtention des Diplômes d'Etudes Approfondies (D.E.A.) en Pharmacologie le 24 Janvier 2004 par RAZAFIMAHEFA A. Solofoniaina : « Study of the aphrodisiac activity of the root of plant SR01 on animal model (mouse) »; RABESON Volamboahangy Hariseheno « *In vivo* study of the anti-ulcerous activity of *Olax humbertii* (Oleaceae) » ; RANDRIANARIVO Emmanuel : "Study of the anti inflammatory drug activity of the crude extract of *Leea guineensis* (Leeaceae)". Les deux messieurs ont été recrutés dans un laboratoire similaire au notre.

Membre du Jury pour juger les travaux de RAKOTONDRAIBE Verotiana Harimalala : « Étude de l'activité capillaire d'un extrait de plante codé TC/VRF001 sur modèle animal (souris) ». Mémoire pour l'obtention d'un D.E.A en Pharmacologie soutenu le 23 Décembre 2002. Elle vient d'être recrutée dans le Département de Physiologie Animale et Pharmacologie de la Faculté des Sciences – Université d'Antananarivo.

RAKOTOSOLO Tovohery : « Préparation, stérilisation, caractérisation et analyses du jus de carotte : comparaison de deux variétés Malagasy ». Mémoire d'Ingénieur à l'Ecole Supérieure d'Agronomie – Université d'Antananarivo soutenu le 22 Août 2002. Diriger une partie des travaux de labo et membre du Jury.

Membre examinateur du Jury lors de la soutenance du mémoire de D.E.A. de Pharmacologie de Ramanantenasoa Hanitriniana Léa : "Etude *in vivo* de l'activité anticancéreuse des extraits de feuille de *Tachadenus longiflorus* (Gentianaceae) sur un

tumeur de souris [TG180]". Soutenance le 12 Décembre 1998.

Membre de Jury du Mémoire de DEA d'agronomie de Rasoamananoro Faravololona : "Contribution à la caractérisation de l'huile essentielle de *Rhus tratana* (Bakel) dans la réserve forestière spéciale d'Ambohitantely – Ankazobe : étude de variété chimique", présenté le 25 Mars 1998.

Invité d'honneur à la soutenance du mémoire de fin d'études de Dolly, Tinasoa et Tovo intitulé, étudiants du Centre National d'Enseignement de la Langue Anglaise (C.N.E.L.A.) sur : "Plants for beauty: our beauty is in the nature", soutenu le 16 Janvier 1997.

Membre Invité d'honneur du Jury lors de la soutenance du mémoire de fin de cycle pour les étudiants du Centre National d'Enseignement de la Langue Anglaise (C.N.E.L.A. Antananarivo), présenté le 27 Juin 1996 par RANAIVOSOLOARIMALALA Rachel, RAKOTOMANANA Maminirina, RATOVOSON Patrick et ANDRIANIRINA Rivo : "Medicinal plants of Madagascar".

Membre du Jury lors de la présentation de VOAHIRANIAINA ANDRIANASOLO Odile Raphaël : "Mise en évidence de l'activité d'extraits d'invertébré marin 'SAMM 06' vis à vis du *Plasmodium berghei* et du *Plasmodium falciparum*". Mémoire de D.E.A. de Pharmacologie soutenu le 8 Août 1995. Elle est actuellement la représentante commerciale de la filiale à Madagascar d'une industrie pharmaceutique.

Membre du Jury lors de la présentation du mémoire, de D.E.A. de Pharmacologie de Madame le Docteur RASOLOFOHANITRININOSY Robivelo : "Contribution à l'étude pharmacodynamique d'extraits d'*Urophyllum lyallii* Bak. (Rubiacées) ou Tamirova", soutenu le 5 Mai 1995. C'est un médecin qui travaille actuellement au Service d'urgence de l'Hôpital Joseph Raseta.

2. VALORISATION DES PLANTES MÉDICINALES

Dans cette partie de ce mémoire, je vais plutôt évoquer ma participation et la façon dont j'ai dirigé les travaux de laboratoire des étudiants.

a Études pré cliniques

Les plantes impliquées dans cette partie de travail de recherche ont été sélectionnées par les étudiants et leurs directeurs de formation eux-mêmes. Mais, au sein du laboratoire et sous ma supervision, des protocoles expérimentaux ont été mis en place pour vérifier et démontrer les vertus médicinales de ces plantes. Selon l'indication thérapeutique de la plante dans la médecine empirique ou traditionnelle, différents types de méthodes ont été mis au point pour démontrer les propriétés pharmacologiques des différents extraits issus des plantes choisies. Ci-après sont les synthèses des approches que j'ai appliqué pour réaliser certains travaux de ces études.

Dans le cadre de la formation de jeunes universitaires, des études pré cliniques au laboratoire ont été réalisées afin de prouver les propriétés pharmacologiques des extraits de plantes :

Brachylaena ramiflora (Asteraceae) : L'extrait hydroalcoolique des feuilles a été investigué. Une étude de fractionnement bio guidé a été menée afin d'identifier les principes actifs de cette plante. A l'heure actuelle, deux molécules pures ont été isolées et elles sont toutes les deux actives *in vitro* & *in vivo* pour inhiber la croissance parasitaire de l'agent du paludisme, le *Plasmodium falciparum*. L'élucidation de leurs structures chimiques est en cours, les premières analyses démontrent que ce sont des triterpènes.

Dans la voie de recherche de médicaments dans le domaine de l'odontostomatologie. Six plantes de Madagascar ont été étudiées :

Le *Paederia thoarsiana* (Rubiaceae) a été mâchée par les gens qui ont mal aux dents ou ceux qui ont des dents trouées et pourries. Au laboratoire, l'extrait brut hydroalcoolique des feuilles de cette plante a été préparé. Tout d'abord, il a été testé *in vitro* sur la croissance des souches bactériennes responsables des caries dentaires. Ensuite, un test de cicatrisation d'une plaie provoquée a été effectué. Effectivement, l'extrait brut inhibe significativement la croissance microbienne et accélère le processus de cicatrisation des plaies. L'essai clinique chez les humains a confirmé les pouvoirs cariostatique, cicatrisant et antalgique de l'extrait brut. Une autre information nous a indiqué que mâcher tous les jours la feuille des plantes appelées « *lengomaimbo* » soulage les maux et remet en état normal les dents définitives mobilisées suite à un accident. En comparant les herbiers de ces plantes avec les échantillons archivés au service botanique du Parc de Tsimbazaza, deux plantes ont été identifiées : le *Paederia thouarsiana* et le *Danais cernua* (toutes les deux appartiennent à la famille des Rubiaceae). Un protocole a été mis au point au laboratoire afin de démontrer l'effet anti-douleur et anti-mobilité dentaire de l'extrait de ces plantes. Deux protocoles de tests ont été mis au point : la résistance à la chaleur chez les souris et la mobilité des incisives des rats. L'extrait brut hydroalcoolique de ces plantes procure une résistance prolongée aux souris traitées, le paracétamol a été utilisé comme produit de référence. Cet extrait accélère la durée du processus de cicatrisation de la partie des gencives abîmées qui se trouvent sous les dents mobilisées. Et par la même occasion, il raccourcit la durée des jours douloureux marquée par la reprise précoce de l'alimentation des rats traités à l'extrait par rapport à ceux qui ne l'ont pas reçu. Les essais cliniques chez les humains ont confirmés les résultats obtenus au laboratoire et les principes actifs de ces plantes se trouvent dans la fraction moins polaire de la phase acétate d'éthyle de l'extrait brut hydroalcoolique.

Dans le temps ancien, à Madagascar, la plante appelée « *maitsoririnina* » a été très réputée par son pouvoir d'arrêter une hémorragie superficielle suite à une blessure ou une plaie ouverte. Certains gens l'utilisent aussi pour stopper l'hémorragie suite à une extraction de dents. Cette plante a été identifiée comme *Erigeron naudinii* (Fabaceae). Au laboratoire, un protocole a été mis au point pour démontrer l'effet pharmacologique de l'extrait de cette plante. Chez le rat, il accélère le processus de cicatrisation des gencives sous des dents expressément enlevées. Chez les souris, l'extrait hydroalcoolique accélère le processus de cicatrisation d'une plaie provoquée sur la peau de la partie dorsale. En effet, l'activité hémostatique a été prouvée en appliquant la phase butanolique de l'extrait. Et en clinique humaine, en plus de l'effet hémostatique, l'extrait est aussi doué d'un pouvoir cicatrisant post-avulsionnel et antalgique.

L'extrait brut des feuilles de *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae) a été testé sur les

dents cariées : un effet cariostatique et antalgique a été observé.

Pour le *Jatropha mahafalensis* (Euphorbiaceae) : l'extrait brut a un pouvoir hémostatique et cicatrisant à la suite de son application pendant quelques jours sur une plaie survenue après extraction dentaire.

La consommation de « *tambavy* » appelé communément « *mangidy* » (qui signifie *décocté amère*) devient une habitude et entre dans le besoin quotidien de certains habitants de la ville d'Antananarivo. La plante a été identifiée comme *Mollugo nudicaulis* (Aizoaceae). En fait, une manifestation toxicologique liée à la consommation excessive, voire même abusive, de cette boisson traditionnelle a suscité notre curiosité. En réalité, des faits marquants un grand hôpital d'Antananarivo et qui sont survenus fréquemment courant l'année 1997 est l'observation de quelques cas de patients morts. Ils ont été introduits à cet hôpital à la suite d'un problème cardiaque, certains mourraient mais d'autres ont été sauvés de la catastrophe ; parce que étant introduits à l'hôpital, ils ont arrêté la prise de la boisson. Les analyses médicales pré mortem, ou à l'entrée au service d'urgence, ont montré que la mort a été due à l'arrêt cardiaque par bloc auriculo-ventriculaire. En effet, au laboratoire, à l'aide du cardiogramme d'un cœur de grenouille installé pour un test sur organe isolé, il a été démontré que l'extrait brut hydroalcoolique de la plante inhibe la transmission nerveuse, qui est à l'origine de la contraction automatique du cœur ou le péristaltisme cardiaque. Le signal partant de l'oreillette vers le ventricule est coupé. Mais il a été constaté que le rythme cardiaque reprend quand le bain à organe isolé a été rincé. Il a été remarqué aussi qu'effectivement, au cours de ce test sur organe isolé, cet effet toxique n'apparaît qu'à une concentration très élevée en extrait de plante dans la solution de survie qui se trouve dans le bain.

Dans le domaine d'expertises scientifiques, en voici la liste des plantes avec lesquelles des travaux de recherche ont été réalisés :

Action anti-ulcère d'estomac avec *Olex humbertii* (Olacaceae), *Urophyllum lyallii* (Rubiaceae) ;

Activité anti-inflammation pour *Leea guineensis* (Leeaceae) ;

Suspicion d'effet tératogène par malformation néonatale avec le décocté de l'écorce de tige de *Sakoagasy* ou *Poupartia caffra* (Anacardiaceae) ;

Pouvoir capillaire d'une plante codée ;

Propriété anti-cancéreuse de *Tachiadenus longiflorus* (Gencianaceae) ;

Étude de l'huile essentielle de *Rhus taratana* (Anacardiaceae)

Évaluation de l'activité antiplasmodiale d'un extrait d'invertébré marin.

Tous les travaux scientifiques réalisés pour cette partie d'études pré cliniques ne sont pas annexés à ce document de synthèse mais ils sont uniquement énumérés dans le chapitre précédent. Ce que j'essaie de décrire ici, ce sont les motivations scientifiques qui nous ont poussé à évaluer la place de quelques plantes de la flore Malagasy dans la phytothérapie.

b Analyses élémentales

Dans l'intention de vouloir participer à la valorisation de la richesse naturelle de Madagascar, en particulier le potentiel de sa flore. Puisque que les études pharmacologiques des plantes impliquées en phytothérapie ont suscité beaucoup de questions, telle que : y aurait-il une corrélation entre la teneur en éléments minéraux et les activités biologiques des extraits de plantes médicinales Malagasy impliquées en phytothérapie ? Autrement dit : serait-il toujours les composés organiques de la plante qui serait responsable des effets pharmacologiques des plantes médicinales ? Notre travail a pour objectif d'apporter une contribution pour répondre à ces questions. Ceci consiste à mettre en évidence la relation entre la structure des éléments chimiques contenus dans les parties des plantes remèdes impliquées en phytothérapie et leurs propriétés pharmacologiques justifiant leur utilisation en médecine traditionnelle.

Les plantes choisies dans cette partie d'étude ont été sélectionnées sur la base des informations ethnobotaniques et/ou selon leur utilisation empirique dans le domaine de la phytothérapie traditionnelle. Partant des renseignements recueillis lors des enquêtes ethnobotaniques, les vertus des plantes médicinales ont été enregistrées. Ensuite, une collaboration interinstitutionnelle a été établie en vue d'analyser les différents éléments chimiques des plantes impliquées en phytothérapie. Puis, les tests biologiques et les criblages pharmacologiques ont été réalisés au laboratoire et certains de ces résultats sont cités dans le chapitre précédent.

L'objet de ce travail a été porté sur les travaux de recherche menés sur les plantes ci-après :

Le *hazovahiny* ou *Erigeron naudinii* (Asteraceae) : Le suc de feuilles fraîches écrasées est utilisé en médecine traditionnelle par application locale en cas de blessure, en particulier pour prévenir une hémorragie. Comme éléments analysés des échantillons des feuilles de cette plante : le calcium (1,22%) et le potassium (0,42%) se trouvent en quantité majoritaire. Ainsi, l'effet anti-hémorragique de cette plante pourrait être expliqué par la teneur importante en calcium qui se trouve plus élevée dans l'extrait des feuilles. Il est connu que le calcium est impliqué dans le processus de la coagulation du sang en cas d'hémorragie par activation de la prothrombine et de la thromboplastine.

L'*aferontany* ou *Mollugo nudicaulis* (Aizoaceae) : Le décocté de la plante entière a été utilisé en médecine traditionnelle pour lutter contre la toux, pour le traitement de la coqueluche et en cas de vomissement de sang. L'analyse effectuée sur la plante entière montre que le potassium et le calcium sont présents en forte proportion dans cette plante, respectivement jusqu'à 4,70% et 1,20%. La proportion en potassium pourrait atteindre jusqu'à 6,3% dans la racine. Elle contient aussi une proportion non négligeable de fer qui peut atteindre jusqu'à 0,45%. Si on parle de l'*aferontany*, bon nombre de Tananariviens issus de différentes couches sociales consomment quotidiennement de la tisane à base de cette plante. Malheureusement, en 1997, une personne a trouvé la mort subitement par arrêt cardiaque suite à cette habitude de longue durée et par abus en l'utilisant comme boisson. Si on se base sur les données de la littérature, le potassium est un cation très abondant à l'intérieur de la cellule intervenant sur l'osmolarité : cette concentration intracellulaire influence fortement la polarisation de la membrane cellulaire qui à son tour joue un rôle important sur le processus cellulaire tels que la conduction d'influx nerveux et la contraction du muscle cellulaire, y compris le myocarde. Ainsi, une altération de sa

concentration plasmatique pourrait entraîner des manifestations cliniques graves : l'hyperkaliémie pourrait provoquer une toxicité cardiaque. A titre indicatif, la consommation régulière ou le surdosage au décocté d'*aferontany* pourrait être à l'origine de problème cardiaque qui se manifesterait par un bloc auriculo-ventriculaire (observation d'un autre cas clinique et lors du test sur des cœurs isolés de grenouille).

L'*angamay* ou *Tridax procumbens* (Asteraceae) : Le suc des feuilles et des tiges fraîches est utilisé en médecine empirique par application locale en cas de blessure et de brûlure. Après analyse, les teneurs en calcium et en potassium sont respectivement de l'ordre de 7'500 ppm et de 5'000 ppm où ces deux éléments joueraient un rôle non négligeable dans le processus de guérison de la peau suite à une blessure ou brûlure.

En ce qui concerne la plante appelée *taritarika* ou *Leptadenia madagascariensis* (Asclepiadaceae), les fruits et les feuilles sont utilisés en décoction pour soulager la constipation, tandis que le latex de la tige est utilisé comme anti-hémorragique et pour enlever une écharde. Les éléments en forte teneur sont le soufre (1'013 ppm), le potassium (2'420 ppm) et le calcium (qui peut atteindre jusqu'à 12'630 ppm). Par contre, chez une autre espèce de *Leptadenia sp.*, une teneur importante en sélénium et en phosphore a été observée. Une fois de plus, le calcium se trouve en quantité majoritaire pour cette plante à vertu anti-constipation. En effet, cet élément est nécessaire pour le bon fonctionnement de nombreux processus intra et extra cellulaire incluant la contraction musculaire et la conduction nerveuse.

Dans le domaine de l'odontostomatologie, les feuilles fraîches de *lengo* ou *Paederia grevei* (Rubiaceae) sont mâchées pour frotter les gencives des enfants afin d'apaiser la douleur provoquée par les dents au stade d'éruption. Elles sont aussi mastiquées pour nettoyer les dents, les plaies buccales et soigner les dents malades. Un essai clinique préliminaire a été effectué démontrant ainsi que l'extrait brut de la plante fraîche a un effet antalgique en cas de carie dentaire, puis cicatrisant et raffermissant en cas de gingivite ou de lésion aphteuse. A la suite des analyses par fluorescence - X, le fluor (8'480 ppm) présente une teneur importante suivi du potassium (6'782 ppm), du calcium (4'014 ppm) et du soufre (2'331 ppm).

Le suc des feuilles de *tapisaka* ou *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae) est employé pour le traitement des plaies d'origine syphilitique par application locale et comme ocytocique par voie orale. L'infusât est utilisé comme remède pour un traitement général en cas de syphilis. La décoction de feuilles et tiges, utilisée comme bain de bouche, a démontré un effet antiseptique. La racine râpée est utilisée en cas de carie dentaire comme antalgique en bourrant la cavité. Cette plante contient aussi une forte proportion en soufre (14'680 ppm), en potassium (7'330 ppm) et a une teneur assez élevée en calcium (3'629 ppm) et en phosphore (1'601 ppm).

Le latex ou un broyât d'écorces de *hatàtra* ou *Jatropha mahafalensis* (Euphorbiaceae) est employé comme astringent et hémostatique. Cette plante est également utilisée pour le traitement des plaies et des blessures en milieu buccal. Les éléments chimiques majeurs identifiés dans l'échantillon de cette plante sont : le calcium (23'983 ppm), le potassium (12'281 ppm), le chlore (1'923 ppm) et le soufre (1'397 ppm).

Le fluor est un élément essentiel sur la construction des dents : il aide à renforcer

l'émail dentaire et le rendre moins susceptible à la destruction par carie dentaire. Il a été démontré depuis plusieurs siècles que le fluor à l'état naturel joue un rôle primordial dans la prévention de la carie dentaire. Pour les autres éléments analysés : le phosphore, en suppléant avec du calcium, est nécessaire à la formation des os et des dents. L'effet antiseptique serait probablement lié à la présence de composés soufrés. Il est à rappeler aussi que la contraction musculaire manifestée par l'attachement de la myosine avec l'actine nécessite la présence d'ions calcium.

D'après cette étude, les analyses effectuées ont montré qu'il existe une corrélation entre la teneur en élément chimique contenu dans l'extrait des plantes investiguées et leurs propriétés pharmacologiques. Deux éléments minéraux se trouvent fréquemment en quantité majoritaire dans ces quelques plantes étudiées : le calcium et le potassium. Le calcium se trouve en proportion importante quand il s'agit du traitement de la plaie (hémorragie, cicatrisation). Le potassium en cas de problème lié à la tension artérielle ; par exemple, en cas d'hypertension, un régime alimentaire pourrait aider à normaliser la valeur de la tension artérielle : ceci est probablement dû à la consommation de nourriture à base d'aliments riche en potassium. D'un autre côté, la phytothérapie avec l'extrait de plante contenant un taux élevé en soufre est liée au besoin d'asepsie, celle du fluor est en relation avec le soin/renforcement dentaire et le chlore avec l'activité musculaire. Comme petite note au passage, il est inutile de signaler que ces éléments n'existent pas à l'état atomique dans les plantes mais ils forment une structure moléculaire composée de plusieurs atomes. Donc, ce qui reste à faire, c'est de déterminer la structure chimique des molécules actives incorporant ces différents éléments analysés.

La publication scientifique évoquant la valorisation de ces quelques plantes médicinales de Madagascar impliquées en phytothérapie est déjà parue (**Rafatro et al., 2005b**). La partie concernant l'aferontany a été publiée dans le dictionnaire encyclopédique des mots et des connaissances (**Rafatro et al., 2003c**) publié par l'Académie Malagasy.

c Études écologiques

Il est certain que beaucoup d'intérêts peuvent être soutirés suite aux analyses et à la détermination des teneurs en différents éléments composant l'extrait d'une plante médicinale impliquée en phytothérapie. Les résultats obtenus pourraient servir comme données de base pour identifier les besoins en éléments chimiques d'une telle plante.

Ceci est une chose, mais d'un autre côté, une expérience malheureuse nous est arrivée quand on a entamé l'investigation de la plante *Strychnos myrtoides*. En faite, on s'était pressé d'identifier et d'isoler les éléments actifs de cette plante sans se pencher au préalable aux problèmes liés à sa vulgarisation si jamais des intérêts industriel et/ou pharmaceutique se présenteraient ultérieurement. Effectivement, quand on avait l'intension de faire une culture intensive dans la région d'Antananarivo où il y a les stations agricoles de l'institut, nous avons du faire face au problème de transplantation. Cette plante ne pousse à l'état cultivé que dans son milieu naturel : sur la partie Nord-Ouest de Madagascar et ceci sur un terrain situé entre deux altitudes bien déterminées.

C'est la raison pour laquelle, avant de se lancer dans une étude plus profonde d'une autre plante qui s'avère présenter un intérêt scientifique, nous avons focalisé d'abord l'objectif de notre travail sur les études écologiques et la détermination du mode de propagation naturelle de la plante en question avant d'approfondir l'identification de ses éléments bio actifs. Car, nous pensons que l'acquisition de la connaissance sur les données écologiques et de composition élémentaire d'une plante peut apporter une information importante sur les différentes méthodes à mettre au point pour sa conservation et sa pérennisation. C'est moi qui ai dirigé toute l'équipe pendant la réalisation de tous les travaux de terrain et de laboratoire de toutes ces études.

C'était une femme guérisseuse habitant dans la province de Toamasina, qui pratique le soin et le traitement avec la plante – qui s'occupe aussi de lever les mauvais sorts infligés à une personne, a été à l'origine de l'information pour la sélection de la plante étudiée dans cette partie d'étude. C'est la feuille d'une plante qui entre dans la composition d'un remède traditionnel pour traiter le paludisme.

Dans cette partie de Madagascar, le nom vernaculaire de la plante est « *tsilaitra* ». Elle a été identifiée comme le *Norhonia* (Oleaceae). A l'état naturel, elle pousse à l'intérieur de la forêt littorale protégée de Tampolo, on en trouve aussi le long des propriétés privées de la station balnéaire d'Ambila et quelques pieds dans la forêt d'Andevoranto. Les travaux réalisés sur cette plante ont été divisés en deux parties : analyse élémentaire et étude écologique. Deux espèces de *Norhonia* (Oleaceae) ont l'objet de cette étude écologique.

Les analyses élémentaires ont été effectuées à deux niveaux : sur les différentes couches du sol (ou horions) où pousse la plante et sur les feuilles collectées à différents âges. La technique nucléaire par fluorescence – X à réflexion totale a été appliquée pour l'étude qualitative et quantitative. Les résultats obtenus montrent que le sol étudié dispose plus de fer et de titane. Au niveau des feuilles de cette plante, moins de nombre d'éléments trouvés dans le sol s'y trouvent. Les chiffres obtenus montrent que le calcium et le potassium se trouvent en quantité majoritaire. Il va sans dire que ces deux éléments interviennent essentiellement dans la construction et la structure physique de la partie de la plante étudiée.

En ce qui concerne la partie de travail écologique, il a été basé sur l'investigation des deux paramètres : étude du mode de régénération naturelle et de flore associée. Tout d'abord, les informations concernant la formation où vit l'espèce étudiée a été relevée. Ensuite, la régénération naturelle ; puis l'étude de la flore associée est l'ensemble des espèces végétales qui vivent dans le même milieu que les espèces cibles.

Les résultats obtenus montrent que les zones d'étude n'ont pas montré de différence énorme de stratification, mais elles ont toutes appartenu à une population jeune. Les espèces cibles à dph \leq 10 cm sont rares. Ainsi la surface terrière et le biovolume sont maigres. Le coefficient d'élancement est peu élevé, les deux espèces étudiées sont stables et ont eu un bon potentiel de régénération (entre 2'480 à 23'300%) sur un sol sableux. L'étude de la flore associée a permis de dire qu'il n'y a pas une étroite association par rapport à la famille Oleaceae, ni au genre *Norhonia*, mais celle-ci a été plus prononcée par rapport au genre *Sarcolaena*. Les profils structuraux ont montré que

les parcelles sont fortement exploitées. Les menaces ont été évaluées et toutes ces zones ont montré une nécessité de régénération par intervention sylvicole. Le nombre de plantules est très élevé. Le risque d'extinction est dû aux quelques facteurs, telle que : la réduction de la zone d'occupation, la perte de l'habitat et l'exploitation sélective.

Lors de la réalisation de ces travaux de terrains pour cette partie d'étude, j'ai monté le programme et ai dirigé l'équipe scientifique pendant les expéditions forestières. Et les résultats obtenus ont fait l'objet d'une thèse de Docteur Ingénieur en Chimie Minérale, puis ils ont été soumis pour publication dans un journal international qui s'est dévoué dans la conservation de la biodiversité de Madagascar (**Rafatro et al., 2006a**). L'article a été révisé et je vais le soumettre de nouveau.

3. TRAVAUX D'EXPERTISES SCIENTIFIQUES

Après avoir obtenu mon diplôme de Docteur de Troisième Cycle, étant spécialiste en pharmacologie et ayant acquis quelques années d'expérience sur la valorisation des plantes médicinales de Madagascar, j'ai été sollicité par des étudiants issus de différentes disciplines pour juger et examiner la soutenance de leurs mémoires de fin d'études.

Mon intervention pour ces travaux d'expertise porte sur deux points essentiels, tels que :

- La forme de la présentation : on juge surtout la qualité et la valeur

Du manuscrit : si la présentation suit la norme imposée par le département d'où l'étudiant est sortant ;

De la communication orale : si l'impétrant maîtrise bien le sujet qu'il traite, utilisant comme outil de communication la langue officielle d'enseignement à Madagascar ;

- Le fond des travaux scientifiques : on examine

L'originalité du thème choisi ;

L'application des outils appris en cours et/ou pendant les travaux pratiques ;

L'acquisition de la compétence scientifique par la mise en évidence de l'approche scientifique et la capacité à commenter puis interpréter les résultats obtenus.

Plus d'une vingtaine d'étudiants, issus de différentes filières d'études scientifiques et médicales, ont pu profiter de cette expertise. Le bilan général, de cette activité de formation et les résultats encourus, est énuméré dans la rubrique finalisant cette partie.

4. TRAVAUX DE COLLABORATION

Depuis le début de l'année 1995, l'année qui suit l'obtention de mon doctorat de troisième cycle, j'ai initié et conduit des travaux de collaboration avec :

- Madagascar INSTN (Institut National des Sciences et des Techniques Nucléaires, Université d'Antananarivo) afin de valoriser les plantes médicinales Malagasy utilisant la technique nucléaire de fluorescence-X à réflexion totale pour les analyses élémentaires des échantillons de plantes impliquées en phytothérapie. Deux étudiants de cette

institution ont été sous ma direction quand ils ont travaillé au laboratoire pour préparer leurs mémoires de DEA. L'un deux a continué son étude et préparant sa thèse de doctorat troisième cycle en gardant le même sujet. Ils ont tous les deux maintenant leurs doctorats.

Un autre étudiant a fait tous les stages de son cycle d'étude dans le laboratoire, il était avec nous pour la formation en technicien de radioprotection ;

- L'IOSTM (Institut d'OdontoStomatologie Tropicale de Madagascar – Université de Mahajanga) afin d'apporter notre contribution à la recherche de remèdes alternatifs pour soulager les affections bucco-dentaires. Les plantes issues de la médecine traditionnelle ont été proposées et leurs extraits ont été étudiés afin de prouver leur efficacité par des démonstrations scientifiques au laboratoire. Parallèle à cette activité, sept (7) étudiants ont été formés et ils sont actuellement Docteur en Médecine Chirurgie Dentaire qui vont étoffer le personnel des cabinets médicaux de cette branche répartis dans toute l'île. J'ai été appelé à encadrer ces étudiants pour faire des études pharmacologiques dans le cadre d'une évaluation pré clinique des extraits de plantes sélectionnées ;

- L'ESPA (École Supérieure Polytechnique d'Antananarivo – Université d'Antananarivo) : j'ai co-encadré une dizaine d'étudiants issus de cette grande école pour faire des études phytochimiques sur les plantes médicinales impliquées en phytothérapie. Mon travail consiste à co-diriger les différentes étapes d'extraction jusqu'à l'isolement des molécules actives de ces plantes.

- L'ESSA (École Supérieure des Sciences Agronomiques) – Université d'Antananarivo en co-encadrant deux étudiants qui ont travaillé sur la mise au point des méthodes ou des processus techniques pour la conservation des jus de fruits préparés à partir des plantes alimentaires (carotte, ananas). J'ai examiné aussi les travaux de mémoire d'une étudiante préparant un diplôme d'ingénieur agronome qui porte sur l'analyse d'une huile essentielle issue d'une plante endémique de Madagascar ;

- L'IMGAM (Institut Malgache de Gestion et de l'Art en Management) en aidant deux groupes d'étudiants qui ont travaillé sur le montage des dossiers de financement concernant la vulgarisation des extraits de plantes utilisées en cosmétique.

- Le CNELA (Centre National d'Enseignement de la Langue Anglaise) en aidant deux groupes d'étudiants finalisant leurs mémoires de fin d'études sur les thèmes autour du *bienfait des plantes pour la beauté de l'homme*. J'ai été invité lors de leurs soutenances pour donner mon avis sur la pertinence de leurs travaux et l'impact de leurs études dans le monde réel et pratique, tout ceci en démontrant la maîtrise de la langue anglaise ;

- L'IMATEP (Institut MALgache des TEchniques de Planification) où j'ai été invité pour encadrer un étudiant préparant un mémoire de fin de cycle sur la planification d'un programme de valorisation économique d'une plante à huile essentielle. Dans ce cadre d'activité, j'ai surtout partagé mon savoir faire pour améliorer l'approche appliquée par l'impétrant en collectant les données dont il aurait besoin pour la rédaction de son manuscrit. Lors de la soutenance, j'ai été désigné pour présider la séance.

La liste des institutions que j'ai mises en collaboration n'est pas exhaustive. Celle-ci a été présentée compte tenu de l'aboutissement des travaux réalisés et de la pertinence

des résultats obtenus.

5. BILAN DE LA FORMATION

Le point fort de mes activités dans le domaine de formation est marqué par l'élargissement des collaborations avec différentes institutions Universitaires locales, nationales et internationales.

Pendant toutes les périodes entre 1995 (l'année qui suit l'obtention de mon doctorat de troisième cycle) et 2006, *i.e.* onze années d'activités en tant que formateur :

- Quarante deux (42) étudiants, avec une moyenne de 3,8 par an, ont pu bénéficier de mes partages de connaissance et de mon savoir-faire. Ils sont répartis en :

Onze (11) mémoires de fin d'études accomplis, soit une moyenne annuelle de 1,0 ;

Vingt (20) travaux de préparation des thèses de doctorat d'Université achevés, ce qui représente une moyenne de 1,8 par an ;

Onze (11) travaux d'expertise scientifique avec aussi une moyenne annuelle de 1,0.

- J'ai pu rassembler pas moins d'une dizaine d'institutions (nationales et internationales) pour accomplir des travaux de collaboration scientifique encadrant aussi des étudiants qui préparaient des travaux de mémoires ou de thèses.

C. TROISIÈME PARTIE : ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES CORRÉLATIVES

Mes activités professionnelles n'étaient pas tout simplement limitées à l'enseignant et à la recherche. Dans cette partie, je vais tout simplement présenter les activités relatives à l'enseignement et à la formation. A savoir :

- Depuis 1993, j'ai participé aux activités scientifiques de l'association NAPRECA (conférences, formation sur l'analyse chimique et la séparation chromatographique). A la première réunion à Madagascar, j'ai donné une formation sur la technique des tests antipaludique *in vitro* et cytotoxique aux professeurs et docteurs représentants des pays membres. Une fois, en 2001, j'ai été désigné comme représentant et dirigé une délégation de NAPRECA-Madagascar lors de la réunion organisée au Nairobi, Kenya ;

- Pour que je puisse accéder à un niveau international de communication :

en 1992, j'ai commencé à m'initier à l'informatique (Macintosh d'abord, puis PC à partir de 1999). Par la suite, l'informatique m'est devenu un outil indispensable pour acquérir les informations internationales. C'est également une porte qui s'ouvre, pour moi, pour me communiquer aisément avec le monde entier, scientifique ou non ;

en 1994, j'ai suivi une formation d'une année scolaire pour obtenir le diplôme de Technicien en Electronique. Cette formation m'a permis de résoudre les petites pannes

électroniques et d'électricité des matériels et des équipements du laboratoire ;

en 1995, j'ai suivi une formation de un an au Centre Culturel Américain (CCA) d'Antananarivo pour apprendre la langue anglaise (parler – lire – écrire). Cette connaissance linguistique m'a beaucoup aidé à rédiger les articles publiés, en cette langue dite officielle pour les scientifiques, dans des journaux internationaux ;

en septembre 2002 et juillet 2003, j'ai suivi une formation continue organisée par le Campus Numérique Francophone de l'Océan Indien – Agence Universitaire de la Francophonie – Bureau de l'Océan Indien sur les thèmes « création des pages » et « gestion des sites » sur Internet ou sur le web ;

- Dans le protocole des tests antipaludiques *in vitro*, nous manipulons des éléments radioactifs. Pour améliorer le système de manipulation et de gestion des déchets radioactifs, j'ai suivi une formation spécialisée en Ouganda en 2001. Et sur place, pour nous aider dans cette tâche, nous avons fait appel à la compétence de Madagascar INSTN. Ainsi, nous avons reçu un étudiant de cette institution pour mettre en place ce programme.

Il a profité de son passage au laboratoire pour préparer deux diplômes : un mémoire de stage de fin d'année et un autre de fin d'année de cycle qui lui a valu le brevet de technicien supérieur ;

- En l'an 2003, IMRA s'est adhérent à l'association internationale Network of Users of Scientific Equipment in Eastern and Southern Africa (NUSESA). Notre laboratoire est membre à part entière et je suis le représentant officiel de l'IMRA auprès de cette association. En 2003, j'ai été désigné et invité en tant que représentant de NUSESA-Madagascar à une des réunions consultatives de tous les pays membres. Au même titre, en 2004, j'ai été aussi invité pour assister à la formation sur un thème de Bonne Pratique de Laboratoire (BPL) : « Management de laboratoire ». Au retour à cette formation, j'ai organisé à l'IMRA un atelier relatif à ce thème : « La qualité de management de laboratoire ». Il a été invité lors de ce séminaire des Chefs/Responsables et des Techniciens des Laboratoires de formation (Universités), d'institution commerciale (telle que la Star) et de recherche (comme la FOFIFA). J'ai été aussi chargé de présenter deux thèmes sur le « Design » et l'« Accréditation » de laboratoire.

- J'ai fait aussi des recherches et beaucoup de documentation sur les plantes médicinales Malagasy appelées communément « RAokandro amin'ny FAmpiasa TSOtra ou *remèdes à usage simple* ». Une partie des résultats de ces activités a été présentée à l'Académie Nationale des Arts, des Lettres et des Sciences (**Rafatro et al., 2003b; 2004**). Ma participation aux activités scientifiques de l'Académie Nationale Malagasy m'a permis d'être adhérent comme Membre Correspondant de cette institution en janvier 2003, puis tout récemment, je viens d'être promu Membre Associé (7 septembre 2006) et aussi désigné Membre du Bureau Exécutif du Comité Malagasy d'Éthique pour les Sciences et les Technologies instauré au sein de cette institution (4 octobre 2006).

Certains de ces résultats ont été aussi les sujets de communications à l'Hilton Madagascar lors des ateliers organisés par la SOciété MALagasy de DERmatologie.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE D'ACTIVITÉS DE DÉVELOPPEMENT MÉDICAMENTEUX

Dans ce chapitre de ce mémoire, je vais présenter la synthèse de mes activités scientifiques en focalisant essentiellement sur la recherche et de développement de la malagashanine.

INTRODUCTION

Le paludisme, défini comme une maladie parasitaire provoquée par un hématozoaire dont l'espèce *Plasmodium falciparum* est la plus fatale pour l'humanité, est une épidémie qui frappe la plupart des pays tropicaux et inter tropicaux.

Dans le monde entier, on estime par an à plus de 250 millions de cas et de 2 millions de décès causés par cette maladie (**WHO, 1996**). Plus de la moitié de ces victimes sont des enfants qui avec cette maladie n'ont pas la chance d'atteindre l'âge de dix ans (**Mandavilli, 2002**). En Afrique subsaharienne, le paludisme est un problème dont l'étendue est sans précédent à travers le monde d'aujourd'hui. Les conditions sociales et économiques généralement déplorables augmentent encore la gravité du problème. On estime qu'environ 80% des cas de paludisme et entre 90 à 95% des cas de mortalité liés à cette maladie dans le monde sont enregistrés en Afrique. Au moins 300 millions de cas sont traités annuellement en Afrique subsaharienne. La maladie affecte d'une façon

particulièrement grave les femmes enceintes, les jeunes enfants et les populations migratoires, à cause de leur immunisation basse ou non existante à la maladie: chaque année entre 675.000 et 1.000.000 de décès parmi les enfants de l'Afrique subsaharienne sont imputés au paludisme (**AAAS, 1991**).

Face à ce danger imminent, en 1955, l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) a lancé une campagne mondiale de chimiothérapie et de moustiquaire/habitat imprégné d'insecticide dans le but de lutter contre le parasite du paludisme et son vecteur (**Randriatsimaniry, 1995**). Cinq ans plus tard, en 1960, il a été constaté que cette maladie a été loin d'être éradiquée de ce monde, pire encore le parasite tuait d'avantage (**Mouchet et al ., 1995**). Une complication lors du traitement et de l'éradication de cette maladie est constatée avec l'apparition non seulement des résistances des souches plasmodiales aux antipaludiques courants mais aussi des moustiques vecteurs de cette maladie aux certains insecticides. Autrement dit, toutes ses stratégies ont abouti en partie à l'enclenchement chez le parasite d'un système de défense naturel pour sa survie : la résistance médicamenteuse (**Payne, 1988**). Ceci a provoqué un bouleversement général et la panique totale quant au traitement du paludisme malgré les efforts déployés par les scientifiques aidés par les industriels pharmaceutiques pour le développement des médicaments antipaludiques de toutes sortes et de toutes origines. Ces activités ne restent seulement pas au stade de la recherche de produits pour la chimio- ou la phytothérapie mais tentent aussi de comprendre leur mécanisme d'action afin de mettre au point une stratégie de lutte contre l'éventuelle résistance des parasites aux courants ou nouveaux antipaludéens (**Peters, 1988**).

La quinine, isolée de la plante sud-américaine "*Cinchona calisaya*", a été le premier antipaludique connu et reste encore à l'heure actuelle très efficace dans le traitement de cette maladie. Des centaines de dérivées ont été synthétisées et parmi ceux ci ont émergés les amino-4 quinoléines (chloroquine, amodiaquine, ...) et les amino-8 quinoléines (primaquine, ...). Par ailleurs, plusieurs dérivés de pyrimidine ont été également synthétisés et parmi eux les diamino-2,4-pyrimidines (proguanil, ...). Avec cet arsenal thérapeutique, les chercheurs des années 1950 ont pu penser que le profil thérapeutique du paludisme était pratiquement défini. Ainsi, l'O.M.S. proposait un traitement prophylactique du paludisme par la chloroquine et elle estimait à 340 tonnes par an la consommation en ce médicament (**Garin et al ., 1991**). Ceci a expliqué, l'absence de mise sur le marché de nouveaux antipaludiques sur le circuit commercial avant les années 1990, à part les sulfonamides. Mais viennent par la suite : l'artémisinine et ses dérivées (**Haynes, 2001**) puis des associations entre nouveaux et/ou anciens médicaments antipaludéens (**Vaidya et al ., 2000**).

En tant que pays tropical, Madagascar n'est non plus épargné. Le paludisme représente une des maladies épidémiques les plus mortelles : il a fait ravage en 1980, qui a fait éruption sous une forme chronique et à répétition (**Jeanne, 2000 ; Jambou et al ., 1998**). Beaucoup d'échecs thérapeutiques ont été enregistrés et commencent à se faire sentir à la suite d'un traitement à la dose O.M.S. de la chloroquine seule (**Randrianariveoljosia et al ., 2000**). Pour les Malagasy, à défaut des médicaments antipaludiques suite à une crise économique et politique de l'époque, les gens de la campagne traitent le paludisme par la décoction de plantes seule ou en association avec

de doses infra thérapeutiques d'antipaludéens de la pharmacie, en particulier la chloroquine (**Capuron et al ., 1966**). De ce fait, il a été constaté qu'effectivement, Madagascar dispose d'une ressource potentielle (**Rasoanaivo et al ., 1992 ; Boiteau, 1979 ; Razafimahefa et al ., 1979**). Par sa diversité floristique unique au monde à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. De cette source, des médicaments efficaces pourraient être puisés. C'est la raison pour laquelle l'objectif de ce travail a été orienté vers la recherche des médicaments antipaludiques d'origine végétale. Cet objectif est double : à côté de l'exploration de la flore de Madagascar il y a aussi le développement de médicaments antipaludéens potentiels pour des essais cliniques.

Je rappelle que le but ultime de mes travaux scientifiques est de contribuer à la recherche et au développement des médicaments antipaludiques issus de la médecine traditionnelle.

A. ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES

En une année qui suit mon intégration au sein du Laboratoire de Pharmacologie Parasitaire de l'IMRA, le premier fruit de la recherche du laboratoire a été la découverte des bisbenzylisoquinolines 7-O-demethyltetrandrine et limacine, isolées respectivement de *Strychnopsis thouarsii* Baill. et *Spirospermum penduliflorum* Thou.. Elles ont montré un potentiel effet antiplasmodial *in vitro* hautement intéressant avec des valeurs de CI_{50} presque similaires. Il a été démontré que la stéréochimie des configurations C-1 et C-1' joue un rôle capital sur l'effet potentialisateur de la chloroquine de ces composés (**Ratsimamanga et al ., 1992**). Le second résultat a été issu de *Hernandia voyroni* qui a été utilisée dans la médecine traditionnelle comme un adjuvant de la chloroquine à Madagascar. Des extraits alcaloïdiques neutres et basiques de cette plante ont été évalués pour leur activité antipaludique intrinsèque *in vitro* et leur action potentialisatrice de la chloroquine contre la souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum*. Le fractionnement bio guidé a clairement démontré que l'activité antipaludique intrinsèque et l'action potentialisatrice de la chloroquine ont été localisées dans l'extrait polaire d'alcaloïde (**Ratsimamanga et al ., 1994a**). Trois nouveaux alcaloïdes dimères isoquinoléiques (Herveline A, B et C) avec des moitiés pavine et benzyl-tetrahydroisoquinoléine ont été isolés de l'extrait d'alcaloïde brut de *Hernandia* (= *Hazomalania*) *voyroni* Jumelle. Tous les trios ont une activité antiplasmodiale *in vitro* mais deux seulement renforcent l'efficacité *in vitro* de la chloroquine d'une manière concentration dépendante (**Ratsimamanga et al ., 1994b**). Une recherche approfondie avec le *Hernandia voyroni* a conduit vers l'isolement de nouvelle pavine-benzyltetrahydroisoquinoléine (pavine-BTIQ) dimère, la herveline D ensemble avec herveline A, cinq alcaloïdes aporphines, deux alcaloïdes morphinanes, et leur précurseur biosynthétique, *i.e.*, le BTIQ (S)-réticuline. Les hervelines A à D ont une activité intrinsèque *in vitro* antipaludique modérée mais exercent de différents effets partant de synergie pour herveline B et herveline C vers un simple effet additif pour herveline A, et antagonisme pour herveline D lors de l'évaluation de la combinaison avec

la chloroquine et il a été confirmé *in vivo* pour les havelines A et B (**Rasoanaivo et al ., 1998**). Au cours de ces études d'exploration, nous avons pu faire une découverte importante. Généralement, un composé efficace en synergie avec d'autres médicaments démontre sa propre activité antipaludique intrinsèque mais certains alcaloïdes exercent seulement un effet potentialisateur de la chloroquine. C'était le cas avec l'extrait brut d'alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* Gilg & Busse, utilisée empiriquement comme adjuvant de la chloroquine dans les remèdes traditionnels Malagasy. Ces alcaloïdes sont complètement dépourvus d'activité antipaludique intrinsèque *in vitro* et *in vivo*. Par contre, une fois combinés avec la chloroquine à des concentrations plus faibles que leur CI₅₀, ils renforcent remarquablement l'efficacité *in vitro* de beaucoup de médicament synthétiques contre la souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FCM29/C₁). Ils potentialisent aussi l'activité *in vivo* de la chloroquine, activité contre une souche résistante de *Plasmodium yoelii* (chez la souris). Après séparation par distribution à contre courant de l'extrait d'alcaloïdes totaux, deux produits quantitativement majoritaires ont été isolés : la strychnobrasiline et la malagashanine. Elles sont dépourvues d'activité antipaludique intrinsèque et ne sont pas cytotoxiques, mais exercent une action potentialisatrice *in vitro* de l'effet de la chloroquine (**Rasoanaivo et al ., 1994**). C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour approfondir l'activité propre de ces alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes*, en développant en même temps une approche intégrée pour la recherche des médicaments antipaludiques à partir des plantes médicinales.

En s'inspirant des résultats des travaux scientifiques décrits dans les articles parus dans des revues et des journaux internationaux puis des communications internationales, je vais expliquer dans cette partie du manuscrit les démarches que nous avons adoptées ainsi que ma participation à plus d'une décennie de recherche et de développement de médicament d'origine végétale : à savoir l'approche scientifique vers le fractionnement bio guidé en mettant en exergue les évaluations pharmacodynamiques ensuite les études des paramètres pharmacocinétiques et le métabolisme de quelques principes actifs isolés des plantes médicinales Malagasy impliquées dans la lutte contre le paludisme. L'exemple concret est la malagashanine, isolée de *Strychnos myrtoïdes* Gilg & Busse - Loganiaceae, dont un brevet a été déposé le 2 mai 2002 pour protéger ses possibles dérivés. Mais avant d'entamer le vif du sujet, parlons un petit peu de la maladie « le paludisme » qui est le centre d'intérêt de ce travail.

B. PALUDISME

Le paludisme est une maladie très ancienne qui aurait dû faire souffrir l'homme depuis l'époque de la préhistoire (**MacConnell, 2002**). Cette maladie est appelée aussi malaria qui vient du mot italien *mala aria* et qui signifie "*mauvais air*". Etymologiquement, le mot "paludisme" vient du latin "*palus*" ou "*paludis*", qui veut dire "marais". Ainsi, à l'origine, le paludisme a été défini comme la maladie des régions chaudes et marécageuses (**Larousse, 2002**). Mais à la suite de la découverte de l'agent pathologique et de son vecteur, le paludisme a été défini comme une maladie parasitaire due à un hématozoaire (parasite vivant dans les globules rouges ou les hématies du sang) appelé *Plasmodium*.

C'est une maladie épidémique transmise par la femelle du moustique appelé *Anopheles* (**National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases, 2004**). Quatre espèces de *Plasmodium* affectent la santé humaine : *falciparum*, *vivax*, *malariae* et *ovale* (**Cloudsley-Thompson, 1976 ; Collins et al. , 1995 ; Pennisi, 2001 ; Tishkoff et al. , 2001**).

Cette épidémie demeure l'une des maladies infectieuses les plus importantes et les plus dévastatrices du monde (**Lemke, 2002 ; Sanon et al. , 2003**). En 1994, l'Organisation Mondiale de la Santé a statué sur la situation du paludisme dans le monde et déclarait que le risque de paludisme existait à des degrés divers dans 100 pays et territoires. Sur les 92 pays et territoires, il y avait transmission du paludisme à *Plasmodium falciparum* et chez les 8 pays, uniquement transmission de *Plasmodium vivax*. Les estimations de la population exposée au risque du paludisme dans ces 100 pays et territoires d'endémie sont très variables du fait de la modification de l'environnement et d'une mobilité accrue de la population. A cette époque, il a été estimé que 2,3 milliards de personnes, c'est-à-dire 41% de la population mondiale, vivaient dans des zones où existait un risque de paludisme (**W.H.O., 1997**). Il a été constaté que le *Plasmodium falciparum* est la forme la plus commune et la plus mortelle des contraintes malariques humaines, qui est responsable environ de 95% de malaria dans le monde entier et a un taux de mortalité de 1 à 3%. Selon toujours l'Organisation Mondiale de la Santé, il y a 300 à 500 millions de cas cliniques de malaria tous les ans et que 1,5 à 2,7 millions en meurent (**O.M.S., 2002**).

Chez l'homme, le paludisme est un des plus importants problèmes de santé pour le peuple habitant les régions tropicales et subtropicales dans le monde (**Tona et al. , 2004**). Près de un tiers de la population mondiale est exposé quotidiennement au sérieux risque de contracter le paludisme (**Rogers et Randolph, 2000**). Considérant que près de 50 millions de grossesses se produisent dans des secteurs endémiques de malaria chaque année, dont plus de la moitié se trouvent en Afrique sub-Saharienne (**Steketee et al. , 2001**) et que l'état de grossesse minimise l'immunité contre la malaria et augmente la susceptibilité en cas de maladie clinique grave (**Brabin, 1983 ; MacGregor, 1987**), le groupe de population le plus vulnérable est celui des femmes enceintes où la malaria est associée à la mortalité et à la morbidité significatives pour la mère et le fœtus (**Dafallah et al. , 2003 ; MacGregor et al. , 1983**). Un autre groupe de population cible aussi est celui des enfants : chez les pays sub-sahariens, parmi les deux à trois millions de décès par an par le paludisme dans le monde (**W.H.O., 1999**), il est estimé approximativement entre un à deux millions d'enfants de moins de cinq ans succombent après avoir contracté cette maladie (**Snow et al. , 1999 ; Vangapanduy et al. , 2004**).

Le paludisme reste jusqu'à maintenant un sérieux problème de santé publique pour la plupart des pays tropicaux (**MacConnell, 2003**) et même dans les pays occidentaux pour ses citoyens qui passent des vacances dans des régions à risque (**Grant Dorsey et al. , 2000**).

Cette pandémie fait ravage quant au nombre de morts enregistrées chaque année dans le monde entier. Une des complications rencontrées lors du traitement de cette maladie est le développement de la résistance du *Plasmodium falciparum* ensuite l'apparition des souches plasmodiales multi résistantes.

Le problème mondial du traitement du paludisme en général a commencé depuis la découverte de la chloroquine qui a été considérée à l'époque comme le seul et l'unique médicament miracle pour éradiquer le paludisme dans le monde (programme O.M.S.). Son intense vulgarisation a conduit vers l'utilisation non contrôlée des couches populaires. Tout le monde a été tellement emballé par cette découverte que la constatation du dégât a été trop tardive car cette monothérapie a été l'une des raisons ou des sources principales de l'apparition et de la dispersion des souches plasmodiales chloroquino-résistantes (**Payne, 1998**). C'est la raison pour laquelle la combinaison médicamenteuse a été considérée comme partie intégrale d'une approche thérapeutique pour le contrôle du paludisme dans le but de retarder ou à la limite de prévenir le processus de la résistance (**Ralamboson, 1964**).

A Madagascar, peu de données sont disponibles quand aux statistiques exactes de la situation globale de paludisme de la grande île, seules les publications sur l'étude épidémiologique et la lutte contre le paludisme effectuées aux différentes régions de Madagascar sont consultables pour tout public (**Jambou et al. , 1998 ; Blanchy et al. , 1993**). Mais, selon la statistique observée et disponible dans les archives du Ministère de la Santé, après les maladies des voies respiratoires et celles du tube digestif, le paludisme est la troisième maladie mortelle à Madagascar, surtout chez les enfants.

La malaria est la maladie parasitaire la plus répandue à Madagascar en termes de morbidité et mortalité, avec les 15.000 décès environ et 630.000 cas tous les ans selon les données statistiques du département de la commande de malaria du ministère de la santé (**Willcox et autres, 2004**).

En effet, dans le cas de Madagascar, le paludisme demeure aussi l'un des principaux problèmes de santé publique. Pour cette maladie, **Rakotonjanabelo (1995)** a décrit que la majeure partie du faciès éco épidémiologique du continent Africain est trouvée sur cette grande île en raison de sa diversité géo climatique. Ceux-ci incluent le faciès subéquatorial sur la côte orientale, le faciès tropical sur la côte occidentale, le faciès tropical de haute altitude au centre et le faciès subdésertique dans le sud. La malaria est même importée vers quelques zones habitées situées au-dessus de 1 500 m d'altitude et vers les centres des grandes villes.

En terme de lutte antipaludique, depuis sa découverte en 1945 à Madagascar, la chloroquine (un alcaloïde 4-aminoquinoléine) a été utilisée pour prévenir et pour traiter le paludisme (**Deloron et al ., 1985**). Malgré tout, il a émergé vers les années 1980s comme la maladie la plus dévastatrice (**Pearse, 1897**). A cette époque, dans certaines régions occidentales de l'île (par manque ou insuffisance en médicament mais par grande fidélité à la phytothérapie traditionnelle), il a été découvert efficace la prise d'une dose unique d'un ou de deux comprimés de la chloroquine combinée avec la décoction de l'écorce de tige de certaines plantes (**Capuron, 1966 ; Rasoanaivo et al ., 1992**). Ceci a été une indication au préalable que la décoction pourrait renforcer l'effet de la chloroquine et par conséquent une possibilité de reverser la chloroquino-résistance du parasite.

Telles sont les quelques pertinentes réflexions lues dans des publications ou des journaux scientifiques publiés lors de ces dernières décennies résumant les problèmes causés par le paludisme sur la santé de l'homme. Cette pandémie fait ravage quant au

nombre de morts enregistrées chaque année dans le monde entier : les chiffres entre 300 à 500 millions de cas cliniques et 2 à 3 millions de décès par an apparaissent parfois. Ces articles évoquent toujours que : globalement, la malaria agresse presque la moitié de la population du monde. Elle est l'une des maladies les plus sérieuses affectant près d'un demi milliard de personnes et sur ces centaines de millions de cas observés, cette maladie tue des millions de personnes par an ; c'est-à-dire qu'un pourcentage non négligeable de la population mondiale est affecté. Les femmes enceintes et les enfants de moins de cinq ans sont les plus victimes de cette affreuse maladie.

D'autres auteurs penchent sur la question et discutent. **Wellems et Plowe (2001)** disaient que le développement de la chloroquine comme drogue antimalarique et l'évolution subséquente du *Plasmodium* résistant à cette drogue a eu des impacts principaux sur la santé publique globale de la population humaine du 20^{ème} siècle. L'élévation rapide du niveau de résistance des parasites aux drogues actuellement disponibles est à l'origine de ces millions de décès par an (**Opsenica et al. , 2003**). Les nombres montent toujours puisque les antimalariques disponibles telles que la chloroquine (un des médicaments les moins chers sur le marché) et la sulfadoxine/pyriméthamine perdent de plus en plus leur efficacité due à la diffusion des contraintes de parasites résistants. L'apparition de cette résistance des parasites à la plupart des antimalariques médicalement utilisés par les paludéens est une question de grand souci et rend nécessaire la recherche de nouveaux et efficaces agents antimalariques (**Gokhale et al. , 2003**). En effet, les victimes du paludisme du monde entier ont un besoin pressant de nouveaux antipaludiques (**Ortmann et al. , 2003**).

Consciente de cette situation catastrophique et concernée directement par le problème, la collaboration entre le Laboratoire de Pharmacologie Générale & Pharmacocinétique (Faculté des Sciences – Département de Physiologie Animale de l'Université d'Antananarivo) et l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (Fondation Albert RAKOTO-RATSIMAMANGA) a été mise en place. Elle a choisi le thème de recherche sur le paludisme et voudrait apporter leur contribution pour résoudre ce problème par la recherche et le développement de médicament antipaludique. Telle est la base du choix de sujet de la présente étude, abordons maintenant les approches pour sa réalisation.

C. PLANTES MÉDICINALES

Il est cité dans un vieux livre que « les arbres poussant dans un endroit sont largement suffisants pour subvenir aux besoins quotidiens de la population vivant aux alentours ».

1. Choix de l'étude des plantes médicinales

Partant de cette philosophie, quand on a voulu participer à la résolution du problème de santé publique dans le pays, pour réaliser le présent travail, il nous est arrivé à l'esprit de se re-alimenter à la source.

Le choix d'explorer le monde végétal ou la flore, pour découvrir des molécules présentant un profil convenable, est basé sur un réflexe normal et paraît une logique scientifique. Car, fallait-il rappeler la chose frappante dans l'historique du traitement du paludisme (**Andrade-Neto et al. , 2003**), le remède a été découvert avant même de connaître ou de savoir l'origine de la maladie, en d'autre terme, le médicament antipaludique a été découvert avant d'identifier l'agent causal (**Desowitz, 1991**). Ce remède est un extrait de plante d'où a été isolée la molécule active considérée comme l'un des médicaments efficaces pour traiter le paludisme grave en milieu hospitalier (**Tran, 1996**).

Cette partie décrit les étapes passées pour choisir et identifier la plante à étudier.

2. Compilation d'informations

Dans le monde entier, différentes manières ont été abordées afin d'explorer, d'exploiter et de traiter les informations concernant le paludisme et l'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle. Pour s'y inspirer, quelques exemples sont cités ci-après :

En ethnobotanique : acquérir la connaissance populaire (**Ajaiyeoba et al. , 2003**) ;

Connaître la maladie et ses symptômes : état fébrile, fièvre, ... (**Andrade-Neto et al. , 2003**) ;

Noter les informations clés après interviews des herboristes. Par exemple, ceci a conduit à la rédaction d'un document pour la gestion traditionnelle de la malaria en Ethiopie. Les perceptions de la cause et des symptômes de la malaria, l'utilisation des plantes, leur préparation et administration ont été enregistrées, interviewant des guérisseurs qui traitent la malaria avec les drogues de fines herbes (**Gedif et Hahn, 2002**) ;

Savoir les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle (**do Ceu de Madureira et al. , 2002**) ;

Fouiller dans la médecine traditionnelle et les plantes médicinales pour traiter les maladies courantes (**Sanon et al. , 2003**) ;

Sélectionner les plantes qui ont été à la base des informations et des enquêtes ethnobotaniques existantes avec les communautés locales (**Muregi et al. , 2004**) ;

Des plantes, souvent citées par les praticiens traditionnels et pas chimiquement étudiées, devraient faire l'objet d'un criblage antiplasmodial. Ainsi, établir un programme de criblage pour vérifier l'utilisation traditionnelle des remèdes de fines herbes contre la malaria (**Gessler et al. , 1995 ; Pinn, 2001**).

Cibler les plantes employées dans la médecine folklorique pour traiter la fièvre/malaria mais toxiques pour les larves de crevettes (**Addae-Kyereme et al. , 2001**) ;

Identifier les plantes employées habituellement par les guérisseurs traditionnels pour le traitement de la malaria (**Mustofa et al. , 2000**).

Issues de la connaissance sur les produits naturels, beaucoup de plantes sont employées à l'heure actuelle comme sources de produits pharmaceutiques. Comme

ingrédients des remèdes traditionnels, elles sont de valeur importante dans la découverte de nouveaux médicaments. Plusieurs produits naturels isolés de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle ont un effet antiplasmodial efficace et représentent des sources potentielles de nouvelles drogues antimalariques : l'artémisinine, le taxol et le camptothecin sont des exemples des produits naturels qui subissent le développement clinique et commercial (**Phillipson, 1994**). Le succès de la quinine dans le traitement de la malaria pendant beaucoup de décennies, et plus tard de l'artémisinine et de ses dérivés pour le traitement de la malaria cérébrale, a tourné l'attention des industriels en tant que sources potentielles des drogues antimalariques (**Wright et Phillipson, 1990 ; Transitoires, 1998**).

3. Exploration de la flore de Madagascar

Il est mondialement connu que la flore, la faune et même les ressources minérales de Madagascar ont un caractère très spécifique. Près de 80% des espèces végétales existant dans l'Île lui sont endémiques et ne se retrouvent nulle part ailleurs. Dans les diverses régions de Madagascar, une longue expérience a été accumulée par des générations d'hommes vivant au contact étroit avec la nature et qui ont appris à utiliser ces ressources pour soigner leurs maux (**Rasolofo, 1987**).

Effectivement, Madagascar dispose d'une diversité floristique unique au monde, à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Cette tradition est très marquée dans les zones rurales, en particulier les régions très reculées, où des pratiques socioculturelles jouent encore un rôle important dans la vie au quotidien des villageois et que l'accès aux médicaments pharmaceutiques est très limité. En milieu rural malgache, plus de 80% de la population appliquent la médecine traditionnelle pour traiter différentes affections, y compris le paludisme. Ainsi, la richesse floristique malgache est explorée car elle pourrait constituer une ressource inestimable en terme de médicaments potentiels (**Rasoanaivo et al. , 1996**). Les premières informations ont été collectées par l'équipe de recherche scientifique de l'IMRA vers les années 1990s (**Rasoanaivo et al. , 1992**).

En effet, à Madagascar, les gens vivant particulièrement dans la campagne traitent le paludisme par automédication. Mais une chose est sûre en ce qui concerne l'un des moyens adoptés par les Malagasy pour lutter contre ce fléau : les plantes sont à la base des préparations de remèdes antipaludiques, prises en décoction seule ou en association aux doses infra-thérapeutiques (un ou deux comprimés) de chloroquine (**Capuron, 1966**). C'est la raison pour laquelle, la sélection des plantes pour les études de l'activité antiplasmodiale *in vitro* et l'effet potentialisateur vis-à-vis de la chloroquine a été basée sur leur utilisation en préparations antipaludiques et/ou adjuvantes de la chloroquine dans la médecine traditionnelle de Madagascar. Mais l'acquisition des données ou d'information lors des enquêtes ethnobotaniques se heurte à de multiples obstacles, entre autres :

Le changement du nom de la maladie d'une région à l'autre et la confusion sur la description de la maladie, au risque de la prendre pour d'autres maladies de mêmes symptômes (**Pearse, 1897 ; Beaupez, 1901 ; Andrianjafy, 1902**). Par conséquent, rien

n'est vraiment sûr en ce qui concerne le mode de traitement, il faut acquérir toute la confiance totale des tradipraticiens pour dévoiler les secrets de cette médecine ancienne ou empirique ;

Le manque de documentation par écrit (manuscripts) pour tout public car la majorité de toutes connaissances traditionnelles se transmettent de bouche à oreille de génération en génération. Ainsi, elles ont toutes les chances de se perdre en cours de temps et au pire se déviaient vers une utilisation erronée. Par exemple, le paludisme a existé depuis le XVII-ème siècle (**Flacourt, 1642**) mais le premier document qui parlait de cette tragédie a été écrit presque deux centaines plus tard (**Havet, 1827**). La consultation des banques de données ou de documentation étrangère fournit peu d'information sur les plantes endémiques ou typiques de Madagascar, on se contente tout simplement des informations disponibles sur des plantes du même genre, d'espèces voisines ou de la même famille.

Au cours de la présente étude, le choix des plantes endémiques ou typiques a été voué à la biodiversité floristique de Madagascar qui lui conférerait une diversité chimique et par conséquent biologique. Car il a été constaté que l'activité antipaludique d'un produit, soit son effet direct sur le parasite soit celle potentialisant les molécules antipaludiques de référence, est fortement liée à sa structure moléculaire et à sa propriété physico-chimique : les composés des plantes extraits par l'acétate d'éthyle sont plus efficaces que ceux solubles dans la partie aqueuse. Une autre révélation est capitale : à la suite du fractionnement bio guidé effectué sur les extraits bruts hydro alcooliques des plantes indiquées autrefois dans la préparation des remèdes antipaludiques, les résultats des tests biologiques ont démontré que l'activité concernée a été localisée dans les fractions alcaloïdiques (**Ratsimamanga et al ., 1994 ; Ratsimamanga et al ., 1992 ; Rasoanaivo et al ., 1994**).

Ainsi, les démarches adoptées lors de la réalisation de cette recherche ont de multiples objectifs :

- Apporter une preuve scientifique quant à l'efficacité des plantes utilisées empiriquement pour traiter le paludisme ;
- Aider à expliquer le mode d'action des produits antipaludiques ;
- Lutter contre et comprendre en même temps le mécanisme de la résistance médicamenteuse.

D. TESTS DE CHIMIOSENSIBILITÉ

1. Méthodes

Des méthodes expérimentales ont été mises au point et publiées pour estimer le niveau de sensibilité des parasites vis-à-vis des produits chimiques, quelques soient leurs origines.

Généralement, il existe actuellement plusieurs tests *in vitro*, tels que le :

- Micro test de Rieckmann, adopté par l'O.M.S. (**Rieckmann et al. , 1978**) ;
- Test isotopique de Desjardins (**Desjardins et al. , 1979**) ;
- Semi micro test isotopique de **Le Bras et al. (1983a,b ; 1984)** ;
- Test colorimétrique (**Green et al. , 2000**);

- Investigation de l'interaction avec l'hémine par la méthode physique combinant la spectrophotométrie à Ultraviolet/Visible et de High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector/Mass Spectrometry (HPLC/DAD/MS) [**Bilia et al. , 2002**] ;

- Flow cytometry (**Schulze et al. , 1997 ; Contreras et al. , 2004 ; Saul et al. , 1982b**).

Ces sus citées méthodes diffèrent légèrement sur le volume par cupule, l'hématocrite, le nombre de cupules par dose, la durée de l'incubation, le mode de suivie de la croissance parasitaire et d'interprétation des résultats, mais toutes ces méthodes donnent des résultats corrélés (**Le Bras et al. , 1987 ; Contreras et al. , 2004**).

Ces tests mesurent et quantifient la capacité de doses croissantes d'un antipaludique d'inhiber la multiplication des parasites du stade anneau et trophozoïte et, donc, la formation des schizontes. L'activité antipaludique d'une molécule est appréciée en fin de test, soit par la lecture microscopique (numération des schizontes sur goutte épaisse et détermination de la première dose de molécule qui empêche toute formation des schizontes), soit par l'inhibition de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée (un précurseur de l'acide nucléique). Pour cette étude, la variance isotopique du semi-microtest est utilisée pour tous les tests *in vitro* de chimiosensibilité car il a été démontré que l'incorporation de l'isotope est une bonne mesure de la croissance de *Plasmodium falciparum* (Chulay et al., 1983) et la corrélation entre les deux modes d'interprétation est significative (Le Bras et al., 1983).

2. Détermination des effets inhibiteurs

Pour les tests antipaludiques *in vitro* avec les extraits des plantes, il n'y a pas d'échelle ou de norme standard pour définir une concentration ou une dose efficace. Le plus souvent, chaque laboratoire voire même chaque chercheur, applique son propre seuil d'efficacité (**Rasoanaivo et al. , 2004**). Mais il y a une chose, l'unité des valeurs des concentrations efficaces des antipaludiques de référence actuellement disponibles est de l'ordre de nanogramme (ng) ou de nanomolaire (nM). Ainsi, les extraits de plantes considérés comme actifs sont ceux qui se rapprochent de cet ordre.

Si on regarde l'activité antipaludique de la malagashanine ($CI_{50} = 183,89 \pm 10,41 \mu\text{M}$) et de la strychnobrasiline ($CI_{50} = 48,07 \pm 9,32 \mu\text{M}$) par rapport à celle de la chloroquine (CI_{50} respectives de $213,86 \pm 31,1 \text{ nM}$ et $50,1 \pm 5,49 \text{ nM}$), le rapport entre les valeurs des CI_{50} est de 1 000. Dans cette condition, on peut dire que la malagashanine et la strychnobrasiline sont loin d'être actives.

L'effet de ces alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* est plutôt dû à une surcharge de molécules dans les puits pendant les tests. D'ailleurs, si on compare les valeurs des CI_{50} de l'activité antipaludique et celles de l'activité cytotoxique, le rapport est tout simplement de 10. Donc cet effet antipaludique est à la limite de la cytotoxicité.

Le rapport entre la concentration et l'effet d'un composé (ou d'une association des composés) est habituellement représenté sur le système de coordonnées classiques en pharmacologie, à savoir le logarithme des concentrations croissantes du composé en abscisse et la progression arithmétique de l'effet en ordonnée. Cette méthode décrit typiquement une courbe sigmoïde, qui a l'inconvénient d'une analyse mathématique plus longue et compliquée.

Pour faciliter l'analyse du rapport concentration (ou dose) – effet, la méthode de transformation en régression linéaire du logarithme de la dose ou concentration sur le probit d'effet a été adoptée, une technique appliquée par **Peters (1987)**, **Neti et Howell (2006)**, et l'O.M.S. (**Phillips et al ., 1990**). Cette méthode permet de linéariser la partie médiane de la courbe sigmoïde entre 5 - 10% et 90 - 95% de l'effet et de tracer la droite qui s'adapte le mieux aux points expérimentaux.

Mais par rapport à la vérification de l'activité potentialisatrice de l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes*, les molécules isolées de cet extrait (la malagashanine et la strychnobrasiline) ont été testées sur la combinaison *in vitro*.

3. Chimiosensibilité des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* sur les isolats de *Plasmodium falciparum* (données non détaillées dans ce manuscrit)

Observant cet effet potentialisateur des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* vis-à-vis de la chloroquine, un essai clinique double aveugle et randomisé a été réalisé à Ankazobe (sur la route nationale au point kilométrique 95 au nord-ouest d'Antananarivo, capitale de Madagascar, où la prévalence de la résistance à la chloroquine atteint les 30%) pour évaluer l'association chloroquine-phytomédicament (fraction alcaloïdique de *Strychnos myrtoïdes* titrée à 20% de malagashanine) chez des malades du paludisme. Un test antipaludique *in vitro* a été réalisé en parallèle sur les isolats collectés de ces patients. Les résultats ont montré que la plupart des isolats sont sensibles à la chloroquine et l'association n'a pas démontré d'effet synergique. Ceci confirme ce qui a été déjà observé auparavant. Quoiqu'il en soit, ce test *in vitro* nous a apporté une information importante : il y a une certaine coïncidence entre le taux d'échec thérapeutique à la chloroquine et celui des isolats démontrant une CI_{90} de la chloroquine supérieure à 100 nM. Ainsi, une nouvelle proposition a été discutée et avancée quant aux critères pour évaluer la chloroquino-résistance des souches plasmodiales.

Ainsi, la malagashanine serait un outil biochimique qui pourrait contribuer à la compréhension de la chloroquino-résistance et son inversion. Des dérivés de la malagashanine pourraient être aussi de médicaments potentiels pour l'inversion de la résistance quand elle est utilisée en association avec un médicament de composés quinoléiques, qui sont jusqu'à maintenant les antipaludiques les plus utilisés. Il mérite

d'être souligné, comme le *Cinchona sp.* (quinine) et l'*Artemisia annua* (artémisinine), que le *Strychnos myrtoïdes* (malagashanine) a son histoire dans les plantes médicinales en tant qu'adjuvant de la chloroquine avant même l'évènement de la relance des différentes approches sur l'inversion de la résistance médicamenteuse.

Si la malagashanine exerce un effet potentialisateur vis-à-vis de la chloroquine sur des souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*) à des concentrations plus faibles que celles indiquées pour une activité antiplasmodiale, elle seule n'a pas d'activité antiplasmodiale intrinsèque sur la croissance parasitaire. L'activité de la malagashanine inversant la chloroquino-résistance a été découverte suite à des études scientifiques des trois *Strychnos* de Madagascar dans le traitement de paludisme chronique. Une des raisons principales pour l'investigation de la malagashanine est l'observation des résultats positifs durant les essais cliniques préliminaires avec le décocté de l'écorce de tige de *Strychnos myrtoïdes* (**Ramialiharisoa et al. , 1994**). En tout cas, un effet synergique entre les différents constituants du décocté de cette plante n'a pas été bien défini lors de cette étude clinique, ces résultats justifient l'étude pharmacocinétique pré clinique chez les rats (**Rafatro et al. , 2000b**) regardant en même temps le mécanisme d'action de la malagashanine. Cette dernière est actuellement développée pour sa co-administration par voie orale avec la chloroquine dans le traitement thérapeutique de l'infection palustre. En plus, la caractérisation du profil pharmacocinétique de la malagashanine est hautement importante pour le développement de cet adjuvant d'avenir de la chloroquine.

4. Activité in vivo de la strychnobrasiline

Le contact direct strychnobrasiline et parasite (étude *in vitro*) rend cette molécule active (en renforçant l'action de la chloroquine). Son inefficacité une fois administrée chez un organisme vivant par voie orale pourrait s'expliquer de cette manière : la strychnobrasiline ne franchirait pas les différentes barrières biologiques pour atteindre sa cible intra érythrocytaire. Soit elle serait biotransformée en dérivée inactive, soit elle serait bloquée quelque part.

Une explication plus proche de la réalité c'est que cette molécule serait arrêtée en cours de route entre le point d'administration (lumière stomacale) et sa cible (milieu intra érythrocytaire). Ceci pourrait être dû à son caractère physico-chimique plutôt hydrophile que lipophile (**Rafatro et al. , 2000a**) l'empêchant ainsi à ne pas pouvoir franchir les barrières des membranes cellulaires ou interstitielles.

5. Chronothérapie in vitro

Les mécanismes physiologiques qui imposent le synchronisme de *Plasmodium falciparum* après plusieurs cycles chez son hôte demeurent inconnus (**Kwiatkowski et Greenwood, 1989**). Contrairement au développement du parasite *in vivo*, la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum* est asynchrone, tout en gardant la durée du cycle de 48 heures dans les conditions optimales.

Deux méthodes ont été proposées pour synchroniser la culture. La première repose sur la séparation des schizontes des autres stades intra érythrocytaires et érythrocytes non parasités grâce à la sédimentation accélérée des derniers dans la gélatine, la silice colloïdale ou le Percoll (Dluzewski, 1984; Reese et al., 1979; Saul et al., 1982a; Tritton et Yee, 1982). La deuxième méthode de synchronisation consiste à provoquer une lyse de tous les stades érythrocytaires à l'exception de formes anneau, en traitant les érythrocytes parasités par le D-sorbitol isotonique à 5% (Lambros et Vanderberg, 1979).

Au laboratoire, ces deux méthodes sont combinées en appliquant la méthode de synchronisation par le plasmagel[®] (gélatine 3% dans du NaCl 9‰ – Laboratoire Roger Bellon, France) proposée par Jensen (1978).

6. Chronothérapie in vivo

Le caractère cyclique des accès palustre et les particularités pharmacocinétiques des médicaments antipaludiques permettent une approche chronothérapeutique pour le traitement de cette maladie. Pour éprouver cette hypothèse, un modèle expérimental murin est appliqué avec l'espèce hautement synchrone, le *Plasmodium vinckei petteri*.

Le *Plasmodium vinckei petteri* abrégé en *Pvp* (clone 279 BY, **Caillard et al. , 1992**), un hématozoaire de rongeurs, est isolé d'un animal appelé *Thamnomys rutilans* capturé en République d'Afrique Centrale en 1969. La souche a été sélectionnée pour réaliser ce même type d'étude à cause de sa haute croissance synchrone lors de ses premiers cycles de développement (**Cambie et al. , 1991**). Un autre avantage, quand cette souche est utilisée, est le fait que la schizogonie survient 24 heures après l'inoculation avec du sang parasité congelé (**Montalvo-Alvarez et al. , 1988**), et le rythme des différents stades de développement du parasite pourrait être déterminé avec précision. La synchronicité est renforcée par une congélation et décongélation rapide du sang parasité qui éliminerait la plupart des formes de parasites autres que les mérozoïtes.

Il existe deux types de méthodes appliquées à ce genre de test selon la manière de traiter les souris impaludées, soit avant soit après qu'elles auraient pu atteindre 1% de parasitémie. Le protocole choisi, pour cette étude, est celui où les souris sont prétraitées.

Il a été observé lors de l'étude de l'activité antipaludique intrinsèque *in vivo* que les molécules isolées, les soi-disant principes actifs, ne sont pas actives. C'est la raison pour laquelle l'activité de l'extrait brut d'alcaloïdes totaux a été profondément étudiée et que nous aimerions vérifier si l'association d'alcaloïdes totaux donne un meilleur résultat. D'autant plus, c'est le seul modèle expérimental disponible au laboratoire pour l'étude de chronothérapie.

En effet, en temps normal, *i.e.* sans traitement, pendant la période de la schizogonie (Ho), les résultats de la numération parasitaire montrent qu'il y a plutôt une prédominance de la forme anneau (R), ceci est tout a fait normal car c'est à ce moment là que se passe le phénomène de séquestration des globules rouges contenant des parasites aux formes de trophozoïtes âgés (OT) et de schizontes (S) (**Cambie et al. , 1991**). Alors, la numération parasitaire et la détermination des formes prédominantes pourraient être faussées. Ceci devrait être pris en considération pour l'interprétation des résultats. C'est

ce phénomène incontrôlable qui a provoqué chez certaines souris un boum de parasitémie de telle sorte qu'au début du cycle d'observation, la parasitémie dépasse un petit peu le seuil voulu de 1%. Globalement, à ce début du cycle d'observation, la parasitémie moyenne de l'ensemble des souris impaludées et impliquées dans ces expériences est de $0,855 \pm 0,355\%$.

A la suite des séries d'expérience sur la chronothérapie avec la chloroquine seule à la dose unique de 2,5 mg/kg, les résultats montrent que ce médicament perturbe tout simplement l'évolution des différentes formes parasitaires au cours d'un cycle de développement. Cette perturbation est très marquée au moment où la forme parasitaire prédominante passe de trophozoïte moyen (MT) au trophozoïte âgé (OT). Cette perturbation est illustrée par la réduction temporaire du taux de parasitémie globale des souris traitées. A tout moment, à la fin d'un cycle de traitement de 24h, ce taux de parasitémie se trouve à la hausse, sauf pendant la période de perturbation maximale.

Quand l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes*, qu'on l'appelle par l'abréviation Sm, est administré seul à la dose de 100 mg/kg, à aucun moment du cycle le taux de parasitémie n'est du tout pas réduit.

Par contre, en associant cet extrait d'alcaloïdes avec la chloroquine, la suppression parasitaire constatée est considérable. Cet effet est très remarquable au moment où la chloroquine provoque une perturbation optimale. Il est même observé que cette association médicamenteuse provoque une disparition totale de toutes les formes parasitaires chez les souris traitées. A la fin d'un cycle de traitement, une clairance parasitaire est mise en évidence.

Ainsi, les résultats obtenus argumentent d'avantage l'intérêt d'associer l'extrait d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes* à la chloroquine pour supprimer au maximum la croissance parasitaire.

E. PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES

Au cours de l'étude pharmacocinétique, le travail consiste d'abord à développer une méthode spécifique de chromatographie liquide à haute performance pour quantifier la malagashanine dans le plasma, la bile et l'urine (**Rafatro et al. , 2000b**) avant d'étudier son profil pharmacocinétique. Une étude cinétique a été voulue faire au départ mais compte tenu de la quantité très faible de la malagashanine excrétée dans l'urine, seule l'étude de la fraction excrétée reste possible.

L'objectif de cette étude consiste à mettre au point une méthode d'analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour séparer, isoler et quantifier la malagashanine et la strychnobrasiline à partir des extraits bruts d'alcaloïdes totaux de *Strychnos myrtoïdes*, puis de valider cette méthode d'analyse par des études statistiques basées sur une reproduction intra- et inter- journalière, ensuite elle a été appliquée pour analyser ces alcaloïdes dans du liquide biologique (plasma, urine et bile).

Les points saillants de cette méthode CLHP sont :

- Il faut utiliser une colonne chromatographique spéciale pour produit basique et à phase inversée ;

- La méthode est simple, rapide et reproductible : comme phase mobile, l'acétonitrile préparé dans une solution aqueuse de tampon a été utilisé. Plusieurs échantillons peuvent être analysés dans une journée (une analyse chromatographique dure moins de 10 min) et la reproductibilité basée sur les études statistiques est fiable ;

- Elle a permis à une bonne séparation, sans interférence possible des pics, entre la malagashanine ou la strychnobrasiline avec son standard interne et ses multiples dérivées.

Rappelons que ces méthodes d'analyse par CLHP ont été appliquées à l'étude des paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes* (en particulier la malagashanine et la strychnobrasiline) chez les rats. Les conditions chromatographiques utilisées pour quantifier la malagashanine dans le plasma et l'urine ont été basées sur une légère modification de la méthode développée par **Biala et al. (1998)**. La méthode proposée est simple qu'un nombre large d'échantillons pourrait être analysé par jour. L'influence des paramètres chromatographiques sur le temps de rétention de la malagashanine a été étudiée en variant le pH de la solution tampon et la proportion de l'acétonitrile dans la phase mobile. Les conditions chromatographiques sélectionnées en utilisant la strychnobrasiline comme standard interne donnent une meilleure séparation entre la malagashanine, le standard interne et un métabolite non identifié de malagashanine avec une durée d'élution inférieure à 10 min. Les conditions de la CLHP (composition de la phase mobile, le pH de la solution tampon, le solvant d'extraction) ont été légèrement modifiées quand la codéine a été utilisée comme standard interne. La validation des paramètres de précision et d'exactitude suite à l'étude de variabilité inter et intra journalière sont en accord avec les indications formulées par le groupe d'experts durant la conférence sur l' « Analytical method validations : bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies » (**Shah et al. , 1992**).

En ce qui concerne l'étude du profile pharmacocinétique, la dose de malagashanine administrée chez les rats via les trois différentes voies, *i.e.* IV (rapide et perfusion lente), IP et PO, a été sélectionnée à la suite de la concentration plasmatique observée couvrant entre 10 ng/mL à 10 µg/mL.

Après injection IVR et une perfusion lente de 20 min, la concentration plasmatique de malagashanine décroît rapidement avec une demi-vie d'élimination apparente approximative de 30 min. Pour un rendement faible de malagashanine inchangée dans l'excrétion urinaire (inférieur à 5% de la dose IV injectée) et une excrétion biliaire négligeable, l'élimination de cet alcaloïde est essentiellement non rénale.

La clairance plasmatique de la malagashanine dans le milieu systémique est proche de 11 mL/min qui est plus importante que la vitesse du flux plasmatique du foie estimée à 4,7 mL/min pour un rat de 500 gr (**Colburn, 1988**). Selon les arguments rapportés dans la littérature, ceci indique qu'un mécanisme extrahépatique contribue à l'élimination de cet alcaloïde hors de l'organisme du rat (**Nelson et al. , 1988 ; Bhatti et al. , 1997**).

Après administration IP, la malagashanine est très rapidement et complètement absorbée : sa biodisponibilité absolue suite à cette voie d'administration est de 1,03

indiquant l'absence d'élimination pré systémique au niveau du foie. Suite à une administration *per os*, l'absorption de la malagashanine est aussi très rapide ($T_{\max} = 20-30$ min) mais est incomplète ($F = 0,62$). Comme rapportée dans les travaux antérieurs (**Rafatro et al. , 2000**), la malagashanine est soluble dans un environnement d'une solution aqueuse d'acide ($\log P = -1,7$; déterminé par un système de 1-octanol/tampon acétate de 0,1 M à pH 4,5) mais moins soluble dans un environnement aqueux neutre tel qu'au niveau de l'intestin grêle ($\log P = 2,3$; déterminé par le système 1-octanol/tampon phosphate de 0,1 M à pH 7,2). Ceci, selon **Arimori (1998a, b)**, pourrait limiter son absorption. Alternativement, et d'après les résultats similaires observés par **Kanerva (1998)**, la dégradation de la malagashanine dans le tractus gastro-intestinal et/ou le métabolisme pré systémique de l'intestin pourrait aussi expliquer sa biodisponibilité incomplète après dosage par voie orale. Suite à des administrations IP et PO de la malagashanine, les concentrations plasmatiques peuvent être quantifiées jusqu'à la 4^{ème} h et la phase terminale d'élimination plus lente pourrait être démontrée par la valeur approximative de la demi-vie relative de 2 h. La phase terminale d'élimination tardive n'est pas observée après une injection IVR ou une perfusion lente de la malagashanine, ceci peut être dû à la limite de sensibilité de la méthode de la CLHP, une telle hypothèse est avancée par **Han (et al. , 1998) et Lee (et al. , 1998)**. Cette plus lente phase terminale d'élimination, de toute façon, est associée à un taux moins de 5% de AUC totale et ceci n'est pas significatif pour le calcul de la clairance plasmatique de la malagashanine.

Un fait marquant a été aussi observé à la suite d'une administration par voie buccale de la malagashanine : elle est encore présente dans le sang huit heures après sa prise. Si c'est le cas chez les humains, cette observation justifie bien la prise trois fois par jour lors de son application en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme avec l'extrait de *Strychnos myrtoides*. En tout cas, chez les rats, l'administration *per os* de la malagashanine à une dose d'au moins 50 mg/kg permet d'entretenir la présence de la malagashanine dans le plasma pendant au moins huit heures.

Basées sur les résultats de ces études pharmacocinétiques chez les rats, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- la malagashanine est éliminée chez le rat par métabolisme ;
- sa clairance plasmatique du milieu systémique excède la vitesse du flux plasmatique du foie et son métabolisme extra hépatique est important ;
- sa demi-vie plasmatique terminale est courte (approximativement de 30 min) ;
- la biodisponibilité après administration IP est complète par contre suite à une administration par voie orale elle est seulement autour de 60%, et
- la malagashanine est modérément liée aux protéines plasmatiques.

Ces paramètres pharmacocinétiques de base de la malagashanine seraient utiles pour l'étude ultérieure de l'activité d'inversion de la chloroquino-résistance de cet alcaloïde de *Strychnos myrtoides*. La disparition rapide de la malagashanine du milieu plasmatique et son taux d'élimination faible (que ce soit dans l'urine ou dans la bile) suggèrent l'existence d'un système de séquestration de la malagashanine par l'organisme, cette voie mérite d'être éclaircie car elle pourrait expliquer la protection

apportée par la prise du décocté de cette plante (information obtenue lors des enquêtes ethnobotaniques sur l'utilisation de *Strychnos myrtoïdes*). Mais il est plus sûr, avec beaucoup de prudence quand même, de dire que la biotransformation de la malagashanine jouerait un rôle très important dans la forme d'élimination de cet alcaloïde.

F. MÉTABOLISME DE LA MALAGASHANINE

Lors de l'analyse de l'urine par CLHP, un pic est observé dans le chromatogramme de l'urine analysée qui a été collectée après administration en dose unique de la malagashanine chez le rat. Il a été considéré comme le pic d'un des métabolites de la malagashanine.

Ne connaissant pas encore et avant de connaître les structures chimiques des métabolites de la malagashanine, il a été envisagé de mettre au point une méthode chromatographique afin d'identifier la possibilité de la formation des dérivés conjugués ou non. Parce qu'il a été stipulé que les métabolites de phase I subissent très souvent des réactions de phase II par après et pourraient être excrétés d'une façon importante comme conjugués. Ainsi, la malagashanine a été incubée avec le mélange d'enzymes (glucuronidase et sulfatase), puis la solution d'incubation sera analysée par CLHP pour vérifier si les pics des métabolites n'augmentaient pas. Autrement dit, cette étude consiste à observer l'augmentation de la surface des pics de la malagashanine sur le chromatogramme d'analyse par CLHP après traitement des échantillons d'urine ou de bile avec le mélange d'enzyme.

En effet, au cours d'une telle analyse par CLHP utilisant une colonne à phase inverse, si la malagashanine deviendrait une forme conjuguée, sur le chromatogramme, son pic apparaîtrait avec un très court temps de rétention. Par conséquent, elle pourrait être éluée très tôt ou immédiatement après le front de solvant. Par contre, les métabolites non conjugués auraient un temps de rétention plus long (ils seraient élués très tard dans le chromatogramme) et que le mélange de ces deux formes (conjuguées ou non) de métabolites pourrait être aussi présent dans l'urine. D'où, le but de cette étude est de déterminer si ce métabolite est aussi présent sous forme glucurono- ou sulfo- conjugué.

A la suite d'une série d'expériences et d'analyses, après comparaison des différents chromatogrammes, aucune augmentation des surfaces de pic ni de la malagashanine ni d'autres produits n'a été constatée. Donc, sur les échantillons analysés, la malagashanine n'est pas du tout transformée sous forme conjuguée.

Alors, nous avons posé la question, quelles sont alors les structures chimiques des dérivés de la malagashanine et qui est(ont) le(s) responsable(s) de cette biotransformation ?

La pharmacocinétique, le métabolisme et l'excrétion de la malagashanine ont été étudiés chez les rats : après injection intraveineuse, il a été observé que la malagashanine disparaît rapidement du plasma et à la suite des analyses par CLHP effectuée sur les urines des rats traités, la malagashanine y a été faiblement excrétée.

Par contre, en analysant cette urine avec la méthode CLHP appliquée pour analyser la malagashanine, un grand pic et bien isolé a été observé. Le pic de ce produit sort avant celui de la malagashanine dans le chromatogramme. Puisque ce produit sortait sous forme de pic isolé sur le chromatogramme, il a été procédé aux collectes manuelles pour avoir des quantités nécessaires pures afin de réaliser d'autres études telle que de la validation de son analyse par CLHP.

Le produit en question a été envoyé aux chimistes du laboratoire pour élucider sa structure chimique et il s'avérait que c'était la forme N-déméthylée de la malagashanine.

Un métabolite a été observé dans l'urine du rat, lequel a été aussi l'un des principaux métabolites de la malagashanine isolés à la suite de l'une incubation de la malagashanine avec les microsomes hépatiques humains ou de rat. En plus, il est la forme quantitativement majoritaire de tous les métabolites de la malagashanine que ce soit dans l'urine ou dans les solutions d'incubation avec les microsomes. C'est la raison pour laquelle la N-déméthylmalagashanine a été choisie pour identifier l'isoenzyme responsable de la métabolisation *in vitro* de la malagashanine qui pourrait refléter la forme de biotransformation majeure *in vivo*.

Ainsi, à la suite de toutes investigations pharmacodynamique et pharmacocinétique, le mode de métabolisation de la malagashanine a été étudié pour identifier l'enzyme impliqué dans la formation de ses métabolites.

Dans le premier temps, des iso enzymes impliqués généralement dans la formation des métabolites N-déméthylés ont été ciblés. Pour ce faire, la quinidine et le diazépam ont été incubés avec les microsomes hépatiques en tant que substrats respectifs de CYP2D6 et CYP3A, le kétoconazole a été utilisé pour son activité inhibitrice spécifique des iso enzymes de CYP3A.

Alors, cette partie rapporte pour la première fois le mode de métabolisation *in vitro* de la malagashanine en présence de microsomes hépatiques humains et de rat. Il est observé que la malagashanine est métabolisée au moins en trois produits : la malagashanine N-déméthylée, hydroxylée et dimérisée. La N-déméthylation serait probablement la voie de biotransformation principale car la malagashanine N-déméthylée constitue plus de 95% de la quantité totale de tous les métabolites. Les métabolites de la malagashanine formés par les microsomes hépatiques, incluant les produits de N-déméthylation sont aussi observés dans la bile et l'urine des rats traités à la malagashanine. L'allure de la courbe de la cinétique de formation de la malagashanine N-déméthylée suit celle de Michaelis-Menten indiquant une équation d'un seul système d'enzyme catalytique.

Selon les travaux de **Ducharme et Farinotti (1996)**, des études *in vitro* limitées à des données préliminaires d'un essai clinique et des observations rapportent que les CYP3A et CYP2D6 sont des isoenzymes majoritaires affectés par ou impliqués en la métabolisation de la chloroquine. Des essais ont été effectués ici utilisant des substrats pour ces isoenzymes, tels que la quinidine et le diazépam. Aucune inhibition de la transformation de la malagashanine n'a été observée aux concentrations inhibitrices indiquées dans la littérature pour ces composés. Par contre, en incubant la malagashanine avec le kétoconazole, un inhibiteur spécifique et potentiel de CYP3A

Engels et al. , 2006), les résultats rapportent que le cétoconazole peut inhiber totalement d'une manière compétitive la formation de N-déméthylmalagashanine. Ceci montre que la formation de N-déméthylmalagashanine est fortement liée à l'activité de CYP3A mais sur des sites catalytiques différents que ceux de la quinidine et du diazépam. En effet, l'isoforme CYP3A est impliqué dans la N-déméthylation de la malagashanine aux concentrations du substrat choisies dans cette étude. Dans ce cas, ces résultats montrent que le kétoconazole co-incubé avec la malagashanine dans les suspensions de microsomes hépatiques humains ou de rat inhibe la voie principale de la biotransformation de la malagashanine. Par conséquent, cet isoforme pourrait intervenir dans le rehaussement ou la diminution de l'effet de la malagashanine lors d'une interaction médicamenteuse, dans le cas où le mode de biotransformation des deux molécules (telle que l'association MG/CQ) serait catalysé par le même isoenzyme. Ainsi, l'isoforme CYP3A pourrait largement participer dans l'effet synergique de l'association CQ/MG.

Comme la malagashanine est transformée en son dérivé N-déméthylé et que ce métabolite exerce autant d'activité potentialisatrice vis-à-vis de la chloroquine que sa molécule mère (résultats non présentés ici) sur les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum* (FcM29), ainsi lors du traitement d'une infection palustre chez un patient, la co-présence chloroquine / malagashanine / N-déméthylmalagashanine pourrait aider la chloroquine à retrouver son activité d'origine. La malagashanine pourrait en même temps jouer un rôle de pro drogue dans ce cas. Ce mécanisme pourrait expliquer la remarquable activité *in vivo* de la malagashanine (qui a un avenir très prometteur dans le monde pharmaceutique) sur l'inversion de la résistance justifiant son association avec la chloroquine pour constituer un médicament potentiel dans le but de lutter contre la résistance médicamenteuse.

G. MÉCANISME D'ACTION

D'une part, dans la littérature, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet antipaludique intrinsèque et de l'association médicamenteuse.

Le premier facteur essentiel est l'importance de la structure alcaloïdique(**Steele et al. , 1999**). La position de l'atome d'azote à l'intérieur du cycle est crucial pour l'activité antipaludique(**Yapi et al. , 2000**), il paraît que l'ajout d'une moitié aromatique d'un antipaludique non alcaloïdique lui conférerait une capacité de mieux pénétrer à l'intérieur des hématies parasitées(**Robert et al. , 2002**). La structure 4-aminoquinoline de la chloroquine pourrait être considérée comme le fameux agent historique en chimiothérapie : depuis sa découverte jusqu'à nos jours, elle a fait preuve d'une haute efficacité et d'une grande tolérabilité en prophylaxie(**O'Neill et al. , 1998**).

Deuxièmement, certains auteurs ont proposé d'autres mécanismes tel que des impacts sur le transport membranaire des produits antipaludiques (**Martiney et al. , 1999**): ce mécanisme expliquerait l'efficacité de certains produits en favorisant de l'accumulation des antipaludiques chez les souches plasmodiales résistantes que celles sensibles (**Berger et al. , 1987**).

Le troisième point serait l'affinité avec l'hème, ainsi, un soi-disant antipaludique puissant s'accumulerait dans la vacuole digestive parasitaire et sa potentialité en dépendrait(Raynes, 1999). Cette liaison avec l'hème empêcherait la dégradation de l'hémoglobine qui serait la source d'énergie pour la survie parasitaire(Vippagunta et al. , 1999). La structure diamine jouerait un rôle important dans ce mécanisme d'accumulation(Hindley et al. , 2002). Une fois de plus, l'implication d'une structure alcaloïdique est cruciale pour une association médicamenteuse : il a été démontré que l'azote quaternaire de la chloroquine interviendrait dans la liaison avec le radical propionyle de l'hématine par une liaison hydrophobe(Bachhawat et al. , 2000). Un exemple concret a été observé avec la fangchinoline, un alcaloïde qui reverse en même temps la résistance médicamenteuse des souches plasmodiales et des lignées cellulaires.

D'autre part, beaucoup de scientifiques s'intéresseraient aux études de la combinaison médicamenteuse car c'est une approche plus appropriée pour lutter contre le déploiement de la résistance médicamenteuse développée par les souches plasmodiales (Oliaro, 2001). Il est vrai que le mécanisme de la résistance reste encore mal connu, malgré tout, certains auteurs ont mis en évidence la proportionnalité entre la concentration d'antipaludique à l'intérieur de la vacuole digestive et son activité. Une telle corrélation a été aussi observée lors de l'association d'un antipaludique avec un produit agissant sur le transport inter membranaire : l'activité antipaludique a été renforcée.

1. Relation structure chimique - activité antipaludique

Pour réaliser une telle recherche, il faut quand même souligner l'importance de l'efficacité d'un travail d'équipe pluridisciplinaire.

Lors des études phytochimiques d'isolement (partage liquide - liquide) et du fractionnement bio guidé avec les extraits de plantes, il a été révélé comme résultats pertinents que ceux qui sont plus efficaces sont solubles dans le solvant d'acétate d'éthyle. Ceci serait probablement lié au caractère lipophile de ces composés (Liu et al. , 2003).

La structure de base des têtes de séries de produits antipaludiques est la structure d'alcaloïde. En se référant aux résultats de notre recherche, l'implication d'une structure alcaloïdique n'est pas suffisante pour permettre à une molécule de démontrer une efficacité sur l'inhibition totale de la croissance plasmodiale mais il faut prendre en considération le nombre et l'emplacement des atomes d'azote dans la structure chimique globale qui conférerait à son tour à la molécule un caractère hydrophobe. Il a été mis en évidence lors de ces multiples tests biologiques qu'il fallait au moins un atome d'azote que nous appelons pilier dont la structure de base liée à la forme quinoléique serait essentielle pour attribuer une activité antipaludique intrinsèque.

Le mécanisme d'action de la chloroquine, l'alcaloïde 4-aminoquinoléine le plus puissant et le plus utilisé en clinique, est encore mal connu jusqu'à maintenant (Pagola, 2000)mais beaucoup de scientifiques se mettent d'accord pour affirmer que son effet est lié à sa fixation à l'hème (Hindley, 2002) qui empêcherait la dégradation de ce dernier par

le parasite pour devenir une source d'énergie biochimique nécessaire à sa croissance. Cette affinité pourrait être attribuée aux liaisons hydrogènes intervenant lors de sa fixation sur son récepteur, généralement l'hème (**Pandey, 2001**).

Par rapport à nos études effectuées sur les plantes, de nouvelles molécules antipaludiques avec des structures originales ont été découvertes mais il existe aussi des similarités frappantes aux antipaludiques déjà disponibles sur le marché. Les plantes contenant les molécules les plus actives sont issues des plantes utilisées en médecine traditionnelle. La similitude d'activité biologique avec l'halofantrine, certains antidépresseurs et antihistaminiques (agents synthétiques reversant la résistance médicamenteuse), pourrait être liée respectivement à la structure phénanthrénique et au squelette de base des tricycliques (**Peters, 1988 ; Suffness et Cordell, 1985 ; Krogstad et al. , 1987 ; Bitonti et al. , 1988**).

Certaines structures, en plus de son activité antipaludique, sont douées d'activité cytotoxique ou antimicrobienne (bactéries et champignons) qui pourrait être liée à l'action sur la structure cellulaire ou en agissant sur le mécanisme de la multiplication cellulaire dont leur développement conduirait probablement vers la découverte d'un agent anticancéreux ou antimicrobiens. Certain mécanisme inattendu a aussi été démontré et donnait de faux résultats positifs : par exemple les propriétés hémolytiques des saponines, c'est plutôt une action mécanique que biologique.

Testant l'association des antipaludiques courants à ceux qui sont appelés adjuvants, pour obtenir une efficacité lors d'un bi- ou multitraitements, la présence d'un deuxième atome d'azote dans leurs structures chimiques est cruciale et elle dépend de sa position et de sa distance par rapport au premier azote dit pilier. Ce deuxième atome d'azote pourrait être remplacé par une structure moléculaire, cyclique de préférence, qui accroîtrait probablement le caractère lipophile de la molécule.

La présence d'une double liaison pourrait conférer aussi à la molécule une activité potentialisatrice. En plus, la structure stéréochimique associée à la propriété énantiomère de la molécule participerait beaucoup à l'effet potentialisateur vis-à-vis de la chloroquine. La partie aromatique, par augmentation de la basicité de la molécule, aurait beaucoup d'influence sur la levée de la chloroquino-résistance.

D'autres types d'alcaloïdes ont été aussi découverts à partir des plantes de Madagascar telles que les hervelines, alcaloïdes benzyl-isoquinoléiques dimères de *Hernandia voyroni*, elles renforcent l'activité de la chloroquine en cas de résistance du parasite à ce médicament de référence. Les seules différences, qui ont beaucoup d'influence sur la basicité et la polarité de chacun de ces alcaloïdes, sont les radicaux en position C₇ et C₁₂. Lors de l'étude de la combinaison de ces alcaloïdes dimères avec la chloroquine, si un atome d'hydrogène a été rattaché à chacun de ces deux carbones, un effet antagoniste a été observé. L'attachement respectif d'hydrogène et d'un radical méthyle a donné un effet additif, mais une double méthylation (ou respectivement, un groupe hydroxyle et un radical méthyle) favorisait une synergie. Des résultats inverses ont été observés quant à l'activité antipaludique intrinsèque, la molécule doublement hydrogénée est plus efficace. Ainsi, la présence d'atomes d'hydrogène sur ces deux carbones conférerait aux hervelines une propriété plutôt antipaludique intrinsèque mais leur méthylation donnerait en faveur de l'effet potentialisateur. Un rapprochement a été

fait, par rapport à leur similarité structurale avec la vérapamil et surtout celui du mécanisme de réversion de la multi résistance médicamenteuse par action directe sur le transporteur membranaire (Peters et al. , 1989).

Par rapport aux *Strychnos* de Madagascar : la découverte importante liée au facteur géographique est l'absence de strychnine ; puis, l'effet combiné entre l'extrait/chloroquine a été uniquement démontré avec les espèces contenant le principe actif commun qui est la malagashanine, particulièrement du *Strychnos myrtoides*.

En ce qui concerne les alcaloïdes de *Strychnos myrtoides*, la malagashanine [Nb-C(21)-sécocurane] et la strychnobrasiline [Nb-C(3)-sécocurane] ont un caractère commun *in vitro* : une activité antipaludique intrinsèque faible ou presque nulle mais un effet synergique important avec la chloroquine. En plus, la malagashanine renforce l'activité antipaludique des alcaloïdes quinoléiques (quinine, chloroquine), les aminoacridines (pyronaridine, quinacrine), les phénanthrènes (halofantrine) mais à effet additif avec l'artémisinine puis donne un antagonisme avec la burasaïne.

La différence plus marquée, liée probablement à la basicité et au caractère lipophile du produit, a été que seule la malagashanine renforce l'activité *in vivo* de la chloroquine. Une autre révélation importante lors des essais préliminaires d'étude antipaludique *in vivo* chez les souris : la combinaison de la chloroquine (0,75 mg/kg) à la malagashanine à une dose en dessous de 10 mg/kg a été inefficace mais à une dose supérieure ou égale à 10 mg/kg, l'effet synergique a été à la même intensité. Par contre, la strychnobrasiline a été inactive jusqu'à 50 mg/kg.

Au cours des tests antipaludiques *in vitro*, l'étude de la combinaison de la chloroquine avec certaines dérivées de la strychnobrasiline, a révélé que seules les structures similaires ou se rapprochant de la malagashanine [Nb-C(21)-sécocurane] sont plus efficaces que la molécule mère. Jusqu'à maintenant, aucune dérivée n'a été trouvée efficace *in vivo*. Tout ceci renforce et confirme l'importance de l'implication des caractères basique et lipophile d'un produit antipaludique pour être efficace (Loftsson et al. , 2006).

2. Relation paramètres pharmacocinétiques/propriétés pharmacodynamiques

Au cours des criblages pharmacologiques, une observation a attiré notre attention lors des tests préliminaires sur l'étude de l'activité antipaludique *in vivo* (test de suppression de 4 jours de Peters) effectuée avec le *Plasmodium vinckei petteri* (parasite des rongeurs à croissance hautement synchronisée) : chez le groupe de souris traitées à l'association chloroquine-malagashanine, la clairance parasitaire a été maintenue à plus de 48 h comparée à celles traitées à la chloroquine seule où la recrudescence a apparu à moins de 24 h après traitement. Ainsi, nous nous sommes posé la question : y a-t-il une corrélation entre le comportement de la malagashanine dans l'organisme avec cette prolongation d'activité de l'association chloroquine-malagashanine. C'est la raison pour laquelle, un projet a été établi pour mettre en place l'étude des paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de *Strychnos myrtoides* (en particulier la malagashanine et la strychnobrasiline), leur mode de biotransformation et les différents

types de dérivées. Les résultats de ce projet contribueraient non seulement à la compréhension du mécanisme de la résistance en général mais surtout à l'influence des molécules d'origine végétale sur la lutte contre la résistance en particulier.

Il a été démontré dans nos travaux antérieurs que la strychnobrasiline, comme la malagashanine, renforce l'activité antipaludique *in vitro* de la chloroquine mais étonnement seule la malagashanine reste efficace *in vivo*. Effectivement, à la suite de l'étude des paramètres pharmacocinétiques de ces deux molécules, il y a une très grande différence quant au comportement de l'organisme vis-à-vis de ces deux alcaloïdes issus d'une même plante. Cette différence repose sur plusieurs facteurs : l'épuration, la distribution et le mode de bio transformation.

La strychnobrasiline se distribue plus largement dans l'organisme et dans l'urine elle est le produit (quantitativement) principal récupéré. Par rapport à celle-ci, la malagashanine quitte plus rapidement le milieu plasmatique et est éliminée à de taux très faible dans l'urine en se transformant en plusieurs dérivées, le métabolite majoritaire (quantitativement) est la N-déméthylmalagashanine.

Il a été démontré aussi lors de nos études antérieures que la malagashanine est plutôt lipophile et plus basique par rapport à la strychnobrasiline qui est plus hydrophile et moins basique. Ainsi, la malagashanine pourrait acquérir une certaine facilité pour se déplacer d'un compartiment à l'autre tandis que la strychnobrasiline rencontrerait beaucoup de difficultés pour franchir les barrières cellulaires pour atteindre son site d'action *i.e.* le milieu intra érythrocytaire.

H. RÉSISTANCE MÉDICAMENTEUSE

La chloroquine, un médicament clé pour la thérapie du paludisme, a été vulgairement utilisée pour traiter le paludisme depuis les années 40s jusqu'à nos jours, par ce qu'elle représente beaucoup d'avantages par rapport aux autres antipaludiques existants, telles qu'une forte et rapide activité, une bonne tolérance et une toxicité faible pour l'homme, une valeur commerciale très basse et une versatilité pour les utilisations prophylactique et curative. Dans l'autre sens, la monothérapie extensive de la chloroquine est une des raisons principales derrière l'expansion de la résistance à ce médicament. C'est cette résistance qui dicte le dévouement dans toutes les recherches pour comprendre le mécanisme d'action de la chloroquine aussi bien que le processus de résistance et son inversion. Malgré ces progrès décisifs, ce thème reste toujours un sujet de discussion. Ainsi, la chloroquine est supposée exercer son activité antipaludique par inhibition de la polymérisation de l'hème toxique en hémozoïne durant la protéolyse de l'hémoglobine (**Slater et Cerami, 1992**), mais le mécanisme basé sur telle polymérisation reste controversé. Quant au mécanisme de la chloroquino-résistance, le processus de résistance intimement lié au mode d'action de la chloroquine est toujours un sujet de contestation. A ce point, il y a quand même une ligne d'évidence suggérant que la base de la chloroquino-résistance serait la réduction de l'accumulation de la chloroquine à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite, allant au dessous du seuil de concentration

de la chloroquine nécessaire pour tuer le parasite. En fin de compte, rien n'est vraiment décisif, tout est encore controversé et le débat reste excitant (**Ward et al. , 1997**).

Restant à notre sujet en parlant des choses pratiques, depuis le travail effectué par le pionnier de ce domaine (**Martin et al. , 1987**), la vérapamil a été largement utilisée comme un outil biochimique pour la compréhension de la chloroquino-résistance et son inversion. Mais autant que la vérapamil, les produits synthétiques dits inverseurs de la résistance (désipramine et cyproheptadine) ne sont pas doués d'activité potentialisatrice *in vivo* vis-à-vis de la chloroquine (**Björkman et al. , 1990 ; Warsame et al. , 1992**). Très peu est connu concernant les produits naturels qui pourraient potentialiser l'action de la chloroquine et seraient des candidats potentiels pour cet outil biochimique malgré les innombrables pertinentes informations sur l'utilisation des remèdes traditionnels. A l'issue de telles informations, trois espèces de *Strychnos* malgaches ont été étudiées et après une étude de toxicité, le décocté de l'espèce la plus utilisée (*Strychnos myrtoides*) s'avère efficace en combinaison avec la chloroquine lors d'une étude clinique préliminaire dans le cadre d'un projet de valorisation de la médecine traditionnelle à Madagascar (**Ramialiharisoa et al. , 1994**). Les expérimentations, tant sur modèles *in vitro* et *in vivo* qu'en phase clinique préliminaire confirment l'intérêt pharmaceutique évoquant l'usage local et traditionnel de cette plante. Les importantes expériences mettant en évidence l'activité potentialisatrice de la malagashanine et son interaction avec la chloroquine seront rapportées dans ce manuscrit dans le but de contribuer à la compréhension de son mode d'action. Toutes les espèces de *Strychnos* incluses dans cette étude contiennent le constituant bioactif en commun (la malagashanine). Une fois associée à la chloroquine, ce composé renforce significativement l'action vis-à-vis de la chloroquine sur une souche chloroquino-résistante du parasite de paludisme. Sa forte liposolubilité (**Rafatro et al. , 2000a**) pourrait jouer un rôle très important dans cette activité *in vivo*. De *Strychnos myrtoides*, un autre alcaloïde (la strychnobrasiline), se trouvant en quantité majoritaire dans l'extrait brut alcaloïdique renforce l'action *in vitro* vis-à-vis de la chloroquine sur des souches chloroquino-résistantes mais elle est dépourvue d'un effet potentialisateur *in vivo*. Une dose de strychnobrasiline de 50 mg/kg démontre une plus faible activité antagoniste que celle de 10 mg/kg en association avec la chloroquine. Toujours est-il qu'une exploration de l'effet des doses plus fortes n'est plus justifiable à cause de la proximité d'un effet toxique. En outre, le renforcement de l'activité potentialisatrice *in vivo* vis-à-vis de la chloroquine de l'extrait brut de *Strychnos myrtoides* qui contenait encore des alcaloïdes en quantité minoritaire, est plus prononcé que la somme algébrique de la synergie et l'effet antagoniste de chaque produit majoritairement bioactif. Ceci amène à l'idée que l'extrait brut provenant de la plante pourrait avoir une meilleure activité car les alcaloïdes pourraient agir de manière synergique entre eux dans l'extrait, justifiant ainsi son utilisation en tant que phytomédicament (**Farnsworth et al. , 1985**). Ce travail a été principalement consacré à l'étude de la malagashanine en gardant la strychnobrasiline comme matière première pour préparer différents dérivés hémisynthétiques.

Un des résultats le plus frappant de cette étude est l'observation de la synergie *in vitro* de l'association chloroquine (CQ) / malagashanine (MG) sur la souche de *Plasmodium falciparum* nommée FcB1/Colombie. Cette souche a été décrite auparavant comme une souche résistante, mais ici elle a montré une perte de sa résistance pour acquérir un caractère de phénotype sensible avec une $CI_{50} = 59,2 \pm 4,0$ nM relative à la

chloroquine. En parlant toujours de comparaison, l'association CQ/MG a une simple activité additive sur la souche sensible 3D7/Indochine autant que chez les deux isolats provenant des patients Malagasy. A l'opposé de la résistance multi médicamenteuse chez les cellules tumorales des mammifères, la chloroquino-résistance est un caractère à phénotype stable même en absence d'une pression médicamenteuse d'une manière continue (**Wellems et al. , 1990**). La raison de la perte de résistance de la souche FcB1, aussi observée au laboratoire qui a fourni la souche, reste mystérieuse. Il a été trouvé aussi que la vérapamil démontre un renforcement de l'activité potentialisatrice vis-à-vis de la chloroquine sur cette souche FcB1, ramenant une CI_{50} à une valeur très faible des souches sensibles ($CI_{50} < 10$ nM) pour une concentration associative de 1,25 μ M. L'effet potentialisateur vis-à-vis de la chloroquine est à la fois observé avec la malagashanine qu'avec la vérapamil sans tenir compte de sa sensibilité actuelle vis-à-vis de la chloroquine. Il a été rapporté antérieurement que l'inversion de la chloroquino-résistance de la vérapamil est spécifique aux parasites résistants même quand le parasite est rendu phénotypiquement sensible par la manipulation avec des bases faibles (**Martiney et al. , 1995**). Une même conclusion pourrait être tirée pour la malagashanine.

Pour plus d'investigation sur l'activité potentialisatrice de la malagashanine, sa capacité d'inverser l'action vis-à-vis de certains antipaludiques de référence (méfloquine, quinine, artémisinine et burasaïne) a été étudiée sur la souche FcM29. Il a été rapporté que la malagashanine renforce d'une façon prononcée l'action *in vitro* vis-à-vis de la quinine et de la méfloquine. Par contre, il montre une simple action additive avec l'artémisinine et un puissant effet antagoniste avec la burasaïne. Tous ces résultats nous ont incités à évaluer la capacité de la malagashanine pour rehausser la sensibilité des autres composés quinoléiques antipaludiques. Il a été observé que l'activité *in vitro* vis-à-vis de l'action des aminoacridines (pyronaridine et quinacrine) est rehaussée significativement par la malagashanine sur la souche chloroquino-résistante de FcM29/Cameroun. L'association malagashanine/phénanthrène - méthanol d'halofantrine a montré aussi une forte synergie. Lors de toutes ces expériences, la malagashanine a été utilisée à une concentration beaucoup plus faible que celle indiquée pour son activité antiplasmodiale. Par ailleurs, elle agit spécialement, comme la chloroquine seule, au stade de trophozoïtes âgés sur le cycle de développement du *Plasmodium falciparum* une fois combinée à la chloroquine. Toutes ces observations pourraient écarter, aux faibles concentrations utilisées, toute action significative de la malagashanine sur toutes les différentes cibles vis-à-vis d'autres antipaludiques testés. Deux remarques importantes viennent à l'esprit à partir de l'examen de tous ces résultats. Premièrement, la malagashanine rehausse sélectivement l'action des 4-aminoquinoléine, méthanol quinoléine, 9-aminoacridine et du phénanthrène-méthanol utilisés lors de ces études, pour lesquels le mécanisme d'action commun suggéré est le blocage de la polymérisation de l'hème (**Sullivan et al. , 1998**). Deuxièmement, à l'encontre de la vérapamil qui a autant de sensibilité sur tous les parasites sensibles et résistants mais n'a pas d'activité potentialisatrice envers la méfloquine (**Oduola at al. , 1993**), la malagashanine exerce une différence plus marquée sur la sensibilité des réponses en ce qui concerne les clones sensibles ou résistants de *Plasmodium falciparum* en augmentant la sensibilité à la méfloquine pour le clone chloroquino-résistant mais méfloquino-sensible de FcM29. Des travaux sont en cours pour éclaircir si la malagashanine accroît l'accumulation de la

drogue par interaction avec un dysfonctionnement d'échangeur d'ions comme l'aurait suggéré **Roepe et Martiney (1999)**, ou si elle agit par un mécanisme en relation à une fixation sur l'hématine d'après l'hypothèse de **Bray et al. (1998)**. En particulier, il serait intéressant de connaître si la malagashanine exerce son activité à l'intérieur de la vacuole digestive ou le long de la membrane périphérique.

I. TENDANCE

1. Approche actuelle

"Le *Plasmodium falciparum*, l'agent étiologique le plus répandu pour la malaria humaine devient de plus en plus résistant aux médicaments antimalariques standards qui rend nécessaire un effort continu de rechercher de nouvelles drogues antimalariques. Les plantes ont invariablement été une source riche pour de nouvelles drogues et quelques drogues antimalariques en service (quinine et artémisinine) ont été obtenues à partir des plantes ou aujourd'hui développées en utilisant leurs structures chimiques comme bases" (**Gessler et al. , 1994**). "L'évaluation scientifique des plantes médicinales utilisées dans la préparation de la médecine traditionnelle a dans la médecine moderne fournie des médicaments efficaces pour le traitement des maladies parasitaires" (**Iwu et al. , 1994**). "Au cours de ces dernières années, le progrès scientifique en chimiothérapie de malaria a été plus sur les effets des drogues déjà existantes que sur le développement des neufs. La recherche de nouvelles drogues antimalariques a regagné l'importance due à la réapparition des parasites résistants aux médicaments dans beaucoup de pays. La chimiothérapie et la prophylaxie de malaria maintenant visent des combinaisons de drogue avec l'espoir de réaliser la potentialisation de drogue pour éviter ou retarder la résistance" (**Zucker et Campbell, 1993 ; O.M.S., 2000**). "Dans le Sud-est asiatique, l'utilisation des médicaments de première ligne avec des dérivés d'artémisinine tels que l'artésunate ont montré à l'efficacité d'augmentation, protègent des drogues contre le développement de résistance, réduisent la transmission de la malaria et augmentent la durée de vie des composés antimalariques" (**UNDP, 2000**).

Tels sont les différents propos parlant de la situation de la thérapie du paludisme.

Une des complications rencontrées lors du traitement de cette maladie est le développement de la résistance du *Plasmodium falciparum* ensuite l'apparition des souches plasmodiales multirésistantes.

Pour palier à cet échec, on parle beaucoup de l'association médicamenteuse. C'est vrai, peu importe le profil ou la structure chimique de chaque composé en association, mais l'important c'est qu'elle soit efficace et ne manifestant aucune toxicité apparente.

2. Approche intégrée

Dans l'espoir de découvrir des molécules à effet antipaludique propre ou d'activité antiplasmodiale sélective, nous avons constaté que développer un médicament à partir des plantes dites antipaludiques n'a pas été toujours évident. Déjà lors des enquêtes ethno-botaniques/pharmacologiques, les plantes dites antipaludiques ont été démontrées aussi par la suite que le choix a été basé sur leur propriété de soulager la montée de fièvre et certaines malaises (nausée, vomissement, ...) liées à l'infection palustre, de renforcer la défense immunitaire ou de fortifier les malades atteints du paludisme. Toutes ces ambiguïtés ont été rencontrées puisque le diagnostic et l'évaluation de l'efficacité du traitement ont été basés sur des critères symptomatiques.

C'est la raison pour laquelle on a posé beaucoup de questions telles que : Quel(s) est(sont) l'(es) effet(s) propre(s) et exact(s) des extraits des plantes dites antipaludiques ? Ensuite, les différents modèles de méthodes biologiques existantes sont-ils nécessaires et suffisants pour démontrer une activité antiplasmodiale sélective d'une manière tranchante ? C'est pour éclaircir les réponses à toutes ces questions qu'une approche intégrée a été développée pour les conduites à tenir lors de la recherche ou du développement d'un médicament antipaludique d'origine végétale à partir des plantes utilisées empiriquement comme antipaludiques. Pour mettre en application cette idée d'approche, à chaque fois qu'une molécule a été isolée, elle a été passée systématiquement au criblage pharmacologique disponible à notre niveau, entre autres les tests de cytotoxicité, l'étude de l'effet immunomodulateur, la toxicité aiguë et chronique, l'activité sur le développement parasitaire au stade hépatique. La suivie de cette approche nous a permis de différencier ou de distinguer une action directe des extraits sur le parasite ou par rapport à l'effet indirect via son hôte *i.e.* l'homme.

Comme il a été décrit sur le paragraphe précédent, le choix des plantes pour les collectes systématiques (en plus des collectes randomisées) est basé par leur utilisation en médecine traditionnelle. Leurs extraits sont passés en criblage biologique à la recherche d'activité antipaludique et d'effet modulateur de la chloroquine. Ils sont testés *in vitro* d'abord, ensuite *in vivo* pour les extraits actifs purifiés ou enrichis en molécule(s) active(s). Les extraits efficaces sont sélectionnés et passés au fractionnement bio guidé en appliquant la combinaison d'une méthode d'isolement chimique à celle du criblage systématique : le micro test isotopique *in vitro*, le test de suppression parasitaire *in vivo*, l'étude de cytotoxicité et de l'effet immunomodulateur.

J. APERÇU ET PERSPECTIVES

Concernant les deux alcaloïdes majeurs isolés de *Strychnos myrtoïdes*, la malagashanine est un alcaloïde 1-4 diamine mais la strychnobrasiline est un 1-5 diamine. Cette structure d'alcaloïde diamine jouerait un rôle important sur la conformation chimique de leur récepteur qui se trouverait probablement dans la vacuole digestive du parasite. En plus, la malagashanine est plus liposoluble que la strychnobrasiline. Ceci procurerait une grande habilité à la malagashanine de joindre son site d'action. Une autre différence remarquable a été aussi observée entre strychnobrasiline et malagashanine à la suite de leur

administration chez les rats en comparant les chromatogrammes d'urine. La malagashanine a été en grande partie métabolisée et le dérivé bio actif majoritaire a préservé la structure 1-4 diamine qui probablement prolongerait l'activité de la molécule-mère. Par contre, la strychnobrasiline a été faiblement métabolisée et par conséquent la molécule-mère serait responsable en entier de son inefficacité. Toutes ces discussions ont été basées sur la comparaison des profils pharmacocinétiques de la strychnobrasiline et de la malagashanine. Creusant dans l'étude du mode de biotransformation de ces alcaloïdes, on pourrait donner plus d'information sur leur propriété de reverser la chimiorésistance.

Mais à la suite de ce travail, nous disposons quand même des données expérimentales assez importantes pour passer en phase clinique qui consisterait à l'optimisation de l'activité de l'association chloroquine – alcaloïdes de *Strychnos myrtoïdes*.

Parallèlement à ceci, étudier le profile pharmacocinétique de ces deux alcaloïdes pour déterminer leur comportement après administrations répétées au sein de l'organisme (modèle rat) a été aussi envisagé. Et ceci ferait l'objet d'une demande de financement auprès des bailleurs de fond international.

Les quelques documents scientifiques qui ont servi à la rédaction de ce document de synthèse sont listés dans la partie documentation qui se trouve à la fin de ce volume.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes seize années d'activités dans le domaine de la recherche scientifique ont été consacrées à la contribution, d'une part, au développement d'un prometteur candidat en tant que futur médicament antipaludique par la mise en évidence de ses propriétés pharmacologiques, principalement sur modèle d'organisme animal vivant. Et d'autre part, à la formation de jeunes relèves par l'encadrement de leurs travaux pratiques de laboratoire pour les préparer à être des futurs candidats dans la carrière de chercheur scientifique. Il est essentiel de souligner que tous ces travaux ont pu être réalisés grâce à une collaboration interactive entre les différentes institutions publiques et privées, nationales et internationales.

La malagashanine a fait l'objet principal de cette étude de développement médicamenteux, elle présente le profil idéal d'un médicament associé à plusieurs types de molécules antipaludiques déjà mises sur le marché, en d'autre terme elle rehausse l'effet antiplasmodial de ces dernières en cas de perte de leurs activités : premièrement, du fait qu'elle n'a pas d'action directe pour entraver le cycle de développement biologique du *Plasmodium*, elle peut s'échapper à toute forme de résistance développée par ce microbe, agent causal du paludisme. Deuxièmement, après avoir été administrée sous différentes formes chez un être vivant, la malagashanine est principalement transformée en au moins trois types de produits dérivés ; puis, elle est excrétée hors de l'organisme avec ses métabolites. Ainsi, un jour, on peut espérer que la malagashanine se trouverait

sur le marché afin de participer à un programme d'envergure internationale pour lutter contre ce fléau mondial.

Plus d'une quarantaine étudiants d'Université ont été formés dans les différents aspects d'études pré cliniques en vue de participer au développement des médicaments à partir des plantes issues de la flore de Madagascar. Tout au moins, un panel de jeunes chercheurs sont actuellement disponibles pour s'engager dans la voie de la recherche scientifique afin d'assurer l'avenir de la filière de valorisation scientifique des plantes Malagasy.

Comme perspectives d'avenir, tout d'abord, à la suite d'un programme de travail de recherche scientifique financé par l'Organisation Mondiale de la Santé, des plantes médicinales antipaludiques de Madagascar ou d'Afrique sont en cours d'études dans le laboratoire dont je suis l'Investigateur Principal. Certains principes actifs sont actuellement en train d'être isolés. L'étude de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode de biotransformation est prévue dans le programme des travaux de ce projet. Ensuite, en terme d'encadrement scientifique, un étudiant de l'Université d'Antananarivo est en train de réaliser les travaux de paillasse au laboratoire pour préparer son Doctorat de troisième cycle en Biochimie - Pharmacologie. La soutenance de cette thèse est prévue pour l'année 2007.

Et enfin, l'investigation des plantes de Madagascar est loin d'être terminée, beaucoup de travaux restent encore à prospecter.

C'est sûr, la flore de Madagascar est une des sources potentielles de médicaments essentiels. Et pour la valoriser, à notre niveau, des programmes de recherches scientifiques ont été mis en place : des molécules actives, autres que les alcaloïdes, sont en train d'être développées et les informations concernant celles-ci seraient publiées subséquemment.

BIBLIOGRAPHIE :

LISTE DE PUBLICATIONS

RAFATRO H , Ramanitrahasimbola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A, Frappier F.: « Reversal activity of the naturally occurring chemosensitizer malagashanine in *Plasmodium malaria* ». Biochem. Pharmacol., 59, 1053-1061, 2000a.

RAFATRO H. , D. Ramanitrahasimbola, P. Rasoanaivo, A. Rakotozafy, S. Ratsimamanga, P. Grellier, L. Mambu, F. Frappier, L. Allorge: "Recherche de substances naturelles à vocation antipaludique à partir de la flore de Madagascar". 3ème réunion biennale de parasitologie (*Des gènes au terrain*), Institut Pasteur de Lille – Institut de Biologie de Lille, France, du 13 au 15 mars 2001a.

RAFATRO H. , R. K. Verbeeck, T.Y.R. Gougnard, De Jonghe P.J.M., Rasoanaivo P., Laurent A., Lhoëst G.: "Isolation from rat urine and human liver microsomes, identification by electrospray and nanospray tandem mass spectrometry of new malagashanine metabolites". J. Mass Spectrometry, 35 , 1112-1120, 2000b.

RAFATRO H. , Ramanitrahasimbola D., Rasoanaivo P.: "An integrated approach for the investigation of antimalarial plants". Traditional Medicine in HIV/AIDS and Malaria,

International Center for Ethnomedicine and Drug Development, Abuja, Nigeria,
December 5th – 7th, 2000c.

RAFATRO H., Rasoanaivo P., R. K. Verbeeck. Pharmacokinetic of malagashanine, a *Strychnos* alkaloid, in rat following different routes of administration. (Accepté par l'Eur. J. Pharm. Sci. en 2000 et présenté au 9th NAPRECA Symposium, Kenyatta International Conference Centre, Nairobi, Kenya, 27th – 31st August, 2001b).

RAFATRO H., Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Quetin-Leclercq J., Verbeeck R.K.: "High-performance liquid chromatographic assay of malagashanine in rat plasma and urine and its pharmacokinetic application". J. Chromatogr. B, 744, 121-127, 2000d.

RAFATRO Herintsoa : « Résultats d'études du mode d'action, de la mise au point et de l'application des méthodes d'analyses chimiques des extraits de Retendrika ou *Strychnos myrtiloides* (Loganiaceae) ». Thème présenté à l'Académie Nationale Malagasy des Arts, des Lettres et des Sciences (AcNALS) pendant la séance plénière de la célébration du mois de la langue Malagasy – Section : Sciences Appliquées, Antananarivo, Madagascar, le 29 Juin 2006a.

RAFATRO Herintsoa : Articles de connaissance et d'informations sur l'Aferontany (*Mollugo nudicaulis* - Molluginaceae), le Vahona (*Aloe macroclada* - Liliaceae) et le miel dans le Dictionnaire de connaissance de l'Académie Malagasy : (sous presse, 2003a).

RAFATRO Herintsoa, ROBIJAONA R. Baholy, RANAIVORAVO Jacques, RAMANITRAHASIMBOLA David, RAKOTOZAFY Armand, RATSIMAMANGA Suzanne, RAOELINA ANDRIAMBOLOLONA, RANDRIAMANIVO RAKOTOZAFY Lucienne, RASOLOFONIRINA Mamiseheno, MANOELA Fihevera Pascal, RANDRIANARIMANARIVO Henri Martial, RABESANDRATANA Henintsoa Nirilanto Razakandisa, RATSIMBAZAFY Jean Delphin. "Minéraux et oligo-éléments présents dans certaines plantes Malagasy impliquées en phytothérapie". Ethnopharmacologia, 36, 57-60, Novembre 2005a.

RAFATRO Herintsoa, Robijaona Rahelivololoniaina Baholy : "Tendance actuelle de la recherche en pharmacologie des médicaments antipaludiques". Thème présenté à l'AcNALS – Section Sciences Appliquées, Antananarivo, Madagascar, 23 mars 2005. Bull. Acad. Nat. des Arts, des Lettres et des Sciences, 84/1, 155-174, 2005 (2006b).

RAFATRO Herintsoa, Robijaona Rahelivololoniaina Baholy : "Les plantes à usage simple pour les soins de la peau". Bulletin de l'AcNALS, Antananarivo, Madagascar, 83(1), 283-293, 2004.

RAFATRO Herintsoa, Robijaona Rahelivololoniaina Baholy : "Les plantes à usage simple : sont-elles encore en vogue actuellement". Bulletin de l'Académie Nationale des Arts, des Lettres et des Sciences Malagasy (AcNALS) – Section Sciences Appliquées, Antananarivo, Madagascar, 82(1-2), 427-293, 2003b.

RAFATRO Herintsoa, ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy, RAKOTOZAFY Armand, RATSIMAMANGA Suzanne, RANDRIAMANIVO RAKOTOZAFY Lucienne, RASOAZANANY Elise Octavie, RAOELINA ANDRIAMBOLOLONA. "Summary of some ecological studies and elemental analyses data of two endemic species of Madagascar *Noronhia* (Oleaceae)". Journal of Madagascar Conservation & Development (Soumis en Mars 2006, révisé en Juin 2006, représenté en Décembre

2006c).

RAFATRO Herintsoa , ROBIJAONA Rahelivololoniaina Baholy, RAZAFIMAHEFA Andriantiaray Solofoniaina, RASOAMAHENINA Antsa Mirindra, RAMANANTSOA Edwinstaël Keller de Fernanto, RAKOTOARIMANANA Hajatiana, RAKOTONDRABE Miora Harivony, RAMINOSOA Maminirina, RAKOTOZAFY Armand, RANAIVORAVO Jacques, RAJAONARISON Jean-François, RATSIMAMANGA Suzanne, Gaston Lutete TONA, Gauthier Kahunu MESIA. "Screening of plant extracts for searching antiplasmodial activity". 11th NAPRECA Symposium, Antananarivo, Madagascar, 9th-12th August 2005b.

Ramanitrahambola David, Jacques Ranaivoravo, **Herintsoa Rafatro** , Philippe Rasoanaivo, Suzanne Ratsimamanga. "Strychnos myrtoïdes: A case study of a chemosensitizing medicinal plant"; PP 141-157 in Traditional medicinal plants and malaria. Edited by Willcox et al., CRC press, 2004.

Rasoanaivo P, **Rafatro H** , Ramanitrahambola D, Ratsimamanga-Urverg S, "Alkaloids from Madagascan plants as biochemical tools in drug-resistant malaria". 7th NAPRECA Symposium of the, Dar es Salaam, Tanzania, 17th – 22nd August 1997, n° PRL05.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, **Rafatro H** , Ramanitrahambola D, Frappier F : « De la connaissance traditionnelle au phytomédicament - *Strychnos* de Madagascar : de la connaissance traditionnelle à l'essai clinique ». Rev. Méd. Pharmacopée Africaine, 15-24, 2001a.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, **Rafatro H** , Ramanitrahambola D, Palazzino G, Galeffi C and Nicoletti M.: "Alkaloids of *Hernandia voyronii*: chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of Herveline D". Planta Medica, 64(1), 58-62, 1998.

Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Ramanitrahambola D, **Rafatro H** , Rakoto-Ratsimamanga A. : « Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine ». J. Ethnopharmacol., 64 (2), 117-126, 1999.

Rasoanaivo P., **Rafatro H.** , Ramanitrahambola D, Ranaivoravo J., Ratsimamanga S., Frappier F.: "Produits naturels d'origine végétale - *Strychnos* de Madagascar: de la connaissance traditionnelle à l'essai clinique". Actes du colloque de Saint-Foy (Quebec – Canada), 127-140, 7 – 9 Août, 2001b.

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 myrtoïdes* alkaloids against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium* malaria ». Planta Medica, 60, 13-16, 1994.

Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Rakoto-Ratsimamanga A., [et *Randrianarivelosjosia M.* & **Rafatro H.**]: « Alkaloids of Malagasy herbal remedies in the treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium* malaria ». 5th Symposium of the NATURAL Product Research network for Eastern and Central Africa (NAPRECA), Antananarivo, Madagascar, 19th – 23rd September 1993.

Rasoanaivo Philippe, David Ramanitrahambola, **Herintsoa Rafatro** , Dina Rakotondramanana, Rahelivololoniaina Baholy ROBIJAONA, Armand

RAKOTOZAFY, Suzanne RATSIMAMANGA, Mehdi Labaïed, Philippe Grellier, Lucile Allorge, Lengo Mambu and François Frappier. "Screening extracts of Madagascar plants in search of antiplasmodial compounds". *Phytotherapy Research*, 18, 742-747, 2004.

Ratsimamanga-Urverg S., Rasoanaivo P., **Rafatro H.**, Robijaona B., Rakoto-Ratsimamanga A.: « *In vitro* antiplasmodial activity, chloroquine-potentiating action of three new isoquinoline alkaloid dimers from *Hernandia voyroni* Jumelle ». *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88(3), 271-277, 1994a.

Ratsimamanga-Urverg S., Rasoanaivo P., Milijaona R., Rakotoarimanga J., **Rafatro H.**, Robijaona B., Rakoto-Ratsimamanga A.: « *In vitro* antimalarial activity, chloroquine potentiating effect and cytotoxicity of alkaloids of *Hernandia voyronii* Jum. (Hernandiaceae) ». *Phytother. Res.*, 8, 18-21, 1994b.

Ratsimamanga-Urverg S., Rasoanaivo P., Ramiaramanana L., Milijaona R., **Rafatro H.**, Robijaona B., Verdier F., Rakoto-Ratsimamanga A., Le Bras J.: « *In vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermum penduliflorum* ». *Planta Medica*, 58, 540-543, 1992.

Trigalo F, Martin MT, Blond A, Brouard JP, **Rafatro H.**, Ramanitrahambola D, Frappier F.: New indolines derivatives from strychnobrasiline, modulators of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Tetrahedron*, 55(19), 6139-6146, 1999.

DOCUMENTATION

Addae-Kyereme J, Croft SL, Kendrick H, Wright CW. 2001. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *J Ethnopharmacol.* 761, 99-103.

Ajaiyeoba EO, Oladepo O, Fawole OI, Bolajid OM, Akinboye DO, Ogundahunsi OAT, Falade CO, Gbotosho GO, Itiola OA, Happi TC, Ebong OO, I. M. Ononiwu, Osowole OS, Oduola OO, Ashidi JS and Oduola AMJ. 2003. Cultural categorization of febrile illnesses in correlation with herbal remedies used for treatment in Southwestern Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 852-3, 179-185.

American Association for the Advancement of Sciences. Arrière-plan: la malaria en Afrique Subsaharienne. In: *La malaria et le développement en Afrique: une approche intersectorielle*. Washington DC, 4-8, Septembre 1991.

Andrade-Neto VF, Brandao MG, Stehmann JR, Oliveira LA, Krettli AU. 2003. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol.* 872-3, 253-256.

Andrianjafy. Le ramanenjana à Madagascar : choréomanie d'origine palustre. Thèse de Doctorat en Médecine, Montpellier, 1902.

Arimori K, Miyamoto S, Fukuda K, Nakamura C, Nakano M. 1998b. Characteristic

-
- difference in gastrointestinal excretion of clarithromycin and roxithromycin. *Biopharm Drug Dispos.* 197: 433-438.
- Arimori K, Nakano M. 1998a. Drug exsorption from blood into the gastrointestinal tract. *Pharm Res.* 153: 371-376.
- Bachhawat K, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A. Interaction of chloroquine and its analogues with heme: An isothermal titration calorimetric study. *Biochem Biophys Res Commun* 2763: 1075-1079, 2000.
- Beaupeze. Informations: chronique du mois de juin le froid et la mortalité des indigènes. *Revue de Madagascar* 8 : 593-599, 1901.
- Berger BJ, Dai WW, Cerami A, Ulrich P. Studies on the mechanism of antimalarial action of a novel arylene bismethylketone. *Biochem Pharmacol* 546: 739-742, 1997.
- Bhatti MM, Foster RT. 1997. Pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil after intravenous and oral administration of racemic verapamil in a rat model. *Biopharm Drug Dispos.* 185: 387-396.
- Biala RG, Tits M, Penelle J, Frederich M, Brandt V V, Prosperi C, Llabres G, Angenot L. 1998. Strychnochrysin, a New Bisindole Alkaloid from the Roots of *Strychnos nux-vomica*. *J Nat Prod.* 611: 139-141.
- Bilia AR, Lazari D, Messori L, Taglioli V, Temperini C, Vincieri FF 2002. Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin. Its application to *Artemisia annua* constituents. *Life Sciences* 70, 769–778.
- Bitonti AJ, Sjoerdsma A, McCann PP, Kyle DE, Oduola AM, Rossan RN, Milhous WK, Davidson DE Jr. 1988. Reversal of chloroquine resistance in malaria parasite *Plasmodium falciparum* by desipramine. *Science.* 2424883: 1301–1303.
- Bjorkman A, Phillips-Howard PA. 1990. The epidemiology of drug-resistant malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 842: 177-180.
- Bjorkman A, Willcox M, Kihamia CM, Mahikwano LF, Howard PA, Hakansson A, Warhurst D. 1990. Field study of cyproheptadine/chloroquine synergism in *falciparum* malaria. *Lancet.* 3368706: 59-60.
- Blanchy S, Rakotonjanabelo A, Ranaivoson G 1993. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug sensitivity in Madagascar from 1982 to 1993 and operational consequences. *Bull Soc Pathol Exot,* 864, 254-259.
- Boiteau P. Précis de matière médicale Malgache. Librairie de Madagascar, Antananraivo, Madagascar, 1979.
- Brabin BJ. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ.* 616: 1005-1016.
- Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA. 1998. Access to hemozoin: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol.* 541: 170-179.
- Caillard V, Beaute-Lafitte A, Chabaud AG, Landau I. 1992. *Plasmodium vinckei petteri*: identification of the stages sensitive to arteether. *Exp Parasitol.* Dec 754: 449-456.
- Cambie G, Caillard V, Beaute-Lafitte A, Ginsburg H, Chabaud A, Landau I. 1991. Chronotherapy of malaria: identification of drug-sensitive stage of parasite and timing of drug delivery for improved therapy. *Ann Parasitol Hum Comp.* 661: 14-21.
-

- Capuron R. *Hazomalania* R. Capuron, nouveau genre Malgache de la famille des Hernandiacees. *Adansonia* VI, 3: 375-384, 1966.
- Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL. 1983. *Plasmodium falciparum*: assessment of in vitro growth by [³H]hypoxanthine incorporation. *Exp Parasitol.* 55: 138-146.
- Cloudsley-Thompson JL 1976. *Insects and History*. Weidenfeld and Nicolson, London.
- Colburn WA. 1988. Physiologic pharmacokinetic modeling. *J Clin Pharmacol.* 28: 673-677.
- Collins F.H. & Paskewitz S.M. 1995. Malaria: current and future prospects for control. *Annual Review of Entomology*, 40, 195-219.
- Contreras CE, Rivas MA, Dominguez J, Charris J, Palacios M, Bianco NE, Blanca I 2004. Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured in vitro by flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99, 179-184.
- Dafallah SE, Elsadig AH, El-Agib F. 2003. Ectopic pregnancy in a teaching hospital in Sudan. *Saudi Med J.* 24: 687-68.
- Deloron P, Le Bras J, Riananarniffia JA, Coulanges P. *Plasmodium falciparum* in Madagascar : *in vivo* and *in vitro* sensitivity to seven drugs. *Ann Trop Med Parasitol* 79: 357-365, 1985.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 16: 710-718.
- Desowitz Robert S 1991. *The Malaria Capers More Tales of Parasites and People, Research and Reality*. W.W. Norton & Company, New York.
- Dluzewski AR, Ling IT, Rangachari K, Bates PA, Wilson RJ. 1984. A simple method for isolating viable mature parasites of *Plasmodium falciparum* from cultures. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 78: 622-624.
- do Ceu de Madureira M, Paula Martins A, Gomes M, Paiva J, Proenca da Cunha A, do Rosario V 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tom and Príncipe islands. *J Ethnopharmacol.* 81, 23-29.
- Ducharme J, Farinotti R. 1996. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. *Focus on recent advancements. Clin Pharmacokinet.* 31: 257-274.
- Engels FK, Mathot RA, Loos WJ, van Schaik RH, Verweij J. 2006. Influence of high-dose ketoconazole on the pharmacokinetics of docetaxel. *Cancer Biol. Ther.* 5: 833-839.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.* 63: 965-981.
- Flacourt E 1642. *Histoire de la Grande Isle de Madagascar : 1642-1660*. In : *Collection des ouvrages anciens concernant Madagascar*. A Grandidier, H Froidevaux, G Grandidier Eds, Paris Union coloniale, VIII, 1913.
- Garin D, Chaulet JF, Robert Y, Chapalain JC, Lemarque D, Peyron F. Paludisme: la résistance à la chloroquine. *Med Trop* 51: 29-35, 1991.
- Gedif T, Hahn HJ 2002. Treatment of malaria in Ethiopian folk medicine. *Trop Doct.*

324, 206-209.

- Gessler MC, Msuya DE, Nkunya MH, Mwasumbi LB, Schar A, Heinrich M, Tanner M. 1995. Traditional healers in Tanzania: the treatment of malaria with plant remedies.
- Gessler MC, Nkunya MHH, Mwasumbi LB, Heinrich M, Tanner M 1994. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Tropica*, 56, 65-77. *J Ethnopharmacol.* 483: 131-144.
- Gokhale NH, Padhye SB, Croft SL, Kendrick HD, Davies W, Anson CE, Powell AK 2003. Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents: 1. Synthesis, X-ray crystal-structures, electrochemistry and antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 95, 249–258.
- Grant Dorsey MD, Monica Gandhi MD, Jessica H. Oyugi MD, Philip J. Rosenthal MD 2000. Difficulties in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Imported Malaria. *Arch. Intern. Med.*, 160, 2505-2510.
- Green MD, Mount DL, Wirtz RA, White NJ. 2000. A colorimetric field method to assess the authenticity of drugs sold as the antimalarial artesunate. *J Pharm Biomed Anal.* 24(1): 65-70.
- Han KS, Woo SJ, Koo CH, Lee MG. 1998. Determination of a chemoprotective agent, 2-allylthiopyrazine, in plasma, urine and tissue homogenates by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 7101-2: 239-242.
- Havet EN. Dissertation sur une maladie qui règne à l'île de Madagascar : conseils hygiéniques à suivre pour l'éviter. Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté de Médecine de Paris, n°124, 1827.
- Haynes RK. Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment? *Curr Opin Infect Dis* 146: 719-726, 2001.
- Hindley S, Ward SA, Storr RC, Searle NL, Bray PG, Park BK, Davies J, O'Neill PM. Mechanism-based design of parasite-targeted artemisinin derivatives: synthesis and antimalarial activity of new diamine containing analogues. *J Med Chem* 455: 1052-1063, 2002.
- Iwu MM and Wootton JC 2002. *Advances in Phytomedicine: Ethnomedicine and Drug Discovery*, 1, Elsevier, 336p.
- Jambou R, Tombo ML, Raharimalala L, Rakotonjanabelo A, Rabe T, Laventure S, Boisier P. Malaria in Antananarivo: evaluation of a post-epidemic situation. *Santé* 84: 257-264, 1998.
- Jeanne I. Malaria and schistosomiasis: 2 examples using systems of geographical information and teledetection in Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 933: 208-214, 2000.
- Jensen JB. 1978. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 276: 1274-1276.
- Kanerva H, Huuskonen H, Alhonen-Raatesalmi A, Nevalainen T, Urtti A. 1998. Pharmacokinetics of deramciclone in dogs after single oral and intravenous dosing and multiple oral dosing. *Biopharm Drug Dispos.* 198: 531-539.

- Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, Schlesinger PH. 1987. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science*. 2384831: 1283-1285.
- Kwiatkowski D, Greenwood BM. 1989. Why is malaria fever periodic? A hypothesis. *Parasitol Today*. 58: 264-266.
- Lambros C, Vanderberg JP. 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 653: 418-420.
- Le Bras J, Deloron P, Hartmann JF, Coulanges P, Dourado HV, Larouze B. 1984. Application of an *in vitro* semi-microtest to the study of drug sensitivity of 66 *Plasmodium falciparum* isolates from 15 countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 784: 485-488.
- Le Bras J, Deloron P, Ricour A, Andrieu B, Savel J, Coulaud JP. 1983b. *Plasmodium falciparum*: drug sensitivity in vitro of isolates before and after adaptation to continuous culture. *Exp Parasitol*. 561: 9-14.
- Le Bras J, Deloron P. 1983a. *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg*. 323: 447-451.
- Le Bras J, Savel J. 1987. Determination of the chemosensitivity of *Plasmodium falciparum*: methodology and interpretation. *Ann Pediatr Paris*. 345: 349-356.
- Lee YC, Kawasaki N, Lee RT, Suzuki N. 1998. Quantum-dye labeled proteins for glycobiology: a viable nonradioactive alternative tracer. *Glycobiology*. 89: 849-856.
- Lemke TL 2002. Antiparasitic agents, in: D.A. Williams, T.L. Lemke Eds., *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, New York, pp. 867–890, Chapter 35.
- Liu M, Wilairat P, Croft SL, Tand AL-C and Goa M-L 2003. Structure–Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 2729–2738.
- Loftsson T, Konradsdottir F, Masson M. 2006. Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *Int J Pharm*.
- MacConnell Bill 2002. Historique du paludisme. *RPH Laboratory Medicine* 1998-2002.
- MacGregor C, Valdes Duron JC, Arias Elenes N, Villafan Sanchez F. 1986. Maternal-infant care as a basic instrument of medical services for the population in developing countries. *Salud Publica Mex*. 283: 265-270.
- Mandavilli A. New tool for fighting malaria and elucidating proteins. In: today's news stories, biomednet news and comment. <http://www.news.bmn/news4th> September 2002.
- Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. 1987. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*. 2354791: 899-901.
- Martiney JA, Cerami A, Slater AF. 1995. Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *J Biol Chem*. 27038: 22393-22398.
- Martiney JA, Ferrer AS, Cerami A, Dzekunov S, Roepe P. Chloroquine uptake, altered partitioning and the basis of drug resistance: evidence for chloride-dependent ionic regulation. *Novartis Found Symp* 226: 265-277, 1999.

-
- Montalvo-Alvarez AM, Landau I, Baccam D, Chabaud AG, Ginsburg H. 1988. Experimental modifications of the circadian rhythm of *Plasmodium vinckei petteri* following cryopreservation; probable resistance of the merozoite to thawing. C R Acad Sci III. 3071: 5-10.
- Mouchet J, Blanchy S. Particularities and stratification of malaria in Madagascar. Santé 56: 386-368, 1995.
- Muregi FW, Chhabra SC, Njagi EN, Lang'at-Thoruwa CC, Njue WM, Orago AS, Omar SA, Ndiege IO 2004. Anti-plasmodial activity of some Kenyan medicinal plant extracts singly and in combination with chloroquine. Phytother. Res., 185, 379-384.
- Mustofa, Valentin A, Benoit-Vical F, Pelissier Y, Kone-Bamba D, Mallie M 2000. Antiplasmodial activity of plant extracts used in West African traditional medicine. J Ethnopharmacol. 731-2, 145-151.
- National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases 2004. The History of Malaria, an Ancient Disease. Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, U.S.A.
- Nelson MA, Bull RJ. 1988. Induction of strand breaks in DNA by trichloroethylene and metabolites in rat and mouse liver *in vivo*. Toxicol Appl Pharmacol. 941: 45-54.
- Neti PV, Howell RW. 2006. Log normal distribution of cellular uptake of radioactivity: implications for biologic responses to radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 47(6): 1049-1058.
- Oduola AM, Omitowoju GO, Gerena L, Kyle DE, Milhous WK, Sowunmi A, Salako LA. 1993. Reversal of mefloquine resistance with penfluridol in isolates of *Plasmodium falciparum* from south-west Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 871: 81-83.
- O'Neill PM, Bray PG, Hawley SR, Ward SA, Park BK. 4-aminoquinolines past, present, and future: a chemical perspective. Pharmacol Ther 771: 29-58, 1998.
- Ospenica D, Angelovski G, Pocsfalvi G, Juranic Z, Zizak Z, Kyle D, Milhouse WK and Solajab BA 2003. Antimalarial and Antiproliferative Evaluation of Bis-Steroidal Tetraoxanes. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 2761–2768: a Malaria Foundation International, <http://www.malaria.org/>; b Wahlgren, M.; Bejarano, M. T. Nature 1999, 400, 506.
- Organisation Mondiale de la Santé - OMS last accessed October 2002. <http://www.who.int/inf-fs/en/InformationSheet01.pdf>, World Health Organization Reports.
- Organisation Mondiale de la Santé - OMS last accessed October 2002. <http://www.who.int/inf-fs/en/InformationSheet01.pdf>, World Health Organization Reports.
- Ortmann R, Wiesner J, Reichenberg A, Henschker D, Beck E, Jomaa H and Schlitzera M 2003. Acyloxyalkyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *In Vivo* Anti-Malarial Activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13, 2163–2166.
- Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. Nature 4046775: 307-310, 2000.
- Pandey AV, Bisht H, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC, Chauhan VS. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. Biochem J
-

- 355Pt 2: 333-338, 2001.
- Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? *Parasitol Today* 4: 112-115, 1988.
- Pearse J. A modern epidemic in the Betsileo province: the « safontany » or « rapo rapo ». *The Antananarivo Annual XXI*: 32-33, 1897.
- Pennisi E 2001. Malaria's beginnings: on the heels of hoes? *Science*, 293, 416-417.
- Peters W, Ekong R, Robinson BL, Warhurst DC, Pan XQ. 1989. Antihistaminic drugs that reverse chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 28658: 334-335.
- Peters W. Chemotherapy and drug resistance in malaria. 2nd Edition, Academic press, London, 1988.
- Peters W. Chemotherapy and drug resistance in malaria. Vol. I and II. Academic Press. London, Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 1100pp, 1987.
- Philipps J, Radloff PD, Wernsdorfer W, Kremsner PG. 1998. Follow-up of the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarials in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*. 58: 612-618.
- Phillipson J. David 1994. Natural products as drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 17-19.
- Pinn G. 2001. Herbal medicine in infectious disease. *Aust Fam Physician*. 30: 681-684.
- Rafatro H, Ramanitrahasimbola D, Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A, Frappier F.: « Reversal activity of the naturally occurring chemosensitizer malagashanine in *Plasmodium* malaria ». *Biochemical Pharmacology*, 59, 1053-1061, 2000a.
- Rafatro H., Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Quetin-Leclercq J., Verbeeck R.K.: "High-performance liquid chromatographic assay of malagashanine in rat plasma and urine and its pharmacokinetic application". *Journal of Chromatography B*, 744, 121-127, 2000b.
- Rakotonjanabelo LA, 1995. Malaria situation in Madagascar. *Santé*, 56, 358-362.
- 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 myrtiloides* vis-à-vis d'antipaludéens. *Rev. Med. Pharmacopée Africaine*. 8, 123-131.
- Randrianarivelosia M, Raharimalala L, Randriamanantena A, Jambou R. Drug resistance of *Plasmodium falciparum* in coastal regions of Madagascar. *Med Trop* 60: 243-249, 2000.
- Randriantsimaniry D. Vector control in the epidemics of the Madagascar highlands. *Santé* 56: 392-396, 1995.
- Rasoanaivo P, Petitjean A, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A. Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar. *J. Ethnopharmacol* 37: 117-127, 1992.

-
- Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urverg S, Frappier F 1996. Recent results on the pharmacodynamics of *Strychnos malgaches* alkaloids. *Santé*, 64, 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* 601: 13-16.
- Rasoanaivo P; RatsimamangaUS; Rafatro H; Ramanitrahambola D; Palazzino G; Galeffi C; Nicoletti M. 1998. Alkaloids of *Hernandia voyronii*: Chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of herveline D. *PLANTA MEDICA*. 641: 58-62,.
- Rasoanaivo Philippe, David Ramanitrahambola, Herintsoa Rafatro, Dina Rakotondramanana, Rahelivololoniaina Baholy ROBIJAONA, Armand RAKOTOZAFY, Suzanne RATSIMAMANGA, Mehdi Labaïed, Philippe Grellier, Lucile Allorge, Lengo Mambu and François Frappier. "Screening extracts of Madagascar plants in search of antiplasmodial compounds". *Phytotherapy Research*, 18, 742-747, 2004.
- Rasolofo A. M. Appréciation des effets du Masy Pagyl (IMRA) sur les maladies parodontales humaines (étude clinique). Thèse de Doctorat en Chirurgie Dentaire, Diplôme d'état, 1987.
- Ratsimamanga US, Rasoanaivo P, Rafatro H, Robijaona B, Rakoto-Ratsimamanga A. 1994b. *In vitro* antiplasmodial activity and chloroquine-potentiating action of three new isoquinoline alkaloid dimers isolated from *Hernandia voyronii* Jumelle. *Ann Trop Med Parasitol* 883: 271-277.
- RATSIMAMANGA US; RASOANAIVO P; MILIJAONA R; RAKOTOARIMANGA J; RAFATRO H; ROBIJAONA B; RAKOTORATSIMAMANGA A; VERDIER F; LEBRAS J. *IN-VITRO* ANTIMALARIAL ACTIVITY, CHLOROQUINE POTENTIATING EFFECT AND CYTOTOXICITY OF ALKALOIDS OF *HERNANDIA-VOYRONII* JUM HERNANDIACEAE. 1994a. *PHYTOTHERAPY-RESEARCH*. 81: 18-21.
- Ratsimamanga US; Rasoanaivo P; Ramiaramanana L; Milijaona R; Rafatro H; Verdier F; Rakoto-Ratsimamanga A; Le Bras J. *In vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thoursii* and *Spirospermum penduliflorum*. *Planta Med*. 586: 540-543, 1992.
- Raynes K. Bisquinoline antimalarials: their role in malaria chemotherapy. *Int J Parasitol* 293: 367-379, 1999.
- Razafimahefa M, Rakotozafy A. *Tari-dàlana ahafantarana ny raokandro Malagasy*. Bibliothèque de l'Académie Malagasy, Antananarivo, Madagascar, 1979.
- Reese RT, Langreth SG, Trager W. 1979. Isolation of stages of the human parasite *Plasmodium falciparum* from culture and from animal blood. *Bull World Health Organ*. 57 Suppl 1: 53-61.
- Rieckmann KH, Mrema JE, Campbell GH. 1978. Malaria immunity induced by infection with cultured parasites of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol*. 644: 750-752.
- Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Meunier B. From mechanistic studies on artemisinin derivatives to new modular antimalarial drugs. *Acc Chem Res* 353: 167-174, 2002.
-

- Roepe PD, Martiney JA. 1999. Are ion-exchange processes central to understanding drug-resistance phenomena? *Trends Pharmacol Sci.* 202: 62-65.
- Rogers DJ, Randolph SE. 2000. The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science.* 289:1763-1766.
- Sanon S, Ollivier E, Azas N, Mahiou V, Gasquet M, Ouattara CT, Nebie I, Traore AS, Esposito F, Balansard G, Timon-David P, Fumoux F 2003. Ethnobotanical survey and *in vitro* antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso. *J Ethnopharmacol.* 86:2-3, 143-147.
- Saul A, Myler P, Elliott T, Kidson C. 1982a. Purification of mature schizonts of *Plasmodium falciparum* on colloidal silica gradients. *Bull World Health Organ.* 60: 755-759.
- Saul A, Myler P, Mangan T, Kidson C. 1982b. *Plasmodium falciparum*: automated assay of erythrocyte invasion using flow cytometry. *Exp Parasitol.* 54: 64-71.
- Schulze H, Korpal M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. 2006. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 107:3868-3875.
- Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD. 1991 Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 16: 249-255.
- Slater AF, Cerami A. 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature.* 355:167-169.
- Snow RW, Craig MH, Deichmann U, le Sueur D. 1999. A preliminary continental risk map for malaria mortality among African children. *Parasitol Today.* 15: 99-104.
- Steele JC, Simmonds MS, Veitch NC, Warhurst DC. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Med* 65: 413-416, 1999.
- Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg.* 64:28-35.
- Suffness M, Cordell GA. The alkaloids. Brossi A ed. Academic press, London 25: 163, 1985.
- Sullivan DJ Jr, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE. *J Biol Chem.* 1998. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. 273:31103-31107.
- Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Drousiotou A, Dangerfield B, Lefranc G, Loiselet J, Piro A, Stoneking M, Tagarelli A, Tagarelli G, Touma EH, Williams SM & Clark AG 2001. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science,* 293, 455-462.
- Tona L, Cimangac RK, Mesia K, Musuamba CT, De Bruyne T, Apers S, Hernans N, Van Miert S, Pieters L, Totté J, Vlietinck AJ 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology,* 93, 27-32.

-
- Tran TH, Day NP, Nguyen HP, Nguyen TH, Tran TH, Pham PL, Dinh XS, Ly VC, Ha V, Waller D, Peto TE, White NJ 1996. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe *falciparum* malaria. *N Engl J Med.*, 3352, 76-83.
- UNDP/World Bank/WHO 2000. Increasing the lifespan of antimalarials. *TDR Research and Training in Tropical Diseases news*, 61, 1-12.
- Vaidya AB, Mather MW. Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist Updat* 35: 283-287, 2000.
- Vangapanduy S, Sachdeva S, Jain M, Singh S, Singh PP, Kaul CL and Jain R 2004. 8-Quinolines conjugated with amino acids are exhibiting potent blood-schizontocidal antimalarial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 239-247.
- Vippagunta SR, Dorn A, Matile H, Bhattacharjee AK, Karle JM, Ellis WY, Ridley RG, Vennerstrom JL. Structural specificity of chloroquine-hematin binding related to inhibition of hematin polymerization and parasite growth. *J Med Chem* 4222: 4630-4639, 1999.
- Ward SA, Bray PG, Hawley SR. 1997. Quinoline resistance mechanisms in *Plasmodium falciparum*: the debate goes on. *Parasitology*. 114 Suppl: S125-136.
- Warsame M, Wernsdorfer WH, Bjorkman A. 1992. Lack of effect of desipramine on the response to chloroquine of patients with chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 863: 235-236.
- Wellems T et Plowe C 2001. Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 770-776.
- Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, Krogstad DJ. 1990. Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*. 3456272: 253-255.
- Willcox ML, Rakotondrazafy E, Andriamanalimanana R, Andrianasolo D, Rasoanaivo P 2004. Decreasing clinical efficacy of chloroquine in Ankazobe, Central Highlands of Madagascar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 311-314.
- World Health Organization - Geneva 1997. La situation du paludisme dans le monde en 1994. *Weekly Epidemiological Record*, 7236, 269-276.
- World Health Organization - Geneva, Suisse 1999. *World Health Report*.
- World Health Organization. World malaria situation. *Weekly epidemiological record* 3: 17-22, 1996.
- Wright CW and Phillipson JD 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytotherapy Research*, 4, 127-139.
- Yapi AD, Mustof M, Valentin A, Chavignon O, Teulade JC, Mallie M, Chapat JP, Blache Y. 2000. New potential antimalarial agents: synthesis and biological activities of original diaza-analogs of phenanthrene. *Chem Pharm Bull Tokyo* 4812: 1886-1889.
- Zucker JR, Campbell CC 1993. Malaria: principles of prevention and treatment. *Infectious Disease Clinics of North America*, 7, 547-567.
-

RÉSUMÉ

L'objectif principal de mes travaux scientifiques est double : tout d'abord, en tant que chercheur, mes activités consistent à contribuer au développement pré clinique d'un futur candidat de médicament antipaludique par la mise en évidence de ses propriétés pharmacologiques. Ensuite, en tant qu'enseignant, le rôle primordial est d'encadrer les travaux de laboratoire des jeunes étudiants d'Université préparant leurs mémoires de fin d'études ou leurs thèses de doctorat par la mise en évidence des effets pharmacologiques des extraits de plantes médicinales.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle pour traiter le paludisme ont été sélectionnées et collectées. Les molécules biologiques capables d'entraver le cycle de développement de l'agent causal de cette maladie ont été extraites puis isolées. Leurs paramètres pharmacologiques (pharmacodynamique et pharmacocinétique), ainsi que leur mode de biotransformation, ont été démontrés utilisant des modèles expérimentaux *in vitro*, *ex & in vivo*. Des travaux de laboratoire ont été aussi réalisés mettant en place des protocoles expérimentaux afin de valoriser quelques plantes médicinales Malagasy et encadrant ainsi des étudiants d'Universités.

La malagashanine a été choisie parmi les dizaines de molécules actives isolées et identifiées au laboratoire. Elle a fait l'objet d'une étude plus poussée. C'est un alcaloïde indolique qui a une structure chimique de type Nb,C(21)-sécocurane. La malagashanine, avec une toxicité faible chez les rongeurs, n'a pas d'activité antiplasmodiale directe bien prononcée ; par contre, elle potentialise principalement l'effet des antipaludéens conventionnels. Une fois administrée dans l'organisme, elle y séjourne pendant une courte période et se transforme au moins en trois types de dérivées.

A la suite de cette étude pharmacologique de malagashanine, d'autres espèces de plantes endémiques de Madagascar ont été explorées : trois molécules actives ont été isolées et leurs structures chimiques seront bientôt dévoilées.

Parallèlement à ces activités de développement médicamenteux, trente et un (31) travaux d'encadrement des étudiants ont été réalisés dont vingt (20) ont abouti à la présentation des mémoires de fin de premier et de second cycle de niveau universitaire, et onze (11) ont conduit à la soutenance des thèses de doctorat d'Université, médical et scientifique. Puis, j'ai été aussi appelé à siéger parmi les membres du Jury lors de la soutenance de onze (11) mémoires de fin d'études.

Les résultats de tous ces travaux ont fait l'objet de vingt sept publications scientifiques de niveau national et international dans lesquels j'ai été auteur ou co-auteur. Ces activités ont été réalisées grâce à la collaboration interinstitutionnelle et multipartite de niveaux national et international, mais aussi aux stages que j'ai effectués et aux formations que j'ai assistées.

En seize années de ma carrière dans la recherche de médicament antipaludique, j'ai pu mettre à la disposition des scientifiques quelques données pharmacologiques sur l'étude pré clinique de la malagashanine. Cette molécule pourrait être proposée, comme médicament adjuvant des antipaludéens conventionnels pour combattre la multi

résistance médicamenteuse des souches plasmodiales en cas de paludisme à répétition ou à la suite d'un échec thérapeutique, et évaluée en phase plus avancée du développement médicamenteux.

Les études pharmacologiques d'autres molécules antiplasmodiales isolées après la découverte de la malagashanine ont été aussi entamées et une quarantaine de jeunes chercheurs a été formée et qui pourraient prendre la relève dans le domaine de l'exploration des plantes médicinales Malagasy.

Mots-clés: Paludisme, Malagashanine, Strychnos de Madagascar, Pharmacodynamie, Pharmacocinétique, In vivo

Encadreur: Professeur RANDIMBIVOLOLONA Fanantenainirainy