

UNIVERSITE PARIS-SUD

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
"FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY"

GROUPE DE FORMATION DOCTORALE PHARMACOCHEMIE

ANNEE 1991 - 1992

SERIE DOCTORAT N ° 233

THESE

présentée

A L'UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE  
UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD  
MENTION SCIENCES PHARMACEUTIQUES

par

Mr Alain FOURNET

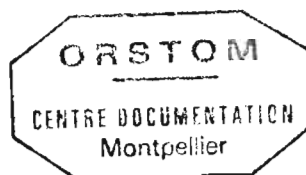
Titre de la thèse:

Plantes médicinales boliviennes antiparasitaires (leishmaniose et maladie de Chagas): *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae), *Pera benensis* Rusby (Euphorbiaceae) et *Ampelocera edentula* Kuhlman (Ulmaceae)

soutenue le 14 Novembre 1991

JURY:           Président : Mr A. CAVÉ  
                  Membres : Mr J. BRUNETON           Rapporteur  
                                  Mr J. C. GANTIER           Rapporteur  
                                  Mr. J. MOUCHET  
                                  Mr P. DESJEUX  
                                  Mr R. HOCQUEMILLER

22 SEP. 1993



076  
PLAMED  
FOU

pas M. Cavé  
h2 70634  
FA ↓ ex BM  
F 38.117

MONSIEUR ANDRÉ CAVÉ  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

qui a bien voulu me faire l'honneur  
de présider le jury de cette thèse,

Monsieur JEAN BRUNETON  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté de Pharmacie d'Angers

Monsieur JEAN-CHARLES GANTIER  
Maître de Conférences en Parasitologie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

A MONSIEUR REYNALD HOCQUEMILLER  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

Monsieur PHILIPPE DESJEUX  
Médecin, Responsable du Programme de Lutte contre les Leishmanioses  
OMS, Genève

Monsieur JEAN MOUCHET  
Entomologiste, Inspecteur Général de Recherche,  
ORSTOM, PARIS

qui ont accepté de juger ce travail.

Qu'ils veuillent bien trouver ici un témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur Reynald HOCQUEMILLER  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

qui a dirigé ce travail avec autant de compétence et  
de dynamisme que d'inlassable bienveillance,

en témoignage de ma profonde reconnaissance et de ma très sincère  
amitié.

A Monsieur André CAVÉ  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

qui m'a accueilli à maintes reprises dans son  
laboratoire et m'a prodigué tant de marques  
d'intérêt,

en témoignage de mon admiration et de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur Philippe DESJEUX  
Médecin, Responsable du Programme de Lutte contre les Leishmanioses  
OMS, Genève

qui m'a accueilli en Bolivie à l'IBBA et qui a toujours  
soutenu avec un grand intérêt ce travail,

en témoignage de ma très vive reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur Jean BRUNETON  
Professeur de Pharmacognosie  
à la Faculté Pharmacie d'Angers

qui m'a prodigué tant de marques d'intérêt,

en témoignage de ma très vive reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur Jean-Charles GANTIER  
Maître de Conférences en Parasitologie  
à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

qui m'a conseillé pour la partie parasitologique de ce  
travail,

en témoignage de ma très vive reconnaissance.

A Monsieur Jean MOUCHET  
Entomologiste, Inspecteur Général de Recherche,  
ORSTOM, PARIS

qui a toujours suivi avec beaucoup d'intérêt nos  
travaux,

en témoignage de ma profonde reconnaissance

Au Padre Martin BAUR  
Père Rédemptoriste à Fatima de Chimanes ( Bolivie)

qui m'a donné l'hospitalité à maintes reprises et qui a favorisé les contacts avec les Chimanes,

Au Padre Christian FREZARD  
Père Rédemptoriste à San Borja (Bolivie)

qui m'a aidé à réaliser ce travail sur le terrain dans de bonnes conditions et qui m'a toujours très bien accueilli,

Aux Docteurs Alcira ANGELO BARRIOS et Victoria MUÑOZ,  
Chercheurs à l'IBBA, La Paz (Bolivie)

sans qui les essais biologiques sur les parasites de la leishmaniose et de la maladie de Chagas n'auraient pas pu être réalisés,

A Monsieur François LE PONT  
Entomologiste,  
ORSTOM, Quito (Equateur)

qui est à l'origine de ces travaux,

A Monsieur François ROBLOT  
Maître de Conférences en Pharmacognosie  
à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

qui m'a guidé et aidé à la détermination des structures chimiques des produits actifs,

A Monsieur Pierre CABALION,  
Directeur de Recherche, ORSTOM

qui m'a toujours soutenu dans ce travail,

A Madame Dominique BOURRET,  
Chargé de Recherche, ORSTOM

qui a favorisé le développement de ce programme,

A Monsieur Claude DEJOUX  
Directeur de Recherche, ORSTOM  
Chef de la Mission ORSTOM de 1985 à 1989

qui a toujours soutenu avec beaucoup d'intérêt nos travaux,

En témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié.

Avant de commencer cet exposé je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé à titres divers:

A La Paz et en Bolivie:

MAXIMILIANO et MIGUEL, les informateurs Chimanes  
Le Docteur Enrique VARGAS, Directeur de l'IBBA  
Monsieur Michel BOURON (San Borja)  
Le Docteur Stefan BECK, Responsable de l'Herbier National de Bolivie, La Paz  
Le Docteur Jim SOLOMON, Représentant du Missouri Botanical Garden  
Le Docteur David SMITH, botaniste à l'Herbier National de Bolivie, La Paz  
Le Docteur Gerardo ANTEZANA, ex-Directeur de l'IBBA  
Mademoiselle Marta AGUILAR, biochimiste à l'IBBA  
Madame Frédérique BRENIERE, immunologiste à l'ORSTOM (IBBA)  
Monsieur Jean-Pierre DEDET, co-directeur de l'IBBA  
Et l'ensemble des personnes de l'IBBA qui ont contribué à différents titres à la réalisation de ce travail.

Au laboratoire de Pharmacognosie de Châtenay-Malabry:

Monsieur André RAIMBAULT pour l'enregistrement des spectres de RMN.

Au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie d'Angers

Monsieur Pascal RICHOMME qui m'a aidé dans la détermination des structures chimiques des quinoléines.

A l'I.I.C.S. (Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud) à Asunción, Paraguay:

La Doctora Antonieta ROJAS DE ARIAS, pour la réalisation des essais biologiques sur le stade trypomastigote de *Trypanosoma cruzi*.

Au laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique:

Le professeur Yves CARLIER pour la réalisation des tests *in vivo* sur *Trypanosoma cruzi*.

Au laboratoire de Botanique de l'Institut Smithsonian de Washington:

Monsieur Christian FEUILLET, botaniste de l'ORSTOM, pour la détermination botanique de *Ampelocera edentula* Kuhl.

A MA FEMME,

dont la compréhension et les encouragements m'ont beaucoup soutenu.

A MES ENFANTS,

A MES PARENTS,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS,

En témoignage de mon affection.

# INTRODUCTION

Les populations natives des régions tropicales possèdent une connaissance de leur pharmacopée traditionnelle et de leur environnement que la recherche biomédicale moderne se devait de valoriser. La recherche de substances d'origine naturelle à activité biologique, basée sur les nosologies et les pharmacopées traditionnelles, est développée dans plusieurs laboratoires dans le monde et tout spécialement par notre équipe à l'Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA) à La Paz, Bolivie, dans le cadre de l'accord de coopération avec cet institut et l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération).

A partir d'enquêtes ethnopharmacologiques, des données chimiotaxonomiques et de l'expérience acquise sur le terrain dans d'autres pays sud-américains, nous avons développé un programme de recherche de nouvelles molécules actives contre les deux principales endémies parasitaires dominantes en Bolivie: les leishmanioses et la maladie de Chagas. La leishmaniose cutanée (espundia) présente des signes cliniques identifiés par les populations natives ce qui facilite la collecte d'informations sur l'emploi des remèdes locaux à base de plantes ou de produits d'origine diverse, généralement corrosifs. Nous avons étendu notre champ d'investigations à la maladie de Chagas, malgré l'absence d'information sur le terrain et le manque de signes cliniques externes, en raison de l'analogie entre les parasites, très voisins d'un point de vue taxonomique.

De telles recherches se justifient par le peu de moyens thérapeutiques existant sur le marché bolivien ou sud-américain, leur coût prohibitif, leur toxicité, leur faible diffusion dans le pays et les difficultés d'effectuer les traitements dans de bonnes conditions hospitalières. Il s'agit donc d'essayer de combler un vide thérapeutique, mais aussi de mettre au point des traitements ambulatoires efficaces, pour faciliter l'extension de la couverture sanitaire en zones sous-médicalisées. Ces maladies touchent en priorité des populations vivant en milieu rural avec de faibles ressources économiques.

L'exploration de la flore bolivienne présente un grand intérêt. Le nombre d'espèces est estimé par les botanistes entre 18000 et 20000. Tous les biotopes y sont représentés, la forêt amazonienne, les régions tropicales du piémont andin, les vallées inter-andines (2000-3000m d'altitude), l'altiplano (plus de 3000m d'altitude) et les régions désertiques et semi désertiques (Chaco et sud de la Bolivie).

Dans le cadre de notre travail, environ 250 plantes ont été testées *in vitro* sur les parasites ce qui représente 1000 extraits préparés et plus de 4000 essais biologiques.

Le plan suivi pour l'exposé de cette étude est le suivant:

- La première partie fait le point sur les leishmanioses et la maladie de Chagas.

- L'approche ethnopharmacologique et les résultats préliminaires sont exposés dans la deuxième partie, de même que tous les protocoles expérimentaux mis en oeuvre pour évaluer l'activité biologique de tous les produits isolés.

Les trois chapitres suivants sont consacrés à l'étude chimique et biologique des trois plantes que nous avons choisies, toutes employées en médecine traditionnelle par les Chimanes pour traiter les leishmanioses cutanéomuqueuses provoquées par le parasite *Leishmania braziliensis* :

- *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae)

- *Pera benensis* Rusby (Euphorbiaceae)

- *Ampelocera edentula* Kulm. (Ulmaceae).



PREMIERE PARTIE

LES LEISHMANIOSES ET  
LA MALADIE DE CHAGAS  
(TRYPANOSOMIASE  
SUD-AMERICAINE)

## LES LEISHMANIOSES

### 1.1. CLASSIFICATION ET CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE DES LEISHMANIOSES DU NOUVEAU MONDE

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires transmises à l'Homme par des petits insectes appelés phlébotomes. La prévalence globale de cette maladie est estimée à 12 millions de personnes touchées dans le monde, avec 400.000 à 2.000.000 de nouveaux cas répertoriés chaque année (Croft, 1988). Cette imprécision est liée au fait qu'il s'agit de maladies touchant essentiellement des populations rurales peu médicalisées.

Les leishmanioses tégumentaires sont connues en Amérique Latine depuis très longtemps. Des représentations de ces maladies ont été découvertes sur des céramiques et des poteries de l'époque pré-colombienne, en particulier de la région de Nazca au Pérou. Quelques unes de ces poteries représentent d'une façon caractéristique des lésions mutilantes de la figure, en particulier des destructions du nez et des lèvres.

Les premières descriptions cliniques datent de l'époque de la conquête espagnole de l'Amérique du Sud au 16<sup>ème</sup> siècle. Fernando de Oviedo en 1535 et Pedro Pizarro en 1571 décrivent une maladie qui touche les indigènes sur la partie orientale de la Cordillère des Andes, dans les vallées chaudes et humides où se cultive la coca.

<i>L. amazonensis</i> .....	Forme diffuse et cutanée
<i>L. braziliensis</i> .....	Espundia
<i>L. chagasi</i> .....	Leishmaniose viscérale
<i>L. guyanensis</i> .....	Pian-bois
<i>L. mexicana</i> .....	Ulcère du chiclero

Tableau N° 1.1 Nom des espèces de leishmanies du Nouveau Monde et leur forme clinique

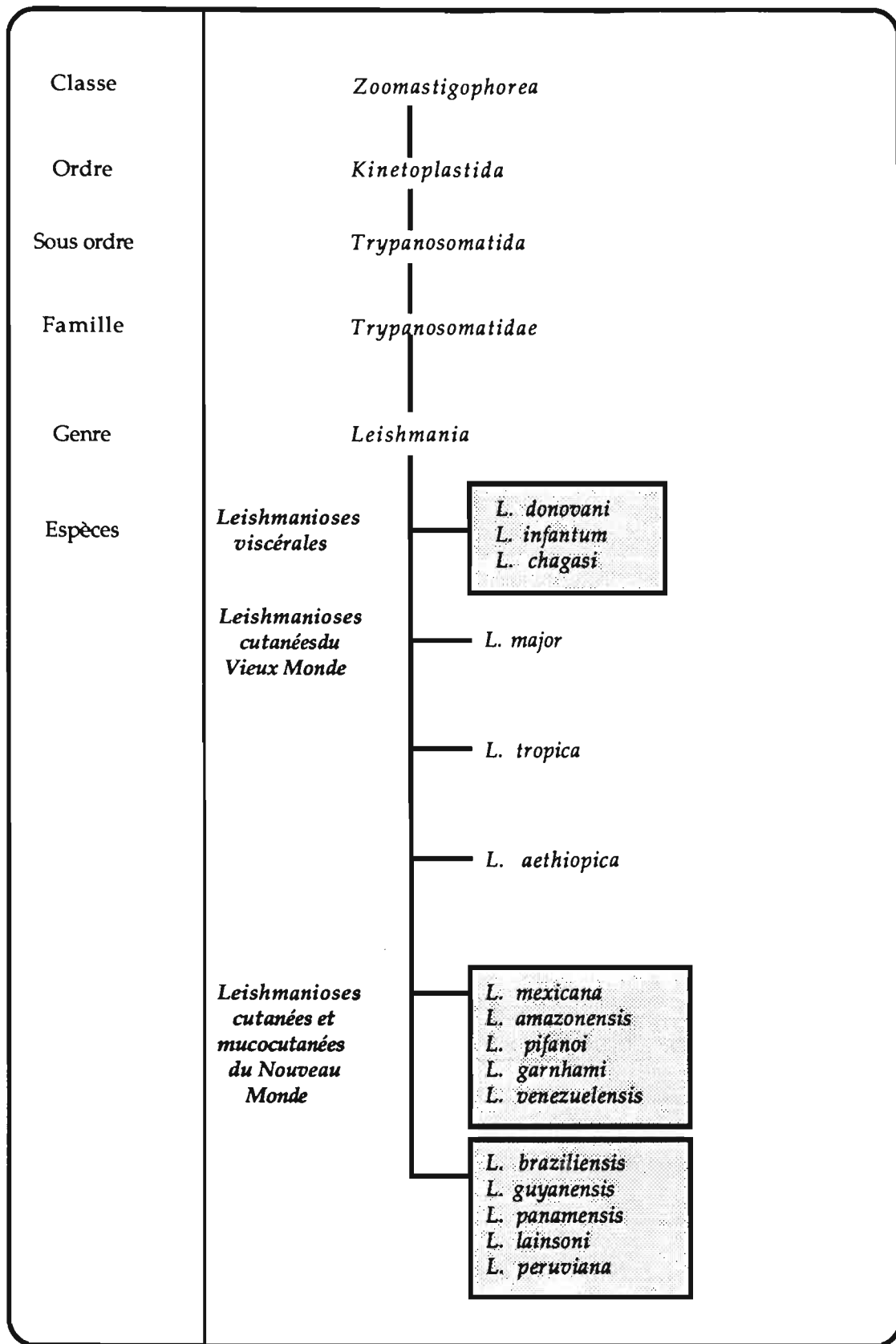


Figure N°1  
 Taxonomie des *Leishmania* ssp d'après Peters et Killick-Kendrick, 1987

### 1.1.1 Taxonomie des espèces du genre *Leishmania* ssp.

Les leishmanioses sont des anthropozoones parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* (Ross, 1903) qui appartiennent à la famille des Trypanosomatidae et sont intégrés à l'ordre des Kinetoplastida (Voir Figure N°1). Ces espèces sont morphologiquement peu différentes. La classification est basée sur des critères cliniques, épidémiologiques, géographiques et biochimiques. Des recherches menées dans divers laboratoires tendent à affiner la classification du genre *Leishmania* en employant des techniques biologiques très sophistiquées (Grimaldi et al., 1989), par exemple, le séquençage de l'ADN (acide désoxyribonucléique), l'utilisation d'anticorps monoclonaux, ou l'hybridation moléculaire d'ADN-ARN (acide ribonucléique).

La caractérisation des espèces par les isoenzymes, méthode plus simple, est utilisée couramment pour identifier les différentes espèces et souches de *Leishmania*.

Nous utiliserons dans ce travail la classification de Peters et Killick-Kendrick (Peters et Killick-Kendrick, 1987).

En Amérique Latine, huit espèces de leishmanies sont reconnues pathogènes chez l'homme (Rioux, 1986) (Grimaldi et al., 1989):

- *Leishmania braziliensis* Viannia, 1911 modifié par Matta, 1916 (= *Leishmania braziliensis braziliensis* (Lainson et Shaw, 1979) = *L. (Leishmania) braziliensis* (Saf'janova, 1982), *L. (Viannia) braziliensis*) (Lainson et Shaw, 1987).

- *Leishmania guyanensis* Floch 1954 (= *L. b. guyanensis* (Lainson et Shaw, 1979), *L. (V.) guyanensis*) (Lainson et Shaw, 1987)

- *Leishmania panamensis* Lainson and Shaw, 1972 (= *L. b. panamensis* (Lainson et Shaw, 1979) = *L. (Lainson) panamensis*) (Lainson et Shaw, 1987)

- *Leishmania lainsoni* Silveira et al., 1987 (= *L. (V.) lainsoni*) (Lainson et Shaw, 1987)

- *Leishmania mexicana* Biagi, 1953 corrigé par Garnham, 1962 (= *L. mexicana mexicana* (Lainson et Shaw, 1979), *L. (L.) mexicana*) (Lainson et Shaw, 1987) (Saf'janova, 1982)

- *Leishmania amazonensis* Lainson et Shaw 1972 (= *L. m. amazonensis* (Lainson et Shaw, 1979) = *L. (V.) amazonensis*) (Lainson et Shaw, 1987) (Saf'janova, 1982)

- *Leishmania venezuelensis* Bonfonte-Garrido 1980 (= *L. m. venezuelensis* (Lainson et Shaw, 1979) = *L. (V.) venezuelensis*) (Lainson et Shaw, 1987)

- *Leishmania chagasi* Cunha and Chagas, 1937 (= *L. donovani chagasi*)



Figure N° 2 Promastigotes (O.M.S., 1982)

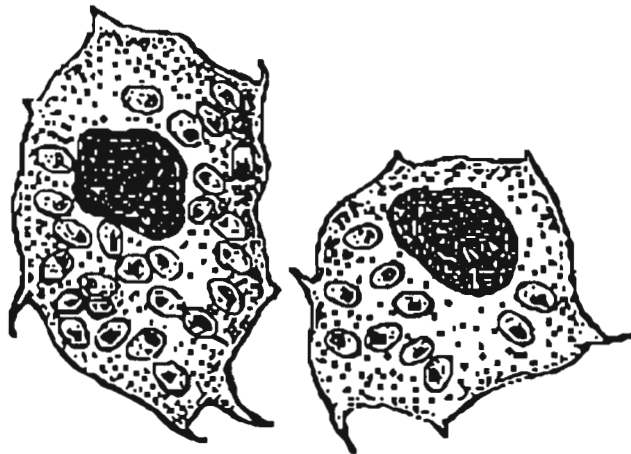


Figure N° 3 Amastigotes dans des macrophages (O.M.S., 1982)



Figure N ° 4 Phlébotome (O.M.S. ,1982)

(Lainson et Shaw, 1979), *L. (L.) chagasi* (Lainson et Shaw, 1987) (Lainson et Shaw, 1987) (Saf'janova, 1982).

### 1.1.2. Morphologie

Les leishmanies se présentent sous deux formes différentes, suivant l'hôte:

- une forme mobile et flagellée, la forme promastigote (Hoare et Wallace, 1966), rencontrée chez le vecteur au niveau du tube digestif; c'est également la forme de culture (Figure N° 2). Les formes promastigotes sont fusiformes de 15 à 25  $\mu\text{m}$  de longueur sur 2  $\mu\text{m}$  de large et mobiles grâce à un flagelle antérieur. Le contour cellulaire est net et le noyau bien visible.

- une forme immobile intracellulaire non flagellée, la forme amastigote (Figure N° 3), rencontrée chez les mammifères et les malades. Ces formes amastigotes ont un aspect ovalaire de deux à six  $\mu\text{m}$  de diamètre. Sur frottis colorés par le May-Grunwald-Giemsa, le cytoplasme apparaît bleu pâle et le noyau rouge violacé est sphérique. A côté du noyau se trouve une structure bacilliforme: le kinétoplaste également présente chez le stade promastigote.

### 1.1.3. Les vecteurs

Les agents vecteurs des leishmanioses sont les phlébotomes, petits insectes diptères nématocères velus de 2 à 3 mm, Psychodidae (Figure N° 4). Ils abondent toute l'année dans les régions tropicales et l'été dans les régions tempérées. Ils se rencontrent jusqu'à 3000 m d'altitude. Les larves se développent sur le sol. Les phlébotomes adultes gâtent toute la journée dans les recoins sombres (terriers, maisons). Seule la femelle est hématophage, sa piqûre est douloureuse. Il existe plus de 600 espèces ou sous-espèces de phlébotomes dans le monde. Une cinquantaine d'espèces sont responsables de la transmission de la maladie. On reconnaît 5 genres principaux (Gentillini et al., 1982): *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia*. Deux de ces genres sont identifiés comme vecteur de la leishmaniose; le genre *Phlebotomus* dans le Vieux Monde et le genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde. La taxonomie du genre *Lutzomyia* est complexe et sujette à de très nombreuses variations selon les auteurs. Le genre *Lutzomyia* est responsable de la transmission de la plupart des leishmanioses sud-américaines.



Figure N° 5

Distribution géographique dans le Nouveau Monde des leishmanioses cutanées associées aux parasites du complexe *Leishmania braziliensis* (Grimaldi et al., 1989)

### 1.1.4. Les réservoirs

Les réservoirs des leishmanioses sont les animaux domestiques comme le chiens ou les animaux sauvages (rats, rongeurs, loirs, agoutis, fourmiliers, sarigues, paresseux, singes, renards etc...). Un animal est reconnu comme réservoir s'il représente dans le milieu naturel une source de contamination pour les phlébotomes. La proportion de ce type d'animal infesté doit être importante pour qu'il soit reconnu comme réservoir. Les animaux sauvages ne montrent pas en général des symptômes cliniques, par contre le chien meurt de leishmaniose par la multiplication des parasites dans ses viscères, foie et rate.

## 1.2. ASPECTS CLINIQUES ET REPARTITIONS GEOGRAPHIQUES DES LEISHMANIOSES DU NOUVEAU MONDE

### 1.2.1. Les leishmanioses tégumentaires

La gravité des leishmanioses cutanées du Nouveau Monde se situe dans son caractère récidivant, diffus (leishmanioses cutanées diffuses) et mutilant (leishmaniose mucocutanée).

#### LEISHMANIOSES CUTANÉES DU COMPLEXE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* (Voir distribution géographique Figure N° 5)

*Leishmania braziliensis* et ses variants sont les parasites que l'on rencontre le plus souvent dans le Nouveau Monde. C'est l'agent de "l'espundia", que l'on trouve en Bolivie (Desjeux et al., 1986a; Le Pont et Desjeux, 1986), au Brésil, en Colombie, en Equateur, au Paraguay, au Pérou, au Nord de l'Argentine et dans six pays d'Amérique Centrale, le Belize, le Costa-Rica, le Nicaragua, le Guatemala, le Honduras et le Panama. Les réservoirs domestiques et selvatiques les plus connus de *L. braziliensis* sont le chien et probablement les rongeurs. *Lutzomyia wellcomei* est le principal vecteur de *L. braziliensis* au Brésil, d'autres espèces ont été identifiées comme vecteurs, par exemple *Lutzomyia yucumensis* et *L. llanosmartins* en Bolivie (Caillard et al., 1986; Le Pont et Desjeux, 1986).

L'espundia touche en Bolivie les zones rurales des régions tropicales de colonisation du piémont andin, les Yungas et l'Alto-Beni dans les départements de La Paz et du Beni, le Chaparé dans les départements de Cochabamba et de





Figure N° 6  
Leishmaniose cutanée (*Leishmania braziliensis*):  
aspect caractéristique du "nez de tapir" (Yungas, Bolivie,  
d'après Photo de P. DESJEUX)

Santa-Cruz et au Nord du pays, dans le département du Pando.

Les signes cliniques peuvent apparaître après une courte incubation d'une vingtaine de jours. La lésion initiale est constituée d'une ulcération cutanée peu douloureuse avec les bords relevés. Il est possible de rencontrer des lésions multiples sur le corps. La surinfection bactérienne des lésions est fréquente, ce qui favorise la croissance rapide de celles-ci.

Des mois ou des années après la cicatrisation peuvent survenir des lésions étendues et mutilantes. Elles se caractérisent par l'affection des cartilages du nez donnant l'aspect du nez de tapir (Figure N° 6) ou de l'oreille, des lèvres, des muqueuses, de l'oropharynx, voire de la trachée. Parfois il se produit une perforation ou une destruction totale du septum nasal.

*Leishmania guyanensis* et ses variants ont été identifiés dans les Guyanes, dans le bassin amazonien du Brésil et en Colombie. Le réservoir est constitué du fourmilier, du paresseux et de rongeurs. Le vecteur de *L. guyanensis* est *Lutzomyia umbratilis*. Le tableau clinique des infections à *L. guyanensis* se nomme "pian-bois" (Tableau N° 1.1.). Il se présente sous la forme d'une lésion ulcéreuse parfois recouverte d'une croûte. Des lésions multiples peuvent se rencontrer sur le même malade. Elles sont particulièrement réfractaires aux traitements et risquent de provoquer des résurgences.

*Leishmania panamensis* et ses variants ont été identifiés en Amérique Centrale (Figure N°5), au Costa Rica, au Honduras, au Nicaragua et au Panama, mais aussi en Colombie et sur la côte Pacifique de l'Equateur. Cette espèce est très semblable à *L. guyanensis*. *L. panamensis* a été identifié chez les paresseux, les rongeurs et de nombreux mammifères notamment des singes (Herrer et al., 1973). Le vecteur de transmission est *Lutzomyia trapidoi*. Cette leishmaniose cutanée touche essentiellement les forestiers. L'aspect clinique se différencie peu de celui du "pian-bois". Une affection muqueuse n'est pas rare.

*Leishmania peruviana*, décrite et isolée au Pérou chez des patients touchés par l'"uta". Celle-ci est l'unique leishmaniose cutanée des régions désertiques de la côte Pacifique des Andes. *L. peruviana* serait d'après certains auteurs (Grimaldi et al., 1989) un variant de *L. braziliensis* et n'est pas encore officiellement reconnue comme une espèce à part entière. L'uta est une forme non évolutive. Le réservoir connu est le chien et le vecteur *Lutzomyia verrucanum*. L'ulcération est unique et touche en majorité les enfants.



Figure N° 7  
 Distribution géographique dans le Nouveau Monde des leishmanioses cutanées  
 associées au complexe *Leishmania mexicana* (Grimaldi et al., 1989)

LES LEISHMANIOSES CUTANÉES DU COMPLEXE *LEISHMANIA MEXICANA* (Voir distribution géographique Figure N° 7)

*Leishmania mexicana* et ses variants ont été isolés à Belize, en Colombie, au Mexique (Yucatan), mais aussi en Amérique Centrale. Au moins cinq espèces de rongeurs constituent le réservoir. Le vecteur de cette espèce est *Lutzomyia olmeca*.

Cette leishmaniose est connue sous le nom de "l'ulcère du chiclero" qui touche les récolteurs de chicle, le latex extrait du sapotier qui sert à la fabrication du chewing-gum. La lésion se situe souvent à l'oreille, elle se guérit spontanément, mais laisse une cicatrice ou une destruction du pavillon de l'oreille.

*Leishmania amazonensis* se rencontre en Amérique du Sud, en Bolivie (Grimaldi et al., 1987), au Brésil, en Colombie, en Equateur, en Guyane Française, au Pérou et au Vénézuéla. Cette espèce de leishmanie a été isolée en Amérique Centrale au Costa Rica et au Panama. Le réservoir est constitué de rongeurs. Le vecteur de cette espèce est *Lutzomyia flaviscutellata*. L'homme est rarement infecté par cette souche. L'infection par *Leishmania amazonensis* provoque une affection cutanée diffuse et grave. Cliniquement elle se caractérise par des épaissements de la peau (plaques, papules ou nodules) largement disséminés surtout sur la face. Le traitement est difficile, les lésions ne guérissent pas spontanément.

*Leishmania venezuelensis* a été isolée dans les états de Lara et Yaracuy au Vénézuéla (Bonfante-Garrido et al., 1987). Cette espèce est très proche de *L. mexicana*, espèce à laquelle elle était rattachée avant son identification (Bonfante-Garrido, 1983). L'infection par *L. venezuelensis* se produit en milieu urbain. Elle provoque de graves lésions particulièrement mutilantes et difficiles à traiter.

Récemment, une nouvelle espèce de leishmanie cutanée pathogène chez l'Homme a été décrite et isolée au Nord du Brésil dans l'état de Para, *Leishmania lainsoni* (Silveira et al., 1987). Six cas associés à une infection par *L. lainsoni* ont été rapportés (Silveira et al., 1987).

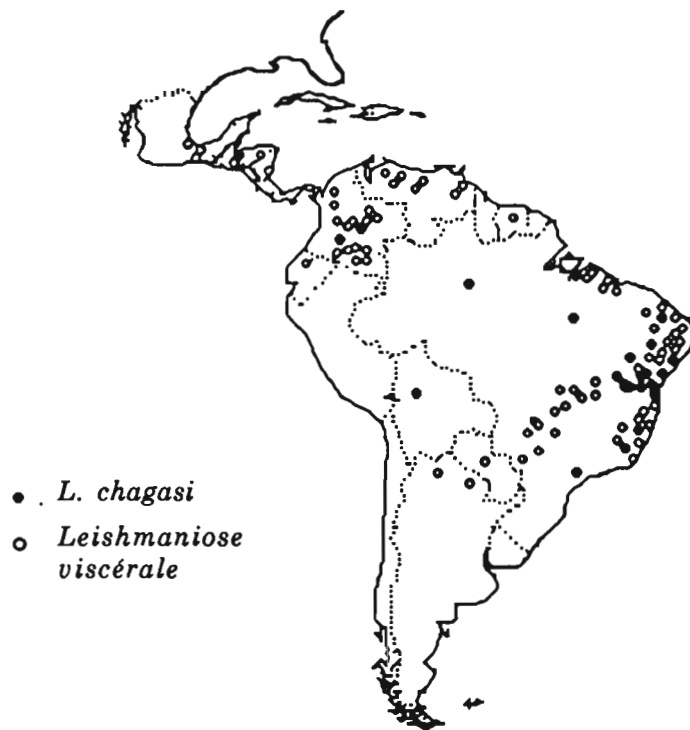


Figure N° 8  
Distribution géographique de la leishmaniose viscérale associée à *Leishmania chagasi* dans le Nouveau Monde (Grimaldi et al., 1989)

### 1.2.2. Les leishmanioses viscérales

En Amérique (Figure N° 8), la forme décrite comme *L. chagasi* est indifférenciable de *L. infantum* par les techniques immunoenzymatiques (Kreier, 1977). On pense qu'elle a été importée d'Europe par les chiens venus avec les premiers conquérants du continent sud-américain. Les premiers cas furent décrits au Paraguay (Killick-Lendrick et al., 1980). Depuis d'autres cas furent identifiés dans des petits foyers isolés, en Bolivie (Desjeux et al., 1986b), en Argentine, en Colombie, au Guatemala, au Salvador au Honduras, au Mexique et au Venezuela. Seul le Brésil présente dans la région du Nordeste un foyer important dans l'état de Ceara (Deane et Deane, 1962). Le nombre de chiens malades est de 10 à 100 fois supérieur au nombre de cas humains.

Les leishmanioses viscérales se rencontrent sur tous les continents exceptées l'Océanie (Figure N° 9).

Deux formes doivent être distinguées dans le monde :

- *Leishmania donovani* agent de la leishmaniose de transmission interhumaine qui touche l'Inde et l'Est de l'Afrique.
- *Leishmania infantum* qui s'étend de la Méditerranée à la Chine et infecte le chien. L'Homme se contamine lors d'un cycle domestique.

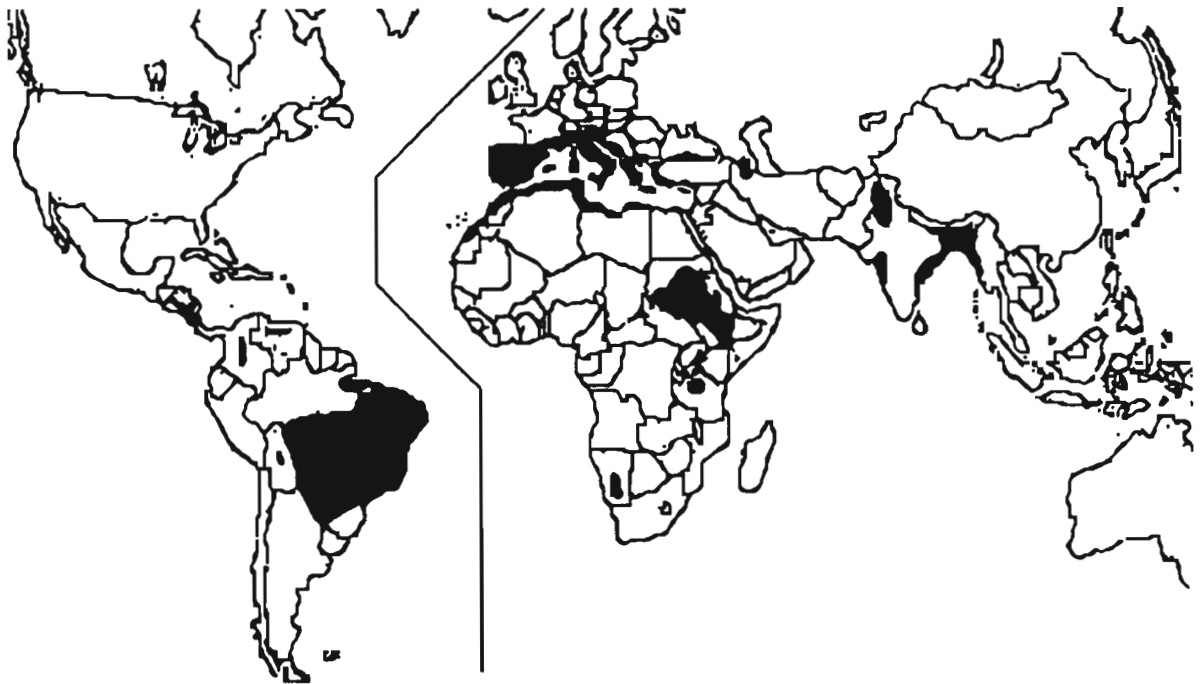


Figure N° 9  
Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde  
(en sombre) (OMS, 1982)

Modèles expérimentaux	Activité	Référence
(1) <i>In vitro</i>		
<i>L. major</i> promastigotes	Faible activité	Berman et Wyler, 1980
<i>L. pifanoi</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. enriettii</i> promastigotes	Activité à hautes concentrations, 20 000 µg.ml <sup>-1</sup>	Jimenez et Ercoli, 1965
<i>L. donovani</i> promastigotes	Inactif, faible activité	Berman et Wyler, 1980; Narain et Dhutta, 1978; Khateeb et Molan, 1977.
<i>L. donovani</i> , <i>L. mexicana</i> amastigotes lignée cellulaire	Activité modérée à haute concentration, 5 200-10 000 µg.ml <sup>-1</sup>	Mattock et Peters, 1975
<i>L. major</i> amastigotes macrophages humains	ED <sub>50</sub> 3 µg Sb <sup>5+</sup> .ml <sup>-1</sup>	Berman et Wyler, 1980
<i>L. donovani</i> amastigotes, macrophages humains	ED <sub>50</sub> 5 µg Sb <sup>5+</sup> .ml <sup>-1</sup>	Berman et Wyler, 1980
<i>L. infantum</i> amastigotes, macrophages humains	ED <sub>50</sub> 8,1-11,4 µg Sb <sup>5+</sup> .ml <sup>-1</sup>	Neal et Matthews, 1982
(2) <i>In vivo</i>		
<i>L. major</i> , souris	Retard du développement de la lésion, ED <sub>50</sub> 305 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Neal, 1964; Neal, 1968
<i>L. major</i> , souris	Retard du développement de la lésion, ED <sub>50</sub> 315 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Trotter et al., 1980b
<i>L. major</i> , souris	Retard du développement de la lésion, ED <sub>50</sub> 40 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Bjorvatn et Nevath, 1979
<i>L. mexicana</i> , souris	Actif à 40 mg Sb <sup>5+</sup> kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Neal, 1976
<i>L. amazonensis</i> , souris	ED <sub>50</sub> 8,7-17 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Trotter et al., 1980b
<i>L. mexicana</i> , hamster	Très actif	Beveridge et al., 1980
<i>L. panamensis</i> , hamster	Très actif	Beveridge et al., 1980
<i>L. braziliensis</i> , hamster	Activité suivant les souches	Beveridge et al., 1980
<i>L. enrietti</i> , cobaye	Actif 400-125 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5 ou 8	Brener, 1960; Neal et Miles, 1977
<i>L. donovani</i> , souris	Activité à dose unique ED <sub>50</sub> 65 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> , 22,5 mg Sb <sup>v</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Trotter et al., 1980a
<i>L. donovani</i> , hamster	Très actif à 40 mg Sb <sup>5+</sup> .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 6	Reather et al., 1978
<i>L. donovani</i> , hamster	Très actif à 50-125 mg.Sb <sup>5+</sup> kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Reather et al., 1978

Tableau N° 1.2  
 Activité du stibogluconate de sodium (Pentostam<sup>R</sup>)  
 sur les modèles expérimentaux (Neal , 1987)

### 1.3. CHIMIOTHERAPIE DES LEISHMANIOSES

Les traitements employés contre les leishmanioses font appel à des produits généralement toxiques (antimoniés ou autres), peu maniables, (administration parentérale, effets secondaires importants, hospitalisation souvent nécessaire), peu abordables économiquement pour les populations atteintes de leishmaniose, et très peu diffusés. Bien que des progrès aient été réalisés pour la mise au point de nouveaux médicaments, le traitement des leishmanioses ne donne toujours pas entière satisfaction. Il existe aussi de nombreux cas de résistance au traitement ou de rechute. D'importantes recherches sont entreprises et continuent d'intéresser de nombreux laboratoires.

Dans ce paragraphe consacré à l'inventaire des thérapeutiques, nous ferons l'inventaire des médicaments couramment utilisés ou occasionnels pour traiter les leishmanioses et également ceux qui font l'objet d'une évaluation pharmacologique dans les laboratoires de recherche.

#### 1.3.1. PRODUITS D'UTILISATION COURANTE

##### 1.3.1.1. Les produits antimoniés

Les deux médicaments les plus couramment employés sont des antimoniés pentavalents, le Pentostam<sup>R</sup> mis sur le marché en 1947 et le Glucantime<sup>R</sup> commercialisé pour la première fois en 1950.

Le premier, le stibogluconate de sodium ou Pentostam<sup>R</sup> de Wellcome Foundation en Grande Bretagne, est employé essentiellement dans les pays anglophones (Berman, 1988).

Le second, l'antimonié de méglumine ou Glucantime<sup>R</sup> de Rhône Poulenc, est utilisé dans les pays francophones et hispanophones.

Ces deux produits sont de structure chimique voisine (voir Figure N° 10), leur teneur en antimoine pentavalent est presque identique, 8,5 % de Sb<sup>5+</sup> (85 mg.ml<sup>-1</sup>) pour le Glucantime<sup>R</sup> et 10 % environ de Sb<sup>5+</sup> (100 mg.ml<sup>-1</sup>) pour le Pentostam<sup>R</sup> (OMS, 1982). Ils ont une toxicité et une efficacité comparables dans les traitements des leishmanioses cutanées et viscérales (voir activité biologiques Tableaux N° 1.2. et 1.3.).



Modèles expérimentaux	Activité	Référence
(1) <i>In vitro</i> <i>L. enrietti</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. pifanoi</i> promastigotes <i>L. donovani</i> promastigotes	Actif à très fortes concentrations 50 000-100 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ED50 1,39-5,91 $\mu\text{g Sb}^{5+}.\text{ml}^{-1}$	Jimenez et Ercoli, 1965 Neal et Matthews, 1982
(2) <i>In vivo</i> <i>L. major</i> , souris <i>L. enrietti</i> , cobaye <i>L. donovani</i> , souris <i>L. donovani</i> , hamster <i>L. donovani</i> , chien	ED50 320 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$ Actif à 375 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$ Actif à 1 g $\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 10$ ED50 11.6 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$ Suppression de 99 % des amastigotes à 104 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 4$ Faible activité à 50 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 6$ Suppression de 83 % des amastigotes à 104 mg $\text{Sb}^{5+}.\text{kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$	Trotter et al., 1980b Brener, 1960 Ercoli et Coelho, 1967 Trotter et al., 1980a Hanson et al., 1977 Reather et al., 1978 Chapman et al., 1979

Tableau N°1.3  
Activité de l'antimoniote de méglumine ( Glucantime<sup>R</sup>)  
sur plusieurs modèles expérimentaux (Neal , 1987)

Médicaments couramment employés pour traiter les leishmanioses	<i>L. donovani</i> (Nahain et Dhutta, 1978)	<i>L. tropica</i> (McMillan, 1960)	<i>L. braziliensis</i> (Jimenez et Ercoli, 1965)
Antimoniote de méglumine	-	-	>50 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Amphotéricine B	<0,97 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	<0,2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Stibogluconate de sodium	>4 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	-	>200 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Tableau N° 1.4  
Activité *in vitro* des médicaments couramment employés pour traiter les leishmanioses (Neal, 1987)

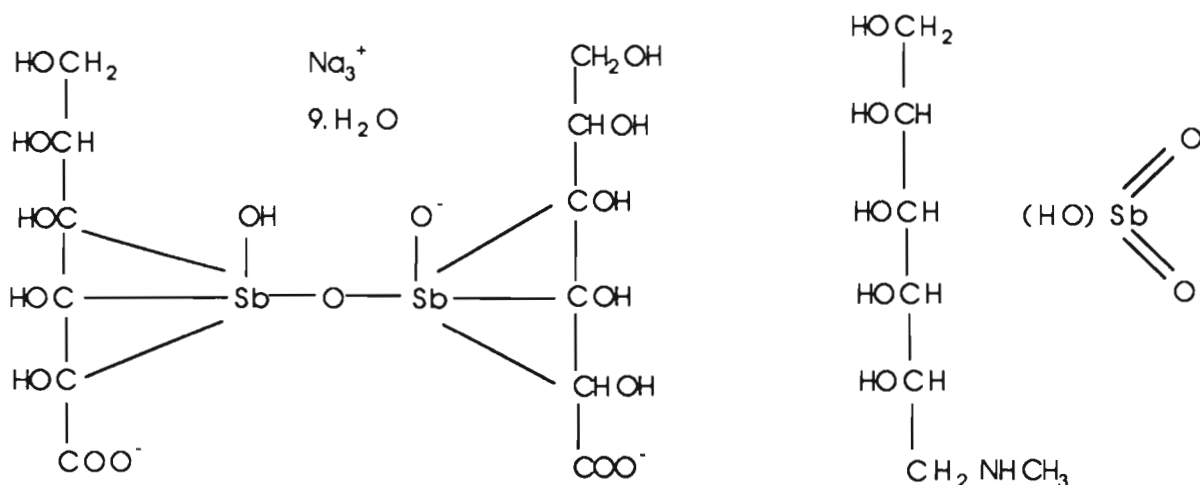


Figure N° 10  
Stibogluconate de Sodium (Pentostam<sup>R</sup>) et antimoniate de méglumine  
(Glucantime<sup>R</sup>)

### PRESENTATION

Le Glucantime<sup>R</sup> se présente en ampoule de 5 ml de solution aqueuse à 30% en boîtes de 10. Chaque ampoule renferme 1,50 g de Glucantime<sup>R</sup>, correspondant à 0,425 g d'antimoine (85 mg.Sb<sup>5+</sup>.ml<sup>-1</sup>).

Le Pentostam<sup>R</sup> ou Solustibosan<sup>R</sup> est conditionné en ampoules de 1 ml contenant 100 mg d'antimoine.

### INDICATIONS

Les dérivés antimoniés pentavalents tels que le Glucantime<sup>R</sup> et le Pentostam<sup>R</sup> sont les traitements de premières intentions dans la plupart des leishmanioses cutanées, cutanéomuqueuses ou viscérales.

Il apparaît de plus en plus de cas de résistance aux antimoniés pentavalents. Une étude récente au Pérou, dans la région de Cuzco, sur 29 patients atteints de leishmaniose muqueuse ( Franke et al., 1990), a montré les limites de l'efficacité du stibogluconate de sodium sur ce type de lésions sévères provoquées par une infection avec *L. braziliensis*. Finalement 67 % des malades étaient complètement guéris cliniquement après un traitement à 20 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pendant 28 jours et 33 % furent incomplètement guéris.

Cette résistance aux antimoniés a également été constatée chez les malades atteints de leishmaniose viscérale et traités avec ces produits, notamment en Inde.

### POSOLOGIE, MODE D'EMPLOI

La dose usuelle est de  $60 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , chez l'adulte pendant 10 à 15 jours consécutifs. Chez l'enfant des doses plus élevées sont nécessaires, elles sont en général bien tolérées ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Après une pose de 15 jours environ, le traitement peut être renouvelé. Des doses réduites au quart pour la première injection et à moitié pour la deuxième permettent de tester la sensibilité du malade et une éventuelle intolérance ou allergie à l'antimoine.

L'administration de ces médicaments est uniquement parentérale, en intramusculaire profonde ou en injection péri-lésionnelle. L'élimination urinaire est presque totale dans les premières vingt quatre heures, mais il y a une accumulation progressive dans l'organisme d'où la nécessité de faire des poses au cours du traitement.

### EFFETS INDESIRABLES

- Réactions d'intolérance immédiate (fièvre, frissons, toux, myalgies, éruptions cutanées).

- Réactions d'intoxication, plus tardives et sévères (fièvre, polynévrites, manifestations cardiaques, hépatiques et rénales). Elles sont assez rares si les conditions d'utilisation sont respectées.

### CONTRE-INDICATIONS

Atteintes rénales (recherche systématique d'une protéinurie avant le traitement), affections cardiaques et tuberculose pulmonaire.

### 1.3.1.2. La pentamidine

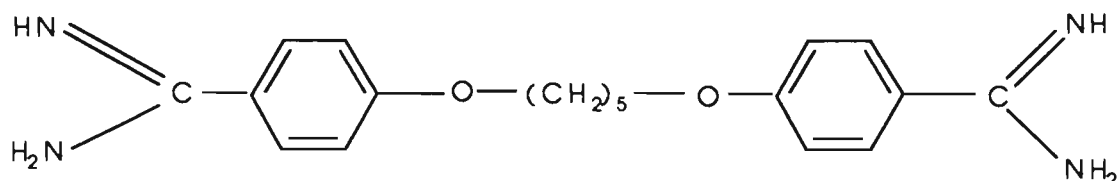


Figure 11 Formule chimique de la Pentamidine ou bis (carbonamido-4-phénoxy)-1,5 pentane

La pentamidine est un dérivé des diamines aromatiques, synthétisée dans les années 1930 lors de recherches de nouveaux agents thérapeutiques pour traiter la trypanosomiase africaine (Lourie et Yorke, 1939; Yorke, 1940). Suite à des essais cliniques, la pentamidine, la propamidine et la stilbamine (diamines aromatiques) ont confirmé leur efficacité aux différents stades de la maladie du sommeil (Harding, 1945) et contre la leishmaniose viscérale (Kirk et Sati, 1940). Depuis 1967 la pentamidine est considérée comme le médicament de base pour le traitement des infections dues à *Trypanosoma gambiense*, la maladie du sommeil (Sand et al., 1985). En 1958, pour la première fois, l'efficacité de la pentamidine fut signalée pour traiter les infections provoquées par *Pneumocystis carinii* (Ivady et Paldy, 1958). La pentamidine et ses dérivés voient croître leur intérêt du fait que cette dernière infection est généralement liée au SIDA (Jones et al., 1990; Monk et Benfield, 1990).

Une étude récente sur l'activité biologique de la pentamidine et trente six de ses analogues a montré, une bonne efficacité *in vitro* de ces produits sur *Plasmodium falciparum* (Bell et al., 1990).

Deux sels de pentamidine sont commercialisés, l'isethionate de Aldrich Chemical et May & Baker sous le nom de Pentamidine<sup>R</sup>, et le mésylate par Specia sous le nom de Lomidine<sup>R</sup>.

### PRESENTATION

La Lomidine<sup>R</sup> se présente en solution prête à l'emploi, en ampoules de 3ml (boîtes de 5 ampoules): 1 ml de solution contenant 40 mg de pentamidine base.

Modèle expérimentaux	Activité	Référence
(1) <i>In vitro</i> <i>L.enrietti</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. tropica</i> promastigotes	Actif à 125-1 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Jimenez et Ercoli, 1965
<i>L.major</i> amastigotes (lignée cellulaire)	Activité modérée à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Mattock et Peters, 1975
<i>L.major</i> amastigotes macrophages humains	ED <sub>50</sub> 0,03 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Berman et Wyler, 1980
<i>L. mexicana</i> amastigotes (lignée cellulaire)	Activité modérée à 20-50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Mattock et Peters, 1975
<i>L. donovani</i> amastigotes macrophages humains	ED <sub>50</sub> 0,02 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Berman et Wyler, 1980
<i>L. donovani</i> amastigotes infectant lignée cellulaire	Inactif à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Mattock et Peters, 1980
(2) <i>In vivo</i> <i>L. major</i> , souris	Inactif à 50 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$	Trotter et al., 1980b
<i>L. mexicana amazonensis</i> , souris	Inactif à 50 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$	Trotter et al., 1980b
<i>L. donovani</i> , souris	Inactif à la dose maximum tolérée 50 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 5$	Trotter et al., 1980a
<i>L. donovani</i> , hamster	Efficace à 50, 25 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 6$ Inhibition de 57 % des amastigotes à 52 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \times 4$ Aucune activité	Mieth, 1966 Hanson et al., 1977 Reather et al., 1978

Tableau N° 1.5  
Activité de la pentamidine sur les modèles expérimentaux (Neal , 1987)

## INDICATIONS

La pentamidine est indiquée pour le traitement de la leishmaniose viscérale, et aussi parfois des leishmanioses mucocutanées dans le cas de résistance aux antimoniés.

## POSOLOGIE, MODE D'EMPLOI

La Lomidine<sup>R</sup> ou Pentamidine<sup>R</sup> est administrée par voie intramusculaire, à la dose de 3 à 5 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>, un jour sur deux, en série de 6 à 8 injections au moins, pour traiter les leishmanioses cutanées (Drillaud, 1987). Ces injections doivent être effectuées chez le malade couché.

## EFFETS INDESIRABLES

- Locaux: au point d'injections, douleurs, indurations, abcès stériles,
- Généraux: nausées, vomissements, douleurs abdominales, hypotension artérielle, syncope, hypoglycémie, et aussi apparition tardive d'un diabète sucré parfois irréversible qui n'est pas exceptionnel. Cet inconvénient serait moins fréquent avec l'isethionate de pentamidine (Belehu et Naafs, 1981).

D'autres diamidines ont fait l'objet de tests biologiques sur des leishmanies sur divers modèles expérimentaux *in vitro* ou *in vivo*, tels que la propamidine (Hanson et al., 1966), la phénémidine, la stilbamine, l'hydroxystilbamine (Hanson et al., 1977; Reather et al., 1978) et l'acéturate de diminazène (Mieth, 1966; Peters et al., 1980a. Peters et al., 1980b). Certaines de ces diamines ont montré une activité intéressante, mais la pentamidine reste la seule diamine aromatique employée couramment pour le traitement des leishmanioses viscérales ou cutanées (voir activité de la pentamidine, tableau N° 1.5).

Modèle expérimentaux	Activité	Référence
(1) <i>In vitro</i> <i>L. enrietti</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. pifanoi</i> promastigotes	Actif à 40 µg.ml <sup>-1</sup>	Jimenez et Ercoli, 1965
<i>L. tropica</i> promastigotes	Actif à 40 µg.ml <sup>-1</sup>	Lamy et al., 1966
<i>L. donovani</i> promastigotes	Actif à 0,97 µg.ml <sup>-1</sup>	Narain et Dutta, 1978
<i>L. donovani</i> amastigotes infectant des macrophages de souris	Actif à 5 µg.ml <sup>-1</sup>	Lamy et al., 1966
<i>L. mexicana</i> , <i>L. donovani</i> amastigotes infectant lignée cellulaire (sarcome de chien)	Très actif à 10,5 µg.ml <sup>-1</sup>	Mattock et Peters, 1975
<i>L. tropica</i> , <i>L. donovani</i> amastigotes infectant lignée cellulaire (monocyte humain)	ED <sub>50</sub> 0,2-0,3 µg.ml <sup>-1</sup>	Berman et Wyler, 1980
(2) <i>In vivo</i> <i>L. major</i> , souris	Retarde le développement des lésions à 400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 14 ED <sub>50</sub> approximative de 135 mg kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Bjorvatn et Neva, 1979 Trotter et al., 1980b
<i>L. donovani</i> , souris	ED <sub>50</sub> 11,0 mg .kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> x 5	Trotter et al., 1980a

Tableau N°1.6  
Activité de l'amphotéricine B sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)

### 1.3.1.3. L'amphotéricine B (Fungizone<sup>R</sup>)

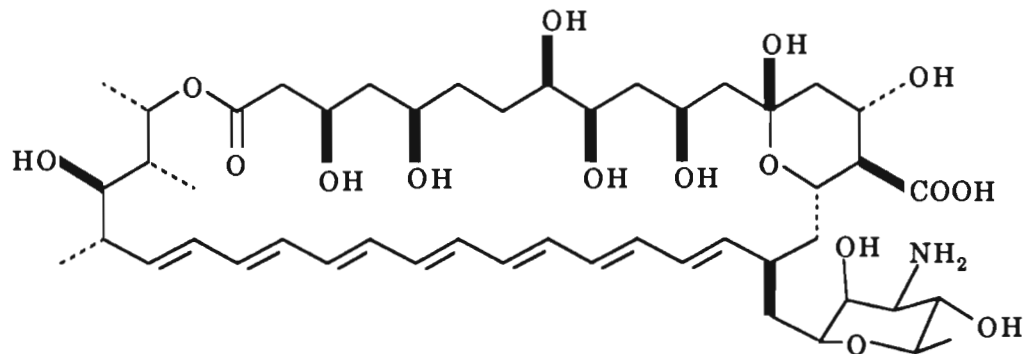


Figure N°12

Formule chimique de l'amphotéricine B

#### PRESENTATION

L'amphotéricine B est un antibiotique extrait de cultures de *Streptomyces nodosus* et commercialisé sous le nom de Fungizone<sup>R</sup> par les laboratoires Squibb (USA).

Au contraire des dérivés antimoniés, il n'y a aucune difficulté pour démontrer l'activité de l'amphotéricine B sur les promastigotes et amastigotes de leishmanies *in vitro* et *in vivo* (Tableaux N° 1.4. et 1.6.).

Le produit se présente sous forme d'une poudre blanche pour préparation injectable en flacon unitaire de 50 mg.

#### INDICATIONS

Elles sont réservées aux formes graves, résistantes aux antimoniés et aux diamines, essentiellement pour les leishmanioses cutanéomuqueuses (espundia) provoquées par *L. braziliensis*.

Ce traitement nécessite de bonnes infrastructures hospitalières et l'attention d'un personnel médical compétent pour effectuer les perfusions. Ces conditions sont hélas rarement réunies dans les zones d'endémies de la leishmaniose cutanéomuqueuse.



Composé	Activité	Référence
Allopurinol	Actif: <i>L. braziliensis</i> promastigotes Actif : <i>L. donovani</i> , <i>L. mexicana</i> promastigotes Faible activité: <i>L. donovani</i> , souris Actif: <i>L. braziliensis panamensis</i> , singes	Pfaller et Marr, 1974 Marr et Berens, 1977 Peters et al., 1980a Walton et al., 1983
Oxypurinol	Faible activité: <i>L. donovani</i> , promastigotes Inactif: <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i> , promastigotes	Marr et Berens, 1977 Marr et Berens, 1977
Allopurinol ribonucleoside	Actif: <i>L. braziliensis</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. mexicana</i>	Nelson et al., 1979
Formycine B	Actif: <i>L. donovani</i> , <i>L. mexicana</i> promastigotes Actif: <i>L. tropica</i> , promastigotes Actif: <i>L. mexicana</i> , amastigotes infectant la lignée cellulaire J774G8 Actif: <i>L. donovani</i> , hamsters Actif: <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i> , souris	Carson et Chang, 1981 Berman, 1983 Carson et Chang, 1981 Berman et al., 1983 Rojas et Avila, 1987

Tableau N° 1.7.  
Activité de l'allopurinol et quelques-uns de ses dérivés  
sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)

## MODE D'EMPLOI, POSOLOGIE

Il s'administre en perfusions veineuses lentes (8 à 10 h) en commençant par 0,1 mg par kg pour atteindre progressivement 0,6 mg par kg. Les perfusions espacées de 48 h sont répétées jusqu'à la guérison du malade, en surveillant étroitement l'ionogramme, les fonctions rénales et le bilan électrolytique.

## EFFETS INDESIRABLES

Au cours des perfusions (Drillaud, 1987):

- malaise général, frissons, céphalées, troubles digestifs, exceptionnellement gastro-entérite hémorragique, choc anaphylactique, thrombophlébites chimiques.

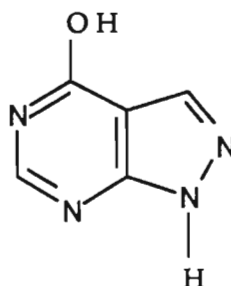
Lors du traitement:

- altération de la fonction rénale, troubles électrolytiques (hypokaliémie, baisse de la réserve alcaline), anémie, thrombocytopénie, agranulocytose et rarement troubles du rythme cardiaque, signes d'hépatotoxicité, de neurotoxicité.

## 1.3.2. PRODUITS OCCASIONNELS

### 1.3.2.1. L'allopurinol (Zyloric R)

#### COMPOSITION CHIMIQUE



Allopurinol

#### ACTIVITE LEISHMANICIDE DE L'ALLOPURINOL ET DE SES DERIVES

Ce produit inhibe *in vitro* (Tableau N° 1.7) la croissance de *L. braziliensis* (Pfaller et Marr, 1974), *L. donovani* et *L. mexicana* (Marr et Berens, 1977). Il s'est

révélé utile chez certains patients présentant une leishmaniose résistante aux dérivés antimoniés. Son association avec le Pentostam<sup>R</sup> ou le Glucantime<sup>R</sup> potentialise ceux-ci et donne de bons résultats au cours d'essais cliniques (Chung et al., 1985).

L'allopurinol est en cours d'essais cliniques dans plusieurs pays, notamment en Bolivie, pour le traitement des leishmanioses cutanéomuqueuses, difficiles à traiter aux antimoniés. Il est envisagé de l'employer en association avec le Glucantime<sup>R</sup> afin de diminuer les effets toxiques de celui-ci et d'augmenter son efficacité sur les lésions muqueuses. L'allopurinol présente en outre l'avantage, sur les médicaments classiques traitant les leishmanioses, d'être pris oralement et aussi d'être moins toxique.

Des dérivés de l'allopurinol ont également fait l'objet d'études, notamment l'allopurinol ribonucléoside (Chung et al., 1985; Nelson et al., 1979) et la formycine B (Berman, 1984; Berman et al., 1983; Carson et Chang, 1981; Rojas et Avila, 1987) (voir activité Tableau N° 1.7). Aucun de ces dérivés n'a été testé cliniquement sur des patients atteints de leishmaniose cutanée ou viscérale.

### 1.3.2.2. Les 8-aminoquinoléines

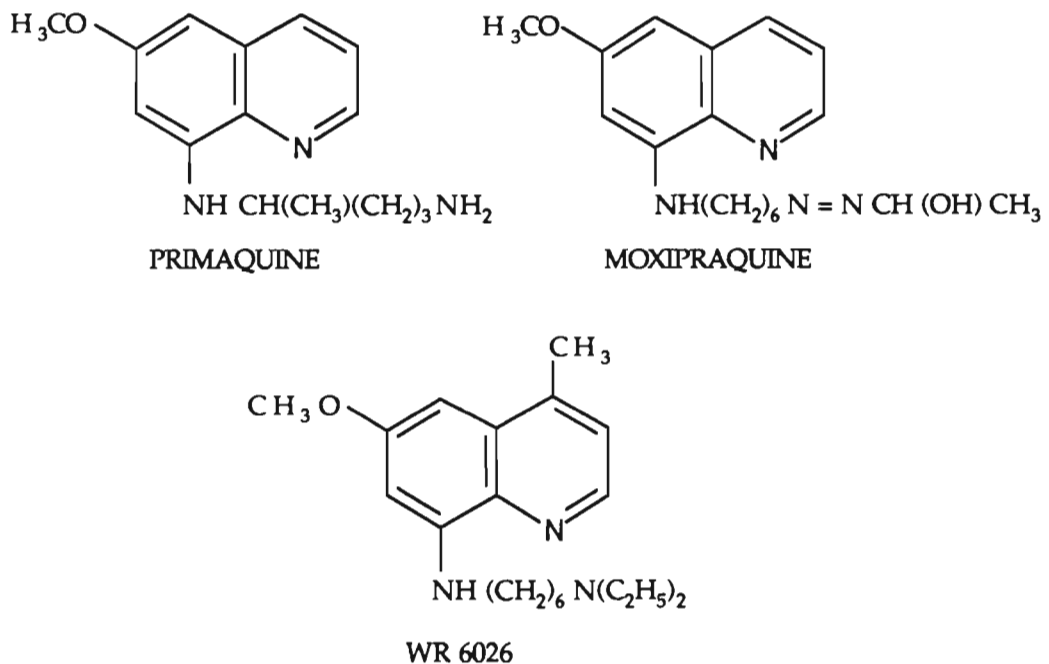


Figure N°13 Formules chimiques de quelques 8-aminoquinoléines

Les dérivés 8-aminoquinoléiques ont longtemps été associés aux activités antiprotozoaires et antipaludiques (Beveridge et al., 1980). Le plus connu d'entre eux est la primaquine. Ce produit s'est avéré aussi actif que le Glucantime<sup>R</sup> *in vivo* sur hamsters infectés par *Leishmania donovani* (Hanson et al., 1977).

Un autre composé a été choisi après une série d'essais de plusieurs centaines de dérivés 8-aminoquinoléines, la moxipraquine connue pour ses propriétés anti-*Trypanosoma cruzi* (Beveridge et al., 1980). Des recherches menées par le Walter Reed Army Institute aux Etats-Unis sur plusieurs centaines de nouveaux dérivés ont révélées que certains dérivés 8-aminoquinoléiques étaient plusieurs centaines de fois plus actifs que les dérivés antimoniés pentavalents (Tableau N° 1.8).

L'activité leishmanicide varie considérablement selon la nature du substituant en position 8, notamment les dérivés 8-aminoalkyl qui se sont montrés 474 fois plus actifs que le Pentostam<sup>R</sup> *in vivo* en intra-musculaire, et 708 fois plus actifs par voie orale (Peters et al., 1980a).

L'activité leishmanicide d'autres dérivés 8-aminoquinoléiques a été évaluée *in vivo* sur des hamsters infectés par *Leishmania donovani* (Kinnamon et al., 1977), notamment les lépidines (des dérivés 6-méthoxy-4-méthyl-8-aminoquinoléiques). Bien que l'activité leishmanicide des 8-aminoquinoléines fut prouvée sur les modèles expérimentaux à maintes reprises, elles n'ont jamais réellement fait l'objet d'un usage thérapeutique sur le terrain pour traiter les malades touchés par les leishmanioses.

### 1.3.2.3. Composés antifongiques

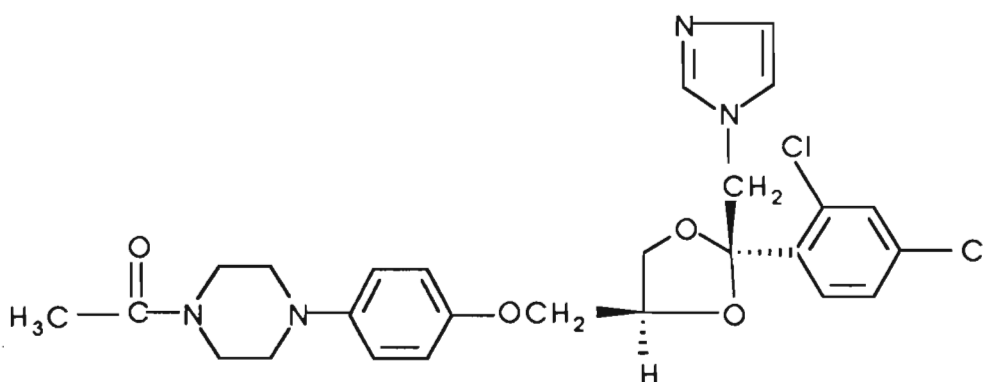


Figure N°14 Formule chimique du kétoconazole

Les composés antifongiques les mieux connus pour leur activité leishmanicide sont les dérivés imidazoles, en particulier le kétoconazole et ses dérivés.

Composé	Activité	Référence
<u>Antifongiques</u>		
Ketoconazole	Faible activité; <i>L. major</i> , amastigotes infectant des macrophages humains <i>in vitro</i> Bonne activité: <i>L. donovani</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> promastigotes Activité moyenne: <i>L. mexicana</i> promastigotes	Berman, 1981 Beach et al., 1988 Berman et al., 1984
Clotrimazole	Activité moyenne: <i>L. major</i> amastigotes infectant macrophages humains <i>in vitro</i>	Berman, 1981
Miconazole	Activité moyenne: <i>L. major</i> amastigotes infectant macrophages humains <i>in vitro</i>	Berman, 1981
Nystatine	Activité moyenne: <i>L. mexicana</i> amastigotes infectant lignée cellulaire <i>in vitro</i>	Mattock et Peters, 1975
Itraconazole	Activité moyenne: patients infectés par <i>L. braziliensis</i> Bonne activité: <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. donovani</i> , promastigotes <i>in vitro</i>	Borelli, 1987 Beach et al., 1988
<u>Antitrypanosomes</u>		
Suramine	Faible activité: <i>L. mexicana</i> , amastigotes infectant lignée cellulaire <i>in vitro</i>	Mattock et Peters, 1975
Nifurtimox	Faible activité: <i>L. mexicana</i> , <i>L. infantum</i> , amastigotes infectant lignée cellulaire <i>in vitro</i> Bonne activité: <i>L. major</i> , souris, peu actif <i>L. mexicana amazonensis</i> , <i>L. donovani</i> souris	Mattock et Peters, 1975 Peters et al., 1980b
Benznidazole	Aucune activité: <i>L. major</i> , <i>L. donovani</i> souris	Peters et al., 1980b; Peters et al., 1980a
<u>Antimalariques</u>		
Quinine	Faible activité: <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. donovani</i> , amastigotes infectant lignée cellulaire <i>in vitro</i> Aucune activité: <i>L. major</i> , <i>L. mexicana amazonensis</i> , souris	Mattock et Peters, 1975 Peters et al., 1980a
Chloroquine	Faible activité: <i>L. mexicana</i> , amastigotes infectant lignée cellulaire <i>in vitro</i> Inactif: <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> , souris	Mattock et Peters, 1975 Peters et al., 1980a
<u>Composés divers</u>		
Emétine	Activité moyenne: <i>L. donovani</i> , promastigotes <i>in vitro</i> , <i>L. major</i> , souris	Narain et Dutta, 1978 Neal, 1964
Berbérine	Faible activité: <i>L. donovani</i> , promastigotes <i>in vitro</i> Actif: <i>L. mexicana</i> , hamster	Narain et Dutta, 1978 Vennerstrom et al., 1990

Tableau N° 1.9  
Activité de quelques médicaments sur les modèles expérimentaux  
(Neal, 1987)

Le kétoconazole est un antifongique imidazole pris oralement, cliniquement efficace contre un large spectre de mycoses (Heel, 1982).

Les dérivés imidazoles tels que le kétoconazole (commercialisé par la firme Janssen), l'itraconazole, ou le miconazole, ont été employés pour traiter les leishmanioses cutanées avec plus ou moins de succès.

Suite à la publication de travaux scientifiques démontrant l'activité leishmanicide des dérivés imidazoles en laboratoire sur des modèles biologiques (Tableau N° 1.9) *in vitro*, notamment avec le kétoconazole (Beach et al., 1988; Berman, 1981; Berman et al., 1984) et *in vivo* (Weinrauch et al., 1983), des essais cliniques ont débuté dans plusieurs pays.

Le kétoconazole fut employé cliniquement pour traiter les malades touchés par les leishmanioses cutanées du Nouveau Monde provoquées par *L. mexicana* au Nicaragua (Urcuyo et Zayas, 1982), au Belize (Jolliffe, 1986), par *L. guyanensis* en Guyane Française (Dedet et al., 1980) et par *L. panamensis* (Saenz et al., 1990) au Panama.

Un autre dérivé imidazole, l'itraconazole, a été essayé cliniquement sur des malades leishmaniens au Vénézuéla (Borelli, 1987). Ces médicaments présentent l'avantage d'être pris oralement. La durée des traitements à base de kétoconazole varie d'un mois à six mois, à raison de 200 à 800 mg par jour. Les résultats des divers essais cliniques effectués entre 1982 et 1986 font apparaître que, sur 79 patients infectés par *Leishmania* ssp., 54 ont été guéris (Croft, 1988). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car il se produit souvent un phénomène d'autoguérison dans le cas des leishmanioses cutanées pendant les trois mois que dure le traitement avec le kétoconazole. Ces résultats varient selon le type d'infection et les posologies employées au cours des divers essais cliniques (Tableau N° 1.9). Des études et des rapports émanant de l'OMS ont fait apparaître que le kétoconazole ne serait pas totalement dépourvu de graves effets secondaires. Une étude récente sur l'activité *in vitro* sur des macrophages de souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* de dérivés d'acides gras du kétoconazole (oléoyl et déacétyl kétoconazole) et d'acides aminés (phénylalanil kétoconazole), montrent que plusieurs de ces composés sont une vingtaine de fois plus actifs que le kétoconazole (Pirson et al., 1990).

Certains pharmacologues ont même essayé d'appliquer ces produits mycotiques sous forme de pommade sur des lésions leishmaniennes provoquées par *L. major* et *L. amazonensis* sur des souris et aussi sur des malades. Les pommades à base de miconazole ou de clotrimazole ou de kétoconazole (Weinrauch et al., 1984) n'ont eu aucun effet thérapeutique. L'espérance de pouvoir traiter les leishmanioses par voie orale avec les

antifongiques de type imidazole s'évanouit peu à peu, mais d'autres dérivés de synthèse de type imidazole et triazole sont en cours d'expérimentation. Une équipe française a expérimenté avec succès un traitement à base d'itraconazole (à raison de 400 mg par jour pendant trois mois) et de zidovudine (Retrovir) sur un patient atteint de SIDA et d'une leishmaniose cutanée (Pialoux et al., 1990).

D'autres antifongiques sont également en cours d'évaluation pour traiter les leishmanioses cutanées et viscérales, notamment la sinéfungine, testée *in vitro* sur *Leishmania donovani*, *L. major* (Bachrach et al., 1980; Blanchard et al., 1986), *in vivo* sans trop de succès sur *L. mexicana* et sur *L. braziliensis* (Avila et al., 1990). Aucun de ces produits n'a passé le stade de l'expérimentation clinique chez l'Homme.

### 1.3.3. PRODUITS EN COURS D'EXPERIMENTATION

#### MEDICAMENTS DIVERS

D'autres médicaments employés pour traiter des pathologies différentes des leishmanioses ont fait l'objet d'une évaluation de leur efficacité biologique *in vitro* ou *in vivo* sur les leishmanies. Il est impossible de mentionner toutes les molécules étudiées, ou en cours d'expérimentation seront cités les travaux qui méritent une attention particulière:

- chez les antibactériens; la rifampicine, un antibiotique employé seul (Mattock et Peters, 1975) ou en association avec l'amphotéricine B (Weinrauch et El-On, 1984) ou avec l'isoniazide (Peters et al., 1981), les furoquinolones testées *in vivo* sur *Leishmania donovani* (Raether et al., 1989), la tunicamycine expérimentée *in vitro* sur *L. braziliensis* (Hernandez et al., 1987), et récemment l'acivicine, un antibiotique actif *in vitro* et *in vivo* sur *L. donovani* (Mukherjee et al., 1990).

- chez les antitrypanosomes; le nifurtimox, le benznidazole (Mattock et Peters, 1975; Peters et al., 1980b).

- chez les amibicides; l'émétine et ses dérivés (Peters et al., 1980a; Peters et al., 1980b).

- chez les immunosuppresseurs; la cyclosporine A a été testée *in vivo* et *in vitro* sur *L. major* avec peu de résultats intéressants (Behforouz et Wenger,,

1989), et la cimétidine expérimentée *in vivo* sur des souris infectées par *L. amazonensis* (Coleman et al., 1988; Coleman et al., 1989) avec des résultats encourageants.

Des techniques d'encapsulation des principes actifs dans les liposomes (Reed et al., 1984; Das et al., 1990) sont en cours d'expérimentation dans les laboratoires, notamment avec les dérivés antimoniés pentavalents ou, l'amphotéricine B (Davidson et al., 1991). Par cette technique d'encapsulation on arrive à augmenter substantiellement l'activité par rapport au produit seul, en employant des concentrations en antimoine plusieurs dizaines de fois inférieures à celle du produit témoin, diminuant ainsi la toxicité des dérivés antimoniés.

Des recherches ont été entreprises pour améliorer la voie d'administration des médicaments qui pour traiter les leishmanioses se fait presque toujours par voie parentérale. De nouveaux médicaments administrables oralement ou localement sont en cours d'étude. Des cliniciens ont essayé l'application de crème à base d'antibiotiques comme la paromomycine, la chlorpromazine (El-On et al., 1988) ou le chlorure de méthyl benzéthonium associé aux aminoglycosides de gentamycine ou de paromomycine (Carter et al., 1989), pour traiter des lésions provoquées par une infection à *L. major* et à *L. amazonensis*. Certains ont envisagé la prise orale de DMFO, D-L-a-difluorométhylornithine, médicament employé pour traiter les trypanosomiasis africaines, celui-ci est dilué à 2 % dans de l'eau pour soigner la leishmaniose viscérale, *L. donovani* et *L. infantum* (Gradoni et al., 1989). Son efficacité semble potentialisée lorsqu'il est associé avec de la bléomycine. Des essais de traitement du pian bois (*L. guyanensis*) avec la prise orale de DMFO seul ont donné des résultats très intéressants (Croft, 1988).

### PRODUITS D'ORIGINE NATURELLE

Une voie originale de recherche de nouveaux produits actifs sur les leishmanioses, isolés à partir des produits d'origine naturelle, commence à se développer timidement. On peut citer les travaux concernant l'évaluation de l'activité leishmanicide *in vitro* des quassinoides sur les promastigotes de *L. donovani* (Robert-Gero et al., 1985), des alcaloïdes de type bisbenzyltétrahydroisoquinoléique sur plusieurs souches de promastigotes de leishmanies (Fournet et al., 1988), et des  $\beta$ -carbolines testées *in vitro* sur des promastigotes de



*L. donovani* (Dodd et al., 1989).

En Inde, la berbérine est employée pour traiter le kala-azar (Munshi et al., 1972), mais une étude récente sur l'activité biologique *in vivo* de dérivés de la berbérine sur des hamsters infectés par *L. donovani*, *L. panamensis* (Vennerstrom et al., 1990) n'a pas vraiment confirmé l'efficacité de la berbérine et de ses dérivés.

Des essais ont été effectués avec des molécules générant de l'oxygène actif pour former des peroxydes hautement toxiques pour les leishmanies, les naphthoquinones. Parmi ces naphthoquinones, la plumbagone, employée en médecine traditionnelle en Afrique et en Asie pour traiter les maladies de peau (Sofowora, 1982), a été testée *in vitro* sur des amastigotes de *L. donovani* et *L. amazonensis*, et *in vivo* sur souris Balb/C infectées par *L. amazonensis* (Croft et al., 1985).

Une bis-naphthoquinone isolée de *Diopyros montana*, la diospyrine, a été essayée *in vitro* sur des promastigotes de *L. donovani* (Hazra et al., 1987). Les résultats obtenus sont positifs *in vitro*, mais non encore confirmés sur le modèle animal.

Des thérapies originales utilisent la chaleur, localement sur les lésions (les leishmanies sont particulièrement sensibles à la chaleur). Des essais en République Dominicaine, sur des patients souffrant de leishmanioses cutanées diffuses, ont été effectués en mettant en contact les lésions 20 heures avec de l'eau à 39-41 °C (Neva et al., 1984). Ce procédé a donné quelques résultats intéressants sur quelques malades, mais ne peut pas être recommandé en routine. Une expérience similaire a été tentée au Nicaragua (Missoni, 1984) en mettant la lésion 12 heures en contact avec de l'eau entre 40 et 55 °C.

L'emploi de la chaleur comme moyen thérapeutique est à mettre en parallèle avec l'utilisation en médecine traditionnelle de plantes ou de produits provoquant un échauffement lors de leur application directement sur la lésion.

## VACCINATION

Il est impossible de terminer ce tour d'horizon sur les thérapies des leishmanioses sans parler des essais de vaccination et des traitements immunologiques.

Les essais de vaccination sont en cours d'expérimentation (Modabber, 1990). Au Brésil, des vaccins sont préparés à base de promastigotes de *L. braziliensis* (M 2903) et de *L. amazonensis* (PH8) et ont été testés sur des chiens (Mayrink et al., 1989). Les résultats obtenus sont difficilement interprétables à cause de la faible sensibilité du test antigénique de Montenegro. Suite à ces essais la même équipe a entrepris cette vaccination sur 475 conscrits de l'armée brésilienne. Plusieurs vaccins étaient préparés avec des promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. guyanensis* avec addition ou non d'un adjuvant, *Corynebacterium parvum*. Cette expérimentation a permis d'observer une nette augmentation des défenses immunitaires des sujets vaccinés par rapport aux sujets placebos (Nascimento et al., 1990). Des essais sur un plus grand nombre de personnes vaccinées (7 000) sont actuellement en cours au Brésil.

D'autres équipes ont pensé augmenter la défense immunitaire des malades. Au Venezuela, des patients infectés par *Leishmania mexicana* sont traités par le vaccin de la tuberculose, le BCG (Convit et al., 1987). Chez les malades traités avec le BCG, il a été observé presque le même pourcentage de guérison (94 %) chez les patients traités par la chimiothérapie au Glucantime<sup>R</sup> (95 %).

Au Brésil, des essais cliniques de traitements associant les antimoniés pentavalents et l'interféron gamma ont été effectués sur des malades infectés par *L. braziliensis* (Harms et al., 1989) et sur des malades infectés par le parasite de la leishmaniose viscérale, *L. donovani* et déjà traités sans succès par les antimoniés (Badaro et al., 1990; Hockertz et al., 1991). Ces deux expérimentations ont donné des résultats encourageants, mais le recours à ces immunothérapies doit être réservé à des cas difficiles à traiter par la chimiothérapie classique, suite à l'échec de traitements lourds aux antimoniés ou chez des malades infectés à la fois par le SIDA et la leishmaniose viscérale (Lorthoraly et al., 1990).

## 1.4. RECHERCHE DE NOUVEAUX PRODUITS

### 1.4.1. Modèles expérimentaux *in vitro*

L'utilisation des promastigotes de *Leishmania* en milieu de culture est la méthode la plus simple pour détecter l'activité des médicaments (Berman et al., 1984; Avila et al., 1986, Paolantonacci et al., 1985). La culture des promastigotes se fait généralement en milieu monophasique ou diphasique avec addition de sérum de veau foetal dans lequel on ajoute le produit à tester. Les milieux de culture les plus employés sont le NNN (Novy, Mac Neal, Nicolle), ou le LIT (Liver Infusion Tripose). Certaines souches sont plus difficiles que d'autres à cultiver, par exemple quelques souches du complexe *L. braziliensis* et *L. venezuelensis*. L'importance du degré d'inhibition de la croissance des promastigotes ou la lyse totale des parasites permet de mesurer l'activité des médicaments sur les leishmanies.

L'emploi des promastigotes comme modèle expérimental *in vitro* est simple, mais il présente l'inconvénient de ne pas prendre en compte la cellule hôte du parasite comme chez le malade. Ce test biologique doit être confirmé par des essais sur le stade amastigote dans la cellule hôte ou sur le modèle *in vivo*.

Le modèle amastigote consiste à infecter des cellules *in vitro*, ces cellules sont cultivées dans des milieux contenant le produit à tester. Plusieurs modèles cellulaires ont été utilisés, par exemple les cellules de sarcome de chien (Lamy et al., 1966; Mattock et Peters, 1975), les lignées cellulaires de macrophages humains (Berman et Lee, 1984) infectés par *L. donovani* et *L. tropica* (Jimenez et Ercoli, 1965), *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* (Martinez et al., 1988), les lignées cellulaires de macrophages de souris (Berens et al., 1980), et les macrophages péritonéaux de souris (Lamy et al., 1966; Bachrach et al., 1980; Neal et Matthews, 1982).

Chaque type de cellules a ses avantages et ses inconvénients. Les macrophages péritonéaux de souris Balb/c ont l'avantage de ne pas se multiplier, ce qui n'est pas le cas des lignées cellulaires de macrophages. Les macrophages péritonéaux de souris présentent l'avantage de bien adhérer sur les lames ce qui facilite le comptage, au contraire des lignées cellulaires qui n'adhèrent pas. En revanche l'emploi des lignées cellulaires permet d'utiliser plus facilement ces tests *in vitro* en routine. Le modèle macrophage infecté par des amastigotes de leishmanies pêche par son manque de reproductibilité, et nécessite de nombreuses manipulations souvent fastidieuses (comptage au

microscope d'un nombre élevé de lames sujet à des erreurs humaines).

#### 1.4.2. Modèles expérimentaux *in vivo*

Les animaux de laboratoire inoculés avec différentes espèces de *Leishmania* ssp développent une leishmaniose expérimentale. Ces animaux sont traités par les produits à tester en les comparant avec un médicament de référence, généralement le Glucantime<sup>R</sup> ou le Pentostam<sup>R</sup> avant, pendant ou après l'inoculation des parasites. Ensuite on compare l'évolution clinique ou biologique des leishmanioses avec celle des animaux témoins. Les modèles *in vivo* les plus couramment employés sont la souris (Coleman et al., 1988), ou le hamster (Vennerstrom et al., 1990).

Le développement des leishmanioses expérimentales sur l'animal varie beaucoup selon la souche; s'il y a peu de problèmes avec les souches de leishmanioses viscérales (Stern et Murray, 1987; Carter et al., 1988; White et al., 1989), les souches venant du Vieux Monde et les souches du complexe *L. mexicana*, ce n'est pas le cas avec les souches du complexe *L. braziliensis*.

Les espèces les plus souvent employées sont *L. amazonensis* pour les leishmanioses du Nouveau Monde et *L. donovani* pour la leishmaniose viscérale. Pour le moment il n'existe pas encore de modèle fiable pour reproduire l'"espundia" (*L. braziliensis*). Récemment une équipe nord-américaine a mis au point une technique d'infection de souris Balb/c par un lysat de glandes salivaires de phlébotomes contenant la souche *L. braziliensis* (Samuelson et al., 1991). Par cette technique on constate une augmentation régulière de la taille de la lésion pendant 120 jours après l'infection, alors qu'elle est insignifiante chez les souris infectées avec les parasites seuls sans lysat salivaire.

L'infection par *L. amazonensis* ou autres espèces de leishmanioses cutanées des animaux de laboratoire se fait généralement sur le coussinet plantaire d'une patte arrière, l'autre patte restant comme témoin. Les diamètres des deux pattes sont mesurés chaque semaine, la différence des mesures donne l'épaisseur de la lésion que nous appelons, l'Indice Leishmanien (I.L.).

Une équipe brésilienne a essayé d'inoculer les parasites sur une oreille de la souris, pour provoquer des lésions plus importantes (Mortatti et Henriques, 1990).

Les traitements s'effectuent par voie générale par injection sous cutanée. La durée des traitements varie selon les auteurs et les molécules à tester. Il n'existe pas de protocole standardisé pour tester l'efficacité des produits sur les leishmanioses cutanées.

Les infections par *L. donovani* (leishmaniose viscérale) se font par injection intraveineuse des parasites (amastigotes) ou par voie intracardiaque (promastigotes). Les traitements débutent généralement une semaine ou deux semaines après l'infection parasitaire. L'expérimentation dure trois à quatre semaines.

En fin d'expérimentation, les animaux sont sacrifiés. Le foie et la rate sont prélevés, pesés, et leur structure cellulaire est examinée en réalisant un frottis pour compter les parasites (coloration au Giemsa). L'inhibition du produit à tester est évaluée par rapport aux groupes de souris traitées et non traitées en comptant les parasites intracellulaires. La mortalité et la survie des animaux sont également pris en considération.

## LA MALADIE DE CHAGAS

La maladie de Chagas est une trypanosomiase humaine endémique, provoquée par *Trypanosoma cruzi*; elle est généralement transmise par des triatomidés hématophages (Brener, 1982). Cette parasitose fut découverte en 1909 par C. Chagas (Chagas, 1909).

L'infection à *T. cruzi* est endémique dans les régions tropicales d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale (De Vos et al., 1989). Elle sévit du sud du Texas jusqu'au Nord de l'Argentine (Voir Figure N° 15). On estime à une vingtaine de millions le nombre de sujets infectés par *T. cruzi* et à 65 millions celui des personnes exposées au risque de l'infection (Schofield, 1985).

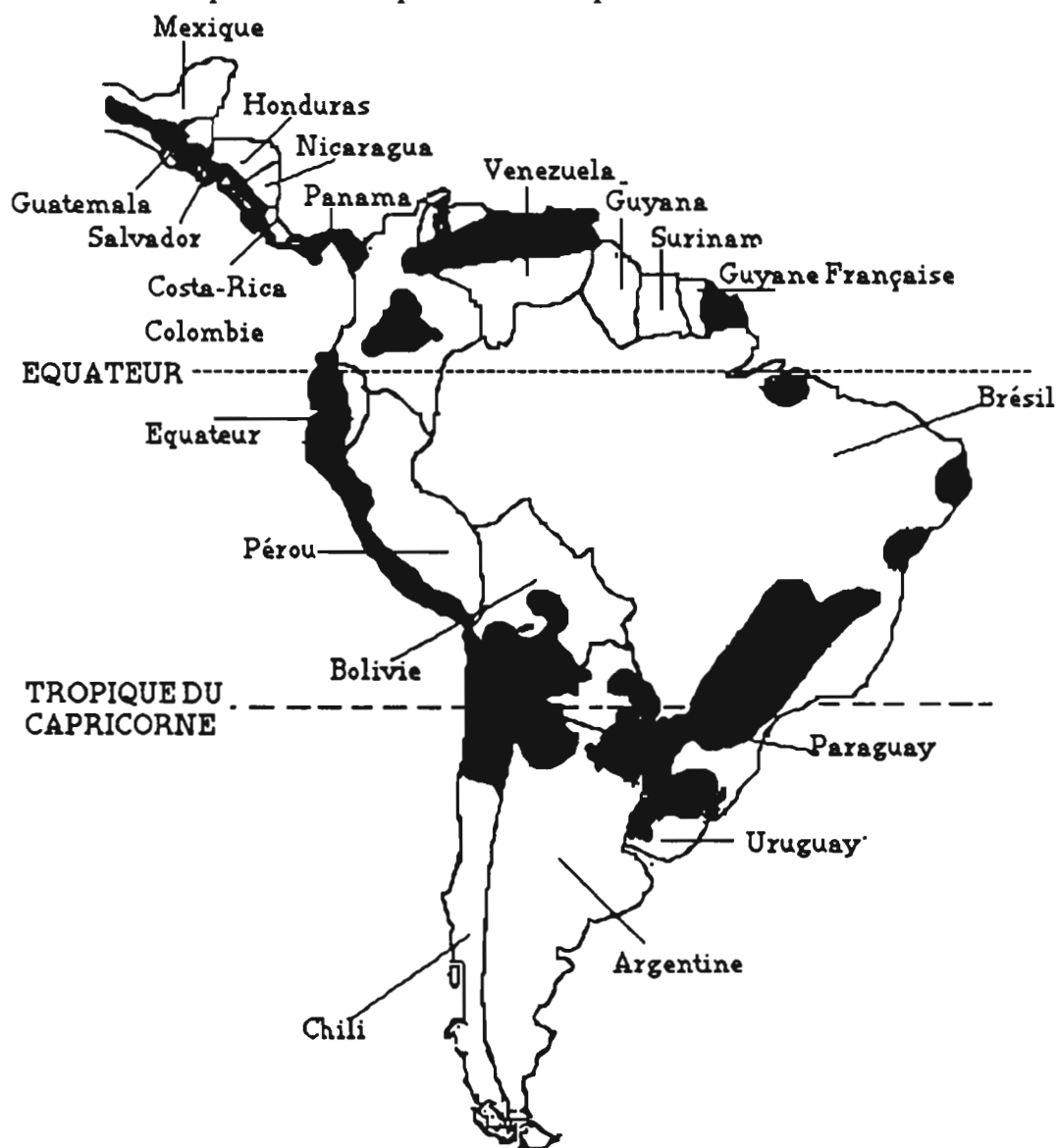


Figure N° 15

Estimation de la distribution géographique de la maladie de Chagas en Amérique du Sud (Wilckoks et Manson-Bahr, 1972)

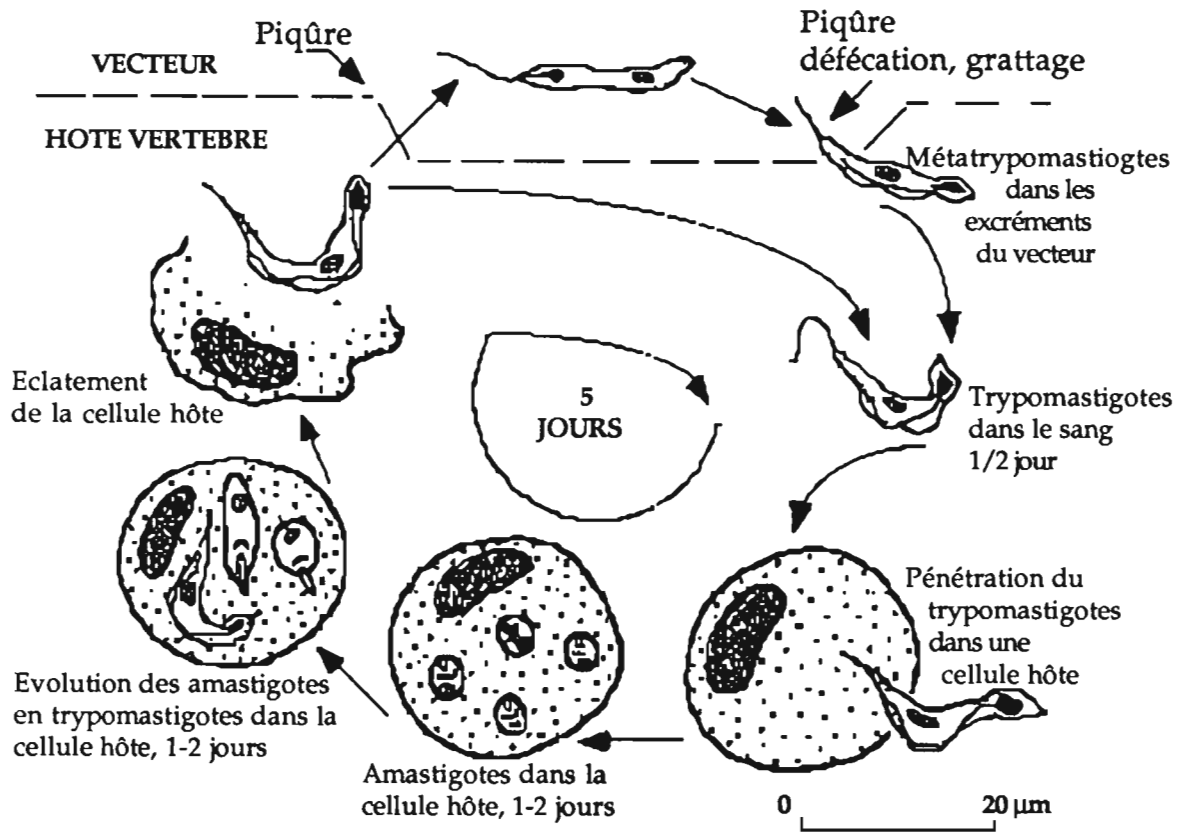


Figure N° 17  
 Cycle de *Trypanosoma cruzi* d'après De Vos et al., 1989

## 1.5. CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS

### 1.5.1. Le parasite : *Trypanosoma cruzi*

Les Trypanosomes sont des protozoaires flagellés (voir Figure N° 16, leur classification taxonomique). Il en existe plus d'une centaine d'espèces qui parasitent toutes les classes de vertébrés. Ils sont pourvus d'un noyau et d'une seule mitochondrie géante dont une partie (le kinétoplaste) est riche en A.D.N.. Leurs formes extra-cellulaires possèdent un flagelle antérieur qui leur permet de se déplacer.

Classe	Zoomastigopogorea
Sous phylum	Mastigophora
Phylum	Sarcomastigophora
Sous Ordre	Trypanosomatina
Ordre	Kinetoplastida
Famille	Trypanosomatidae
Genre	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Espèce	<i>Schizotrypanum</i>

Figure N° 16  
Taxonomie de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* est un parasite de nombreux mammifères, dont l'Homme (Zooanthroponose), transmis par l'intermédiaire d'une punaise Triatominae. Il se présente sous quatre formes différentes (voir Figure N° 17):

- Le **métatrypomastigote**, fusiforme, est muni d'un flagelle court dont la pointe d'implantation (le kinétoplaste, superposé au kinétoplaste) est situé en arrière du noyau. C'est la forme infectante, présente dans les excréments du vecteur.

- Le **trypomastigote**, également fusiforme, se distingue du précédent par un flagelle plus long. C'est la forme libre dans le sang du vertébré parasité à la



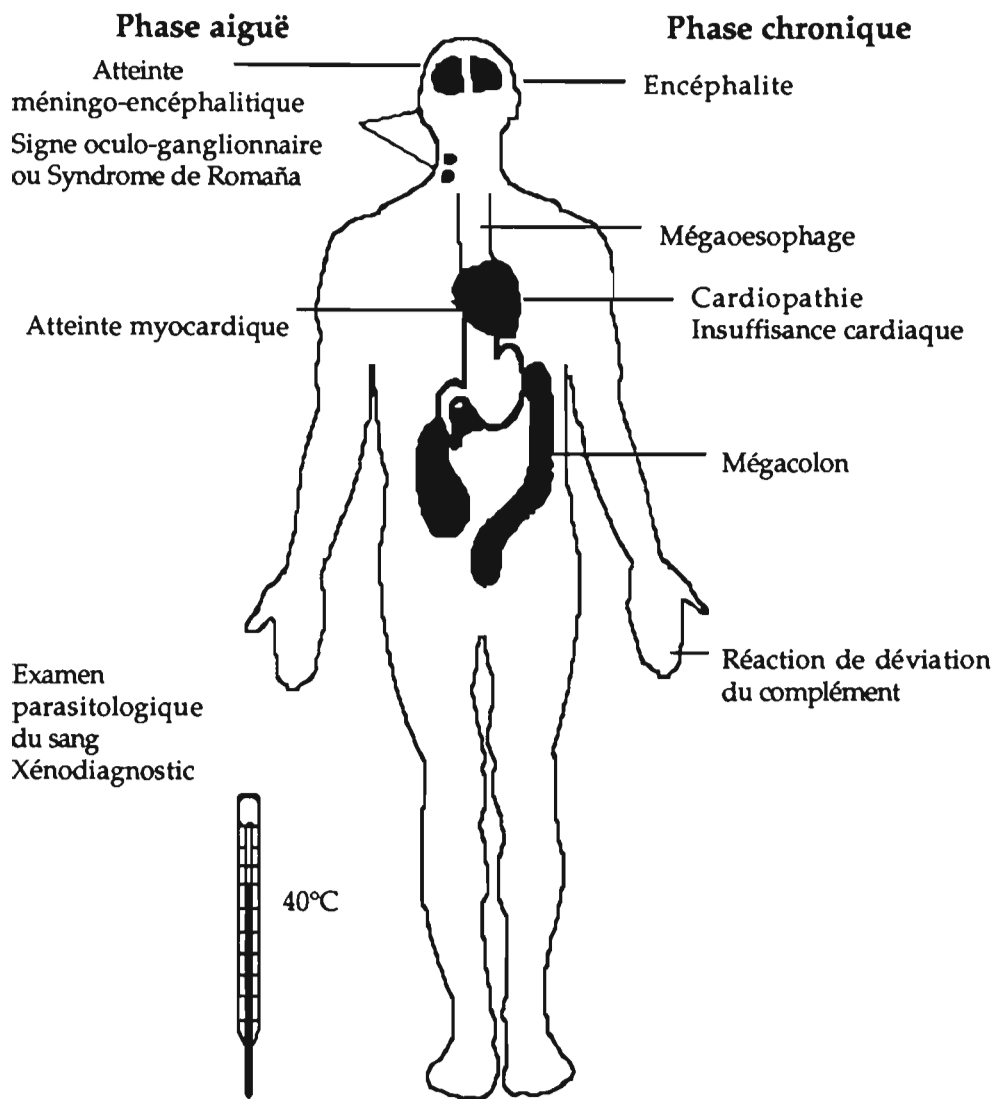


Figure N° 18  
 Symptomatologie de la maladie de Chagas (Gentilini et al., 1982)

recherche d'une cellule hôte (macrophage, cellule musculaire); il dérive d'un métatrypomastigote ou d'un amastigote.

- L'**amastigote**, sphérique ne présente qu'un flagelle rudimentaire non fonctionnel. Il se multiplie (reproduction asexuée) dans sa cellule hôte et se transforme en trypomastigote qui envahit le sang lors de l'éclatement de la cellule hôte.

- L'**épimastigote**, fusiforme et très élancé, est muni d'un flagelle. Son kinétosome est situé à l'avant du noyau. Les épimastigotes se multiplient (reproduction asexuée) dans le tube digestif du vecteur et se transforment en métatrypomastigotes infectants dans le rectum de leur hôte.

### 1.5.2 Aspects cliniques de la maladie de Chagas

L'Homme se contamine par les métatrypomastigotes infectants contenus dans les excréments du vecteur que celui-ci dépose sur l'épiderme lorsqu'il a terminé son repas sanguin. Le sujet piqué se gratte ou amène les parasites au contact de ses muqueuses ou de petites blessures de la peau, ce qui favorise la pénétration des parasites dans l'organisme, plus particulièrement dans l'appareil sanguin périphérique.

Après trois semaines d'incubation "silencieuse", les parasites deviennent abondants dans le sang. La maladie peut débiter par une phase aiguë, caractérisée par des malaises, poussées de fièvre et divers autres symptômes (Figure N° 18), comme un complexe ophtalmo-ganglionnaire appelé, signe de Romaña (sujets à l'"oeil enflé"). Au cours de cette phase, les décès sont nombreux essentiellement chez les enfants où l'on compte 10 % de mortalité.

Par la suite, le taux d'anticorps augmente dans le sang tandis que les parasites y deviennent rares et difficiles à détecter. La maladie évolue alors très lentement (phase latente), et aboutit chez 30 à 40 % des individus à une phase chronique qui entraîne le plus souvent une pathologie cardiaque (myocardiopathie) responsable de cas de morts subites. Dans d'autres cas, il se produit la dilatation de certaines parties du tube digestif (méga-oesophage, méga-colon).

Outre la transmission de la maladie de Chagas par les triatominae hématophages, il existe des risques importants de contaminations dans les zones d'endémie et dans les pays concernés, par les transfusions sanguines et la transmission congénitale.

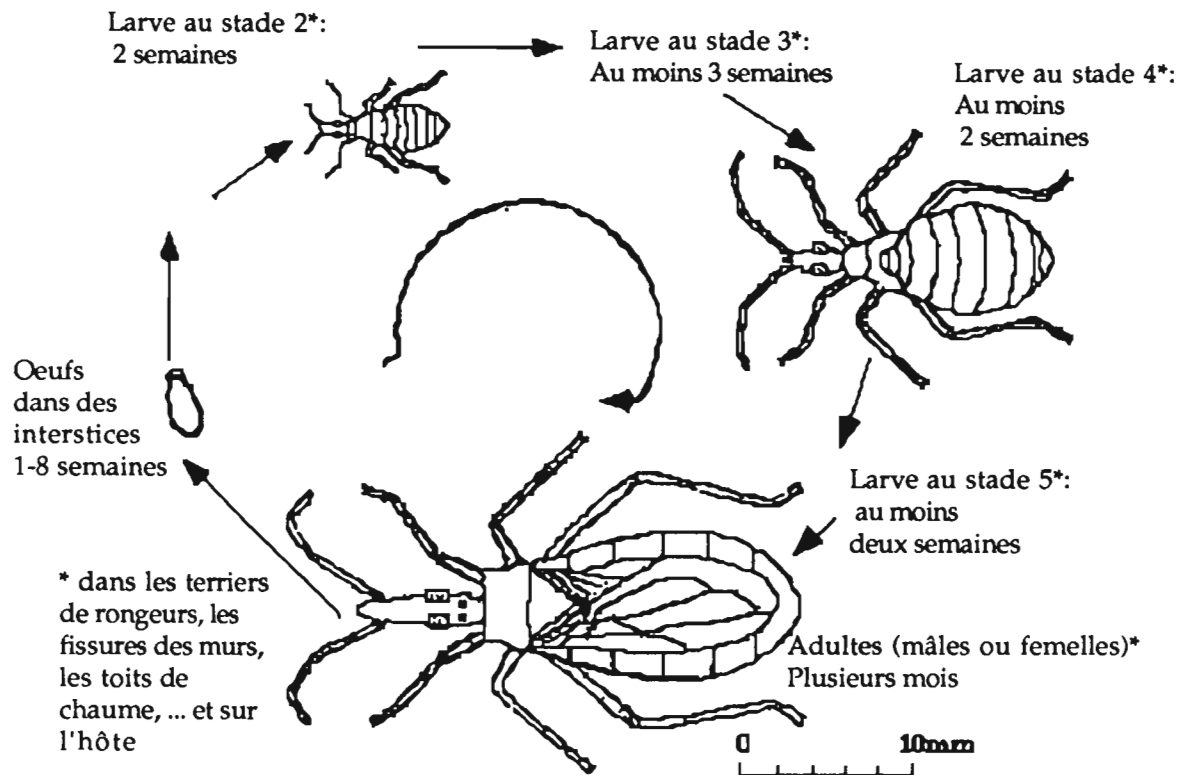


Figure N°19  
Cycle de *Triatoma infestans* d'après De Vos et al., 1989

### 1.5.3. Les vecteurs de la maladie de Chagas

Les principaux agents vecteurs sont des Réduvidae (*Panstrongylus*, *Triatoma* et *Rhodnius*), sortes de punaises vivant dans la nature, adaptés aux animaux sauvages (terriers) et au contact de l'homme dans les paillottes et maisons de bois ou de terre battue. Les réduves craignant la lumière se dissimulent dans les interstices des murs en briques de terre, les toits en feuille de palmier, dans les greniers avec les récoltes (maïs) ou sous les matelats.

Les triatomes sortent à l'obscurité généralement la nuit, sucent le sang de l'Homme, de nombreux mammifères sauvages (opossum, tatous, rongeurs, singes) et domestiques (chiens, chats, bétail) et d'oiseaux. Tous ces animaux, à l'exception des oiseaux, peuvent servir de réservoir au parasite.

Les triatomes sont des insectes hétéroptères de 1 à 4 cm de longueur et de teinte foncée, agrémentés ou non de tâches jaunes ou rouges sur les ailes et sur l'abdomen. La tête très allongée porte des yeux composés proéminents et une paire d'antennes de 4 articles. Le rostre contient 4 stylets piqueurs et est divisé extérieurement en 3 articles. Il est réplié au repos sous la tête et se rabat vers l'avant au moment de la piqûre. Seuls les adultes ont des ailes fonctionnelles et volent avec aisance, assurant une grande dispersion des individus et un passage aisé du monde extérieur vers les habitations.

Les femelles pondent des centaines d'oeufs dans les fissures des murs et des planchers (voir cycle de *Triatoma infestans* Figure N° 19), les toits de chaume, dans les terriers et nids aériens de rongeurs, qui servent également d'abris aux larves. A chaque stade, la larve prend un ou plusieurs volumineux repas sanguins nocturnes qui durent plusieurs dizaines de minutes; ces repas sont généralement suivis d'une défécation sur la peau de l'hôte, qui peut, suite au grattage, être à l'origine de l'infection .

### 1.5.4. Lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas

On peut se protéger individuellement contre les vecteurs au moyen de moustiquaires et de répulsifs, mais la méthode habituelle de contrôle est l'épandage d'insecticides. Depuis l'apparition de triatomes résistants au DDT, on utilise du lindane, de la dieldrine et du malathion. Ce type de lutte n'atteint pas les populations de vecteurs vivant dans la nature; son efficacité est limitée car les punaises se réfugient au fond des fissures et autres interstices d'accès facile. De plus, il apparaît que les oeufs ne sont pas entièrement détruits après un épandage d'insecticide, d'où l'apparition d'une résistance aux insecticides des générations suivantes.

La meilleure protection est l'amélioration de l'habitat humain et l'élimination de tout ce qui peut constituer des abris pour les punaises. Cette mesure est malheureusement coûteuse et difficile à réaliser à court terme dans des pays où la situation économique est précaire, ce qui fait dire que la maladie de Chagas est la maladie typique de la pauvreté.

## 1.6. CHIMIOThERAPIE DE LA MALADIE DE CHAGAS

### 1.6.1. Médicaments couramment employés pour traiter la maladie de Chagas

Le médicament spécifique à la maladie de Chagas reste encore à découvrir (Gutteridge, 1976) mais il existe deux médicaments actifs sur les trypanosomes du sang périphérique, le benznidazole et le nifurtimox, utiles dans la phase aiguë de la maladie. Un troisième produit est employé en prophylaxie dans les zones d'endémie et les pays touchés par la maladie de Chagas dans les banques de sang, le violet de gentiane.

#### 1.6.1.1. Le nifurtimox

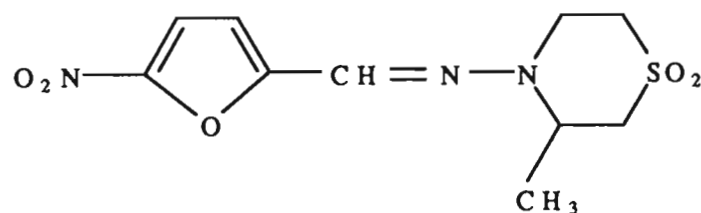


Figure N° 20 Formule chimique du nifurtimox

Le nifurtimox est un dérivé 5-nitrofurane (voir formule chimique Figure N° 20) commercialisé par la firme allemande Bayer sous le nom de Lampit ou Bayer 2502. Annoncé en 1972, il a été mis sur le marché sud-américain en 1976 (Gutteridge, 1985).

C'est une poudre jaune, relativement insoluble dans l'eau, qui est prise oralement sous forme de comprimés. Pour les adultes, il est recommandé à une dose quotidienne de 8-10 mg.kg<sup>-1</sup> par jour (15 mg.kg<sup>-1</sup> par jour pour les enfants) divisée en quatre prises. Le traitement dure 120 jours environ. A cette dose le nifurtimox est efficace pendant la phase aiguë de la maladie. Cette efficacité n'a jamais été démontrée au delà, au stade chronique de l'infection. Ceci est probablement dû à la grande variété des souches de *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc et al., 1986).

Des effets indésirables ont été observés pendant les traitements avec le nifurtimox lorsqu'il est prescrit pour une durée de 120 jours. Il apparaît des nausées, des pertes de mémoire, des désordres du sommeil, une impression générale de malaise et même des dépressions nerveuses.

#### 1.6.1.2. Le benznidazole

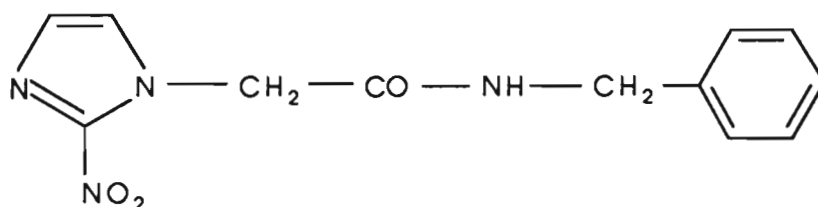


Figure N° 21 Formule chimique du benznidazole

Le benznidazole est un dérivé 2-nitroimidazole (Figure N° 21), annoncé en 1974, mis sur le marché latino-américain en 1978 par la firme américaine Roche et commercialisé sous le nom de Radanil<sup>R</sup>, Rochagan<sup>R</sup> et Ragonil<sup>R</sup>.

C'est une poudre jaune pâle, relativement insoluble dans l'eau, et conditionnée sous forme de comprimés. Le benznidazole est recommandé à 5 mg.kg<sup>-1</sup> par jour pour les adultes et à 10 mg.kg<sup>-1</sup> par jour pour les enfants pendant 60 jours. Apparemment le benznidazole serait plus efficace que le nifurtimox (Ribeiro et al., 1980), mais cela n'a pas été prouvé scientifiquement.

Quelques sérieux effets secondaires ont été signalés au cours des traitements avec le benznidazole, des polyneuropathies et des dermatoses. Ces effets indésirables sont très fortement diminués lorsque le benznidazole est prescrit à moins de 5 mg.kg<sup>-1</sup> par jour. En général, le benznidazole semble être mieux toléré par les malades que le nifurtimox.

Des dérivés 5-nitroimidazole substitués en 2 sont en cours d'étude sur la phase chronique de la maladie. Ces dérivés paraissent être efficace à plus de 90 % sur les souris (Andrade et al., 1989).

Les mécanismes d'action du benznidazole et du nifurtimox ne sont toujours pas élucidés. Des études pharmacodynamiques récentes tentent de proposer des mécanismes d'action de ces deux produits (Morello, 1988).

Il paraît probable que ces médicaments favorisent la production d'anions de superoxyde ( $O_2^-$ ) et celle d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). La réaction entre  $H_2O_2$  et  $O_2^-$  donne le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) hautement toxique. Le trypanosome *T. cruzi* est dénué de catalase et de glutathion-peroxydase (Moncada et al., 1989), enzymes qui protègent les cellules mammaliennes de  $H_2O_2$  et des radicaux libres apparentés, ce qui lui donne une sensibilité aux médicaments engendrant  $H_2O_2$  (Brener, 1982). D'autres composés chimiques produisant ce type de réactions ont été expérimentés sur *Trypanosoma cruzi*, comme les porphyrines (Dennis et al., 1989) ou le méthosulfate de phénazine (Alves et Rabonovich, 1983) et des dérivés quinoniques (Schwarcz de Tarlovsky et al., 1990).

### 1.6.2.3. Le violet de gentiane

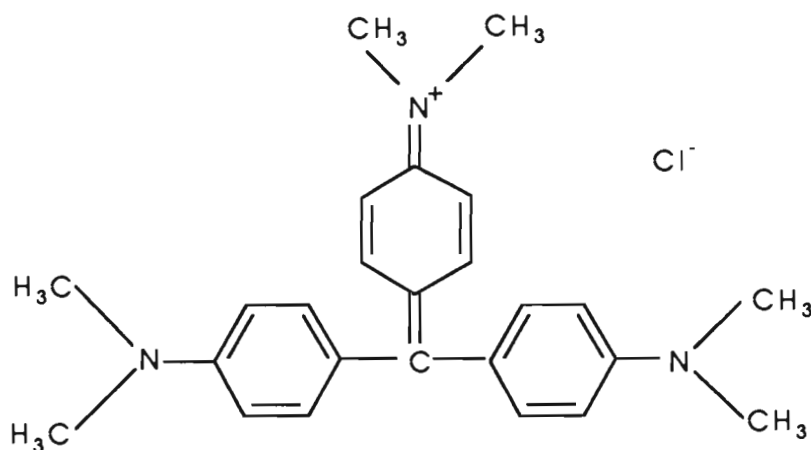


Figure N° 22 Formule chimique du violet de gentiane

Le violet de gentiane (synonyme de cristaux violet) est un dérivé triarylméthane (voir Figure N° 22) de couleur violette, très soluble dans l'eau. Il fut employé la première fois dans les banques de sang en 1953 au Brésil (Nussenzweig et al., 1953). Une lyse totale des formes trypomastigotes circulant dans le sang entier fut observée. L'addition du violet de gentiane dans le sang fut fixée à la concentration de 1 mM. Depuis cette date, son activité serait remise en doute du fait de la multiplicité des souches de *T. cruzi* (Brener, 1979; Neal et Van Bueren, 1988), mais rien de concret ne remet en cause son emploi dans les

Composé	Activité sur les différentes souches de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Référence
Allopurinol	<u>Actif</u> : épimastigotes sur souches, <i>Ma, Y, Ya, Marin-1, Fl</i>	Berrens et al., 1984
Allopurinol riboside	<u>Actif</u> : épimastigotes, sur souches, <i>CR, CL, WA-250, CAN III, P, Y, Esmeralda</i> <u>Actif</u> : trypomastigotes, culture cellulaire VA-13, souche <i>Peru</i>	Berens et al., 1984 Mc Cabe et al., 1988
Cyclosporine A	<u>Activité modérée</u> : amastigotes infectant macrophages de souris avec les souches <i>Y</i> et <i>CL</i>	Mc Cabe et al., 1985a
Formycine B	<u>Inactif</u> : trypomastigotes, souches <i>Y, CL</i> <u>Actif</u> : épimastigotes, sur souches <i>CR, CL, WA-250, CAN III, P, Y, Esmeralda</i> <u>Actif</u> : trypomastigotes, sur culture cellulaire VA-13, avec la souche <i>Peru</i> <u>Actif</u> : trypomastigotes, sur culture cellulaire L929, avec la souche <i>Y</i>	Berens et al., 1984 Berens et al., 1984 Mc Cabe et al., 1985b
Imipramine	<u>Actif</u> : épimastigotes, avec les souches <i>SX10/4, M/88</i>	Doyle et Weinbauch, 1989
Itraconazole	<u>Actif</u> : amastigotes infectant macrophages de souris avec les souches <i>Y, CL, Tulahuen</i>	Scott et Matthews, 1987
Ketoconazole	<u>Actif</u> : épimastigotes, souches <i>Y, CL, MR, Tulahuen</i> <u>Actif</u> : trypomastigotes, infectant des cellules L929 avec les souches <i>Y, CL, MR, Tulahuen</i> <u>Faible activité</u> : épimastigotes, souche <i>Brazil</i> <u>Actif</u> : trypomastigotes, souche <i>Brazil</i>	Mc Cabe et al., 1985b Mc Cabe et al., 1985b Mc Cabe et al., 1984 Mc Cabe et al., 1984
Cyclosporine A	<u>Actif</u> : amastigotes infectant cellules L929 et macrophages de souris par la souche <i>Y</i>	Mc Cabe et al., 1985a
Gossypol	<u>Inactif</u> : trypomastigotes et amastigotes, souche <i>Tulahuen</i>	Rovail et al., 1990

Tableau 1.10  
Activités biologiques *in vitro* de quelques produits sur *Trypanosoma cruzi*



banques de sang des pays concernés.

Apparemment, il n'existe pas d'effet secondaire connu avec le violet de gentiane. Le seul inconvénient serait sa couleur violette qui n'est pas toujours appréciée ou admise par les populations transfusées. Le mécanisme d'action du violet de gentiane sur les trypomastigotes dans le sang n'est toujours pas connu.

### **1.6.2. Médicaments potentiels en cours d'expérimentation**

(voir Tableaux N°1.10 et 1.11)

Le médicament "idéal" de la maladie de Chagas et également de la trypanosomiase africaine devrait avoir les propriétés suivantes (Gutteridge, 1979):

- administration orale
- dose unique ou très peu de doses dans un court laps de temps
- avoir le minimum d'effets secondaires
- accessible aux populations touchées par la maladie de Chagas, même dans les zones rurales d'endémie (souvent les plus touchées) éloignées des centres de santé
- actif sur toutes les souches de *T. cruzi* à tous les stades de la maladie.

Tout ceci apparaît comme une gageure ou une illusion tant le problème est complexe (Croft et al., 1988).

Le modèle biologique idéal (Brenner, 1982) pour l'étude de la maladie de Chagas au stade aiguë ou chronique devrait avoir le profil suivant:

- identification parfaite de la souche ou des souches sur lesquelles nous comptons travailler
- avoir la possibilité de pouvoir travailler sur plusieurs souches de *T. cruzi* présentant des caractéristiques génétiques et de virulence différentes,
- avoir une parasitémie sub-patente prolongée, décelable par xénodagnostic et/ ou hémoculture,
- pouvoir reproduire des réactions auto-immunes cellulaires et ou/humorales,
- développer des formes cardiaques et digestives de la maladie, avec des lésions histopathologiques typiques,
- présenter des lésions dans un laps de temps relativement court.

Un grand nombre de molécules connues pour leur activité biologique sur d'autres maladies, notamment parasitaires, ont déjà fait l'objet d'une évaluation de leur activité biologique *in vitro* (Tableau N° 1.10) et *in vivo* (Tableau N° 1.11) sur *Trypanosoma cruzi*. De ces études, il ressort qu'aucun produit ne présente le

Composé	Activité (souche de <i>Trypanosoma cruzi</i> )	Référence
Allopurinol	Phase aiguë: actif, souris infectées par les souches <i>Y</i> et <i>Marin-1</i>	Avila et Avila, 1981
Allopurinol riboside	Phase aiguë: inactif, souris infectées par la souche <i>Peru, Y</i> Phase chronique: inactif, souris infectées par la souche <i>Peru</i>	Mc Cabe, 1988 Berens et al., 1984
Formycine B	Phase aiguë: actif, souris infectées par la souche <i>Y</i> Phase aiguë: inactif, souris infectées par les souches <i>Y, Peru</i>	Mc Cabe 1985 Berens et al., 1984
Ketoconazole	Phase aiguë: actif, souris infectées par les souches <i>Tulahuen, MR, CL</i> Phase aiguë: actif, souris infectées par la souche <i>Y</i> Phase aiguë: modérée, souris infectées par la souche <i>Brazil 32</i> Phase aiguë: actif, souris infectées par la souche <i>Y</i>	Mc Cabe et al., 1984 Mc Cabe et al., 1987 Croft et Neal, 1985 Reather et Seidenath, 1984
Itraconazole	Phase aiguë: actif, souris infectées par les souches <i>Y, CL, Tulahuen</i>	Scott et Matthews, 1987
Cyclosporine A	Phase aiguë: inactif, souris infectées les souches <i>Y, CL</i>	Mc Cabe et al., 1985a

Tableau 1.11  
 Activités biologiques *in vivo* de quelques produits sur *Trypanosoma cruzi*

profil du médicament type pour traiter la maladie de Chagas.

Le manque d'un médicament à usage prophylactique est également un gros handicap pour la maladie de Chagas, car les cas de transmission de la maladie par transfusion sont nombreux. Le problème de la contamination par transfusion sanguine pourrait être en parti résolu par des analyses sérologiques systématiques des donneurs ainsi que par le développement des auto-transfusions.

D'importants criblages biologiques sur des centaines produits déjà commercialisés (Croft et al., 1988; Hammond et al., 1984; Hammond et al., 1985; Hammond et al., 1986) ont été effectués pour trouver un produit répondant aux conditions de collecte du sang (zones rurales), de stockage (souvent entre 25 et 37 °C) et d'emploi (très rapide par manque de moyens de stockage) du sang dans les régions d'endémie.

Des médicaments sont pressentis pour remplacer le violet de gentiane, tels que l'amphotéricine B (Cruz et al., 1980; Nussenzweig et al., 1953; Perreira et al., 1983) et la trichomycine (hachimycine) (Tachibana et al., 1985). A cause de leur toxicité élevée et de leur coût prohibitif, aucun de ces produits n'est susceptible de remplacer le violet de gentiane dans l'immédiat.

Quelques produits d'origine naturelle ont fait l'objet d'essais biologiques, souvent *in vitro* sur les formes épimastigotes et trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Les recherches ont porté sur l'activité des naphtoquinones sur les stades trypanomastigotes circulant (Leon et al., 1980; Lopes et al., 1978; Pinto et al., 1987), en particulier le  $\beta$ -lapachone (Goijman et Stoppani, 1985), les alcaloïdes du type  $\beta$ -carboline (Cavin et al., 1987; Dodd et al., 1989), les alcaloïdes de type bisbenzyltétrahydroisoquinoléine (Fournet et al., 1988), la tingénone, un triterpène quinoïde (Goijman et al., 1985) et l'azadirachtine (Rembold, 1989).

En conclusion, devant la complexité du problème pour lutter contre la maladie de Chagas, la seule méthode efficace et pratique pour rompre le cycle de transmission de cette maladie serait d'améliorer, le plus rapidement possible, les conditions de l'habitat dans les zones d'endémie. Cette solution est du ressort des pouvoirs politiques et économiques des pays concernés que des scientifiques.

Malgré tout, la maladie de Chagas possède deux caractéristiques non négligeables pour les chercheurs, elle tue (10 % des malades très rapidement) et il n'existe aucun moyen thérapeutique pour la combattre. Ces deux constatations permettent à l'Organisation Mondiale de la Santé de considérer cette maladie comme une de ses priorités pour la prochaine décennie.

## DEUXIEME PARTIE

2.1./ ENQUETES  
ETHNOPHARMACOLOGIQUES

2.2./ METHODOLOGIE DU  
CRIBLAGE BIOLOGIQUE

2.3./ SELECTION DES PLANTES

2.4./ ESSAIS BIOLOGIQUES SUR  
LES PRODUITS ISOLES

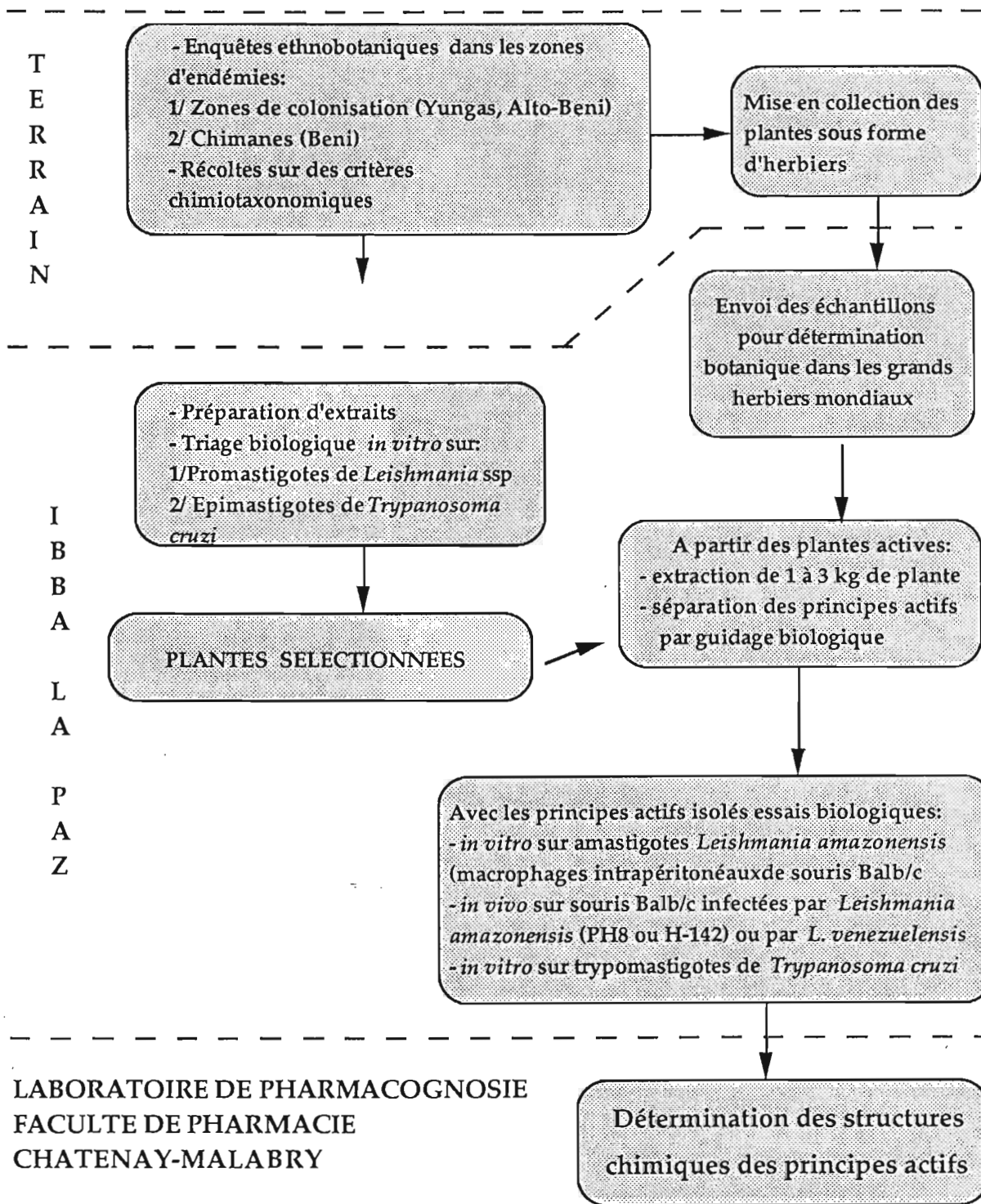


Schéma N° 2.1  
Chronologie des recherches

## Avant propos

Nous avons recueilli en Bolivie des informations ethnomédicales sur l'usage de plantes ou d'autres moyens pour traiter la leishmaniose tégumentaire provoquée par le parasite *Leishmania braziliensis*. A partir de ces informations d'une part, de nos connaissances en chimiotaxonomie et de notre expérience acquise sur le terrain d'autre part, nous nous proposons de mettre en évidence de nouvelles molécules actives contre cette maladie parasitaire. Malgré l'absence d'information sur le terrain, nous avons étendu notre champ d'investigation à la maladie de Chagas, en raison de l'analogie existant entre les parasites très voisins d'un point de vue taxonomique.

Les recherches se sont déroulées dans l'ordre chronologique suivant (voir schéma N°2.1.):

1/ Enquêtes ethnopharmacologiques sur le terrain dans les régions touchées par la leishmaniose cutanée, auprès des colons d'origine altiplanique (Aymaras et Quechuas), vivant dans les régions tropicales du département de La Paz (Yungas, Alto-Beni) et d'un groupe d'Amérindiens habitant les selvas des derniers contreforts andins des départements de La Paz et du Beni, les Chimanes.

Cette première étape comprend la recherche et la collecte d'informations, et la constitution d'échantillons d'herbiers qui permettront aux systématiciens d'identifier botaniquement les plantes récoltées.

2/ Les échantillons végétaux collectés sont ramenés à La Paz au laboratoire de Pharmacognosie de l'IBBA (Instituto Boliviano de Biología de Altura) et séchés. Avec chaque plante ou organe de plantes, plusieurs extraits sont préparés et testés biologiquement *in vitro* sur au moins trois espèces de *Leishmania* ssp au stade promastigote et sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote. Ce test simple permet de cibler rapidement en 48 ou 72 h les extraits actifs et également d'étudier un grand nombre d'échantillons.

3/ Dans l'étape suivante, à partir de 1 à 3 kg de matière première, il s'agit d'isoler les principes actifs, les tester sur les modèles biologiques et les identifier chimiquement. La séparation et l'isolement des produits font largement appel à diverses techniques chromatographiques (colonne avec ou sans pression, sous vide, chromatographie sur couche mince, flash chromatographie etc...). Chaque fraction obtenue est immédiatement testée sur le même modèle biologique que le triage préliminaire initial, c'est à dire *in vitro* sur trois espèces de *Leishmania*

ssp. au stade promastigote et trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote. Chaque fraction active continue à faire l'objet de séparations jusqu'à obtention de produits purs. Par cette méthode, c'est la biologie qui conduit la séparation et l'isolement des composés actifs.

4/ Avec les principes actifs isolés, réalisation d'une batterie de tests biologiques plus approfondis pour confirmer l'activité biologique:

- essais *in vitro* sur les formes intracellulaires, amastigotes de *Leishmania amazonensis*, par la méthode des macrophages intrapéritonéaux de souris.

- essais biologiques *in vivo* avec des souris de souche Balb/c sur une ou plusieurs souches de *L. amazonensis* (PH8 et H-142) et sur *L. venezuelensis* (H-3) le cas échéant.

- essais biologiques *in vitro* sur les formes circulantes, trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

- essais biologiques *in vivo* (souris Balb/c) sur *T. cruzi*.

5/ Les principes actifs sont identifiés chimiquement. Cette partie du travail a été réalisée en France, au Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry. L'identification des structures chimiques a fait largement appel aux données spectrales des différents produits, spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ou du carbone 13, de masse, ultraviolet et infrarouge.

## 2.1. ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES

### 2.1.1. Historique

L'idée d'étudier les plantes comme un moyen thérapeutique pour soigner les leishmanioses a germé dans notre esprit au cours de diverses missions sur le terrain, en Guyane Française.

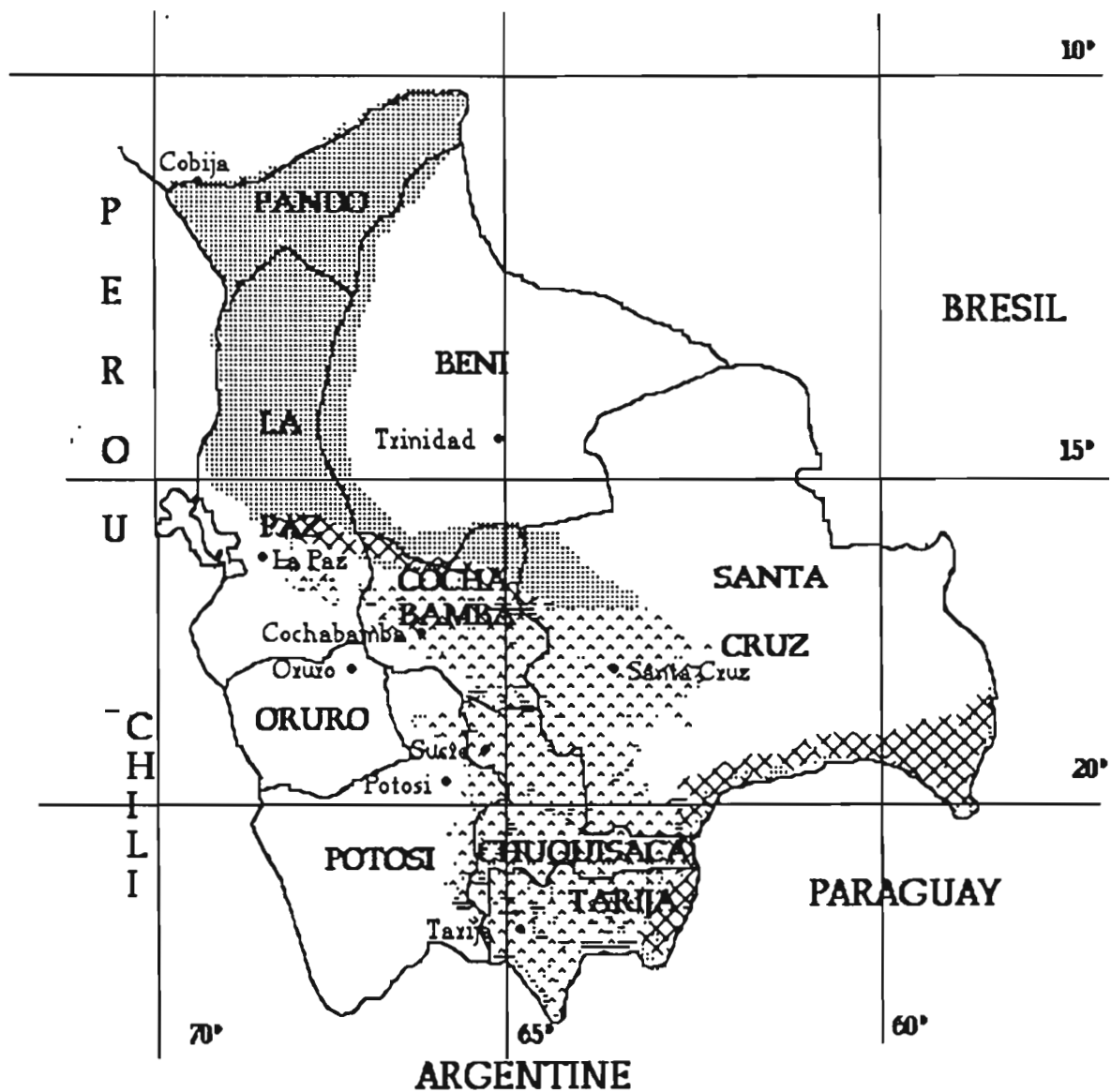
Avec un ami chercheur épidémiologiste spécialiste de la leishmaniose, F. LE PONT, nous avons été intrigués par le fait que certains amérindiens vivant en forêt amazonienne étaient marqués par des cicatrices caractéristiques dues à une leishmaniose cutanée, le "pian-bois" (*Leishmania guyanensis*). Nous nous sommes posés la question de savoir comment ces populations, vivant parfois très éloignées d'un centre de santé, parvenaient à soigner cette parasitose peu évidente à traiter, sans avoir recours aux thérapies classiques à base de dérivés antimoniés. Rapidement nous avons eu la réponse: ils utilisaient des plantes, généralement les feuilles ou les écorces fraîches, avec lesquelles ils élaboraient un emplâtre qu'ils appliquaient sur les lésions provoquées par *Leishmania guyanensis*.




Après ces observations sur le terrain et peu informés sur la nature des traitements employés pour combattre la leishmaniose cutanée, nous avons demandé l'avis de spécialistes des maladies parasitaires, médecins, parasitologues, dermatologues, sur l'efficacité de tels traitements externes. Presque tous ont émis des doutes sur la valeur scientifique d'une telle thérapie sur la leishmaniose cutanée.

Peu convaincus par les différentes explications, mais intrigués, nous voulions continuer dans cette voie car nous pensions qu'il était plausible de rencontrer des plantes actives sur la leishmaniose cutanée. Des précédents existent pour traiter des maladies parasitaires, telle que la quinine isolée des *Cinchona* (Rubiaceae) pour traiter le paludisme et tout récemment l'artémisine isolée de *Artemisia annua* (Asteraceae) employée dans la pharmacopée chinoise pour guérir également le paludisme. Dans le cas de la leishmaniose cutanée, très peu d'informations de ce type ont été recueillies.

Suite à l'affectation de F. LE PONT à l'IBBA (Instituto Boliviano de Biología de Altura) en Bolivie, nous avons reçu à Cayenne les feuilles d'une plante bolivienne nommée "Sebastian", *Oxalis* sp (Oxalidaceae) du prénom d'un collaborateur bolivien sur le terrain. Sebastian se traita un jour une leishmaniose cutanée due à une infection par *Leishmania braziliensis* en appliquant directement un emplâtre des feuilles fraîches sur la lésion pendant





-  Estimation des zones d'endémie de leishmaniose cutanée "espundia"
-  Estimation des zones d'endémie de la maladie de Chagas
-  Estimation des zones d'endémie où les deux maladies sont présentes

Carte N° 1  
 Estimations des zones d'endémies de la leishmaniose cutanée et  
 de la maladie de Chagas

deux semaines environ jusqu'à la cicatrisation de la plaie. Cette observation apporta un peu "d'eau à notre moulin" sur la possibilité de rencontrer des principes actifs d'origine végétale.

"Sebastian" pousse dans une région de colonisation fortement touchée par la leishmaniose cutanée. Son aire de végétation est bien déterminée des zones de colonisation de l'Alto-Beni au sommet de la Serrania de Marimono (900 m d'altitude) et, chose incroyable, on ne la rencontre qu'à cet endroit sur 2 à 3 km au bord de la piste. A ce jour cette plante n'est toujours pas déterminée botaniquement par les systématiciens.

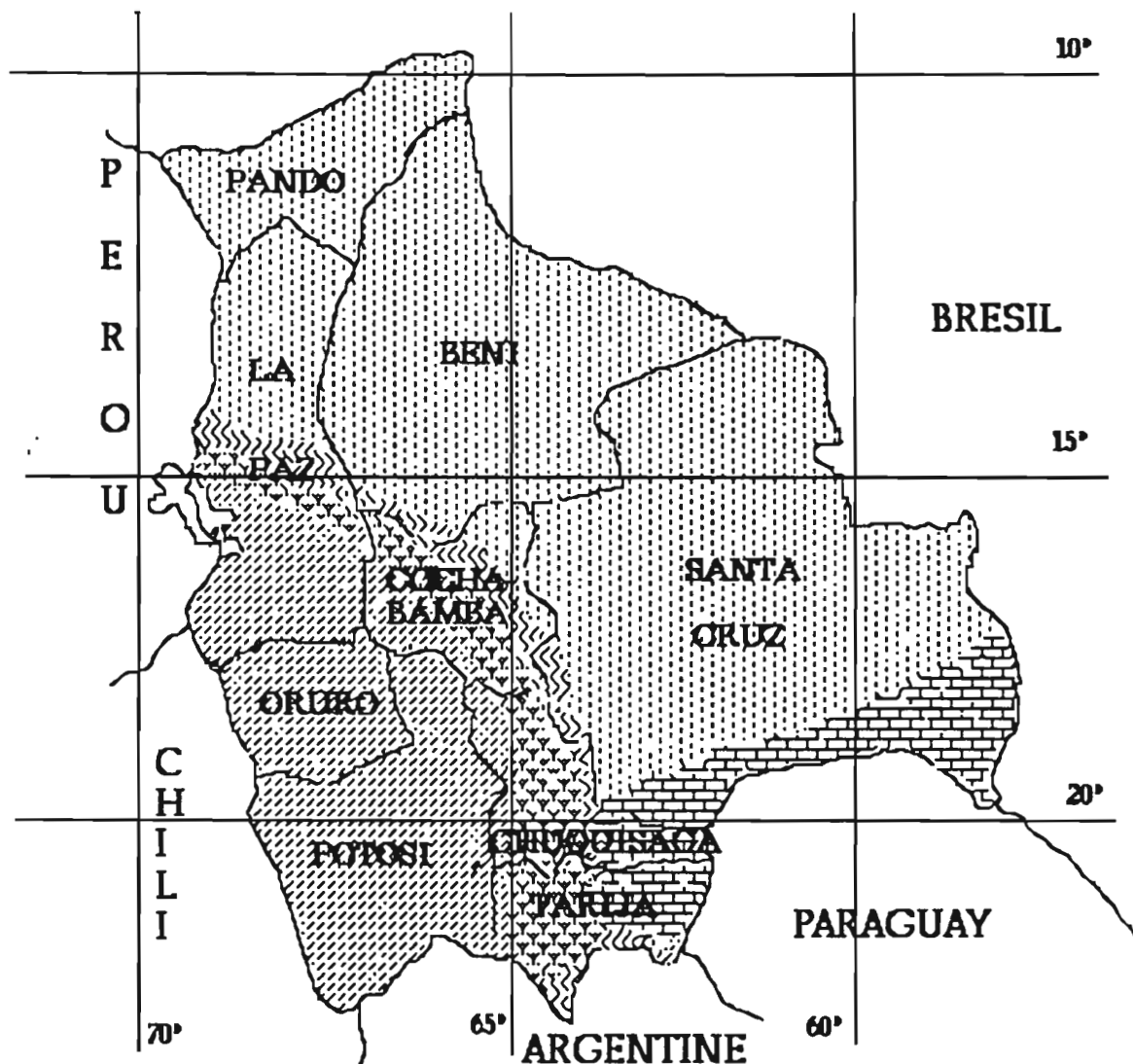
Différents extraits furent préparés avec ces feuilles et testés *in vitro* sur plusieurs souches de promastigotes de *Leishmania* ssp. à l'Institut Pasteur de Cayenne, *Leishmania guyanensis*, *L. amazonensis* et *L. braziliensis*. Une activité *in vitro* à la concentration 500  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  a été mise en évidence sur *Leishmania amazonensis*. Ceci nous parut très intéressant, mais nous verrons par la suite que cette activité biologique est bien faible par rapport aux résultats obtenus avec d'autres plantes.






Suite à ces résultats, nous avons convaincu le co-directeur de l'IBBA, le Dr. Ph DESJEUX, de créer un laboratoire de substances naturelles d'intérêt biologique dans le cadre de l'IBBA. Ensemble, un programme a été élaboré de recherche de nouvelles molécules extraites à partir des plantes et actives sur les leishmanioses et également sur la maladie de Chagas.

La sélection des plantes est basée sur leur emploi en médecine traditionnelle dans les zones d'endémies de la leishmaniose cutanée et de la maladie de Chagas (voir carte N° 1). Cette maladie est appelée par les colons et les populations natives "espundia".

A ce mode de récolte insuffisant pour approvisionner le laboratoire en plantes, il est ajouté la récolte des végétaux sur des critères chimiotaxonomiques.

Trois facteurs essentiels nous ont incité à monter ce projet, la richesse de la flore bolivienne, la connaissance des populations locales sur l'utilisation de leurs pharmacopées (Girault, 1984) et le niveau scientifique des recherches menées à l'IBBA dans les domaines de la parasitologie, l'épidémiologie et l'immunologie des leishmanioses et de la maladie de Chagas. Dans cet institut de recherches franco-bolivien, nous avons eu la chance de collaborer et d'être conseillé par des épidémiologistes, des biochimistes, des médecins et des immunologistes qui nous ont aidé à monter ce programme et aussi à former nos collaborateurs boliviens et nous-mêmes aux techniques d'essais biologiques.



-  Altiplano - 6500m à 3500m d'altitude
-  Vallée 3500m à 2000m d'altitude
-  Piémont andin - 2000m à 500m d'altitude
-  Savanes du Chaco - 400 à 300m d'altitude
-  Zones amazoniennes - 400m à 100m d'altitude

Carte N° 2  
Bolivie physique

## 2.1.2. Généralités géographiques et économiques sur la Bolivie

Avant de faire part de notre expérience et des résultats acquis au cours des six années en Bolivie, il serait bon de rappeler quelques données sur ce pays.

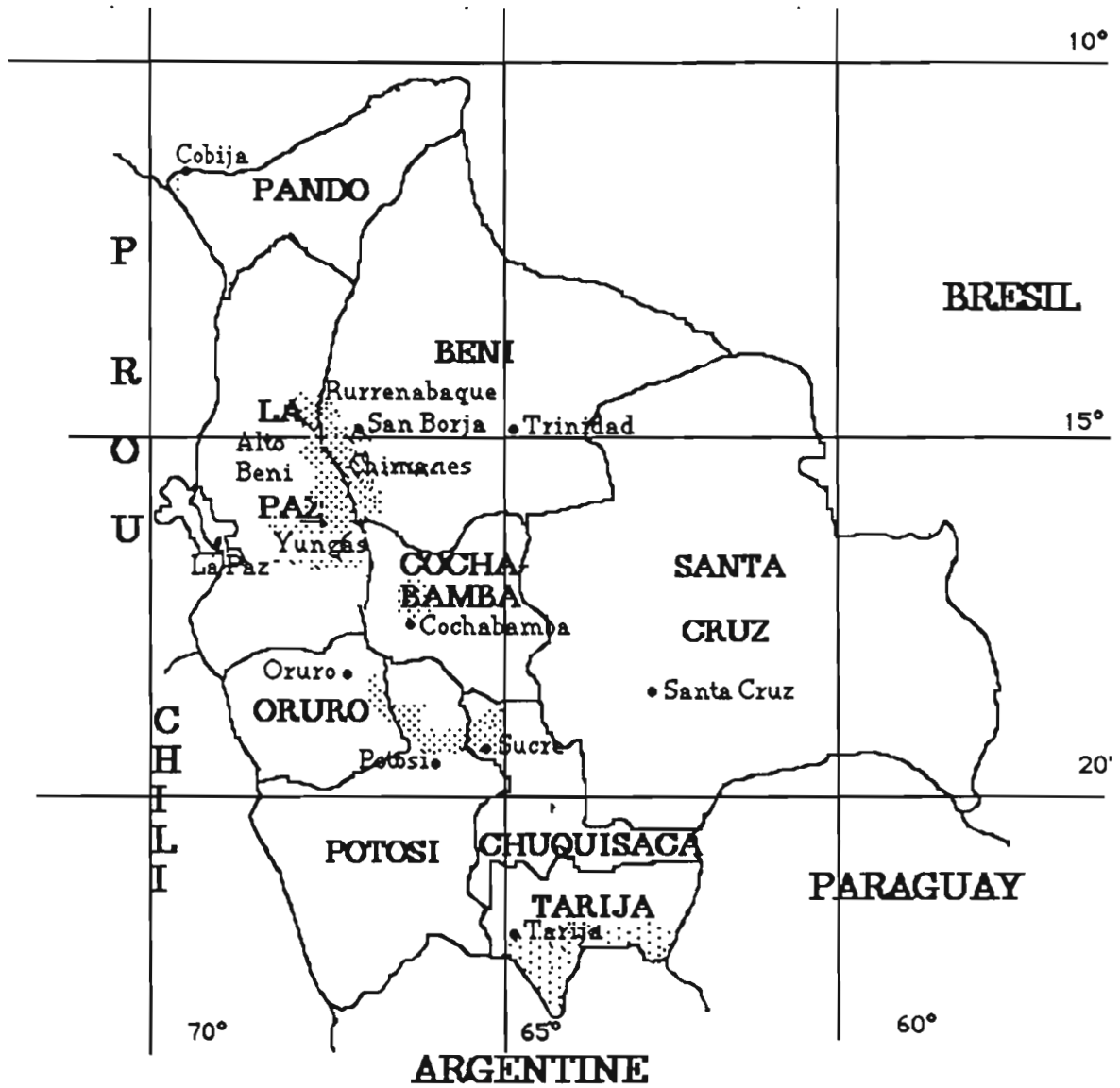
La Bolivie (voir Carte N° 2) est un pays de 1.098.580 km<sup>2</sup>, enclavé, bordé à l'Est et au Nord par le Brésil, au Sud par l'Argentine et le Paraguay, au Nord-Ouest par le Pérou et au Sud-Ouest par le Chili. La population bolivienne est évaluée à 7.000.000 d'habitants environ; elle est composée à 70 % par des Indiens, 25 % par des métis et 5 % par des Européens. Le pays est traversé à l'Ouest, du Nord au Sud, par la chaîne montagneuse des Andes.

Les régions d'altitude représentent un tiers de la superficie du pays où vivent les deux tiers de la population. La région andine comprend le haut plateau ou altiplano, où vivent les Indiens Aymaras (région du Lac Titicaca et des villes de La Paz et de El Alto) et les Indiens Kechuas (Oruro, Potosi, Cochabamba). Ces Indiens sont essentiellement des paysans. Ils pratiquent généralement la culture d'autosubsistance, principalement les céréales (blé, quinoa, orge, avoine, maïs), les pommes de terre et l'élevage des moutons, des lamas et autres camélidés d'altitude (alpagas et vigognes). En dehors de cette activité agricole, l'essentiel de l'économie de ces régions d'altitude repose sur l'exploitation du sous-sol, en particulier les mines d'étain.

Le reste du pays, soit les deux tiers de la superficie, est constitué de plaines. Ces régions sont tropicales et habitées par un tiers des habitants d'origine amérindienne, métis ou blanches (départements du Beni à l'Est, de Santa-Cruz au Sud-Est et du Pando au Nord).

L'activité économique de ces régions s'appuie sur l'élevage des bovins, l'exploitation forestière, la prospection, l'extraction aurifère et l'extraction pétrolière aujourd'hui principale source de devises du pays. Le PNB (produit national brut) par habitant et par an de la Bolivie est de l'ordre de 500 \$, qui en ferait le PNB le plus bas de tout le continent sud-américain après Haïti.

L'espérance de vie d'un bolivien est comprise entre 50 et 55 ans; celle d'un mineur travaillant dans une mine d'étain sur l'Altiplano est inférieure à 40 ans. Les problèmes économiques engendrés par la baisse du cours des matières premières (étain et autres minéraux) ont amené le gouvernement bolivien à prendre la décision de fermer les mines d'étain nationalisées (Compagnie Minière Bolivienne, COMIBOL) non rentables. Les mineurs se retrouvant sans emploi se sont vus proposer par le gouvernement la possibilité de mettre en valeur les terres tropicales ou sub-tropicales des départements de La Paz (Yungas, Alto-Beni), du Beni, de Cochabamba et de Santa-Cruz en leur offrant des



 Zones de récoltes et de prospections ethnopharmacologiques

Carte N° 3  
Régions de Bolivie prospectées

parcelles de forêts tropicales à défricher. C'est l'apparition du phénomène de la colonisation déjà bien connu dans d'autres pays sud-américains andins avec des régions amazoniennes et d'altitude (Pérou, Equateur).

### **2.1.3. Prospections ethnopharmacologiques dans les zones de colonisation des Yungas et de l'Alto-Beni**

Ces populations d'origine altiplanique, Quechas ou Aymaras, arrivent dans un milieu très hostile et inconnu auquel ils ne sont pas préparés, la forêt ou selva en espagnol. Dès leur arrivée, ils doivent s'acclimater à la chaleur, au changement de nourriture, et surtout, ils sont rapidement en contact avec les maladies tropicales, essentiellement, la leishmaniose tégumentaire ou espundia, la fièvre jaune, le paludisme et toutes les viroses connues ou inconnues endémiques à ces régions. Ces maladies sont totalement absentes en altitude.

L'impact du choc avec ce milieu est accentué par la malnutrition, les changements de nourriture, d'habitat, de climat et les conditions de vie très difficiles, logement précaire, dispersé, avec des infrastructures routières, sanitaires et éducatives peu développées. Cet éloignement de tout service (école, dispensaire) influe largement sur leur état physique et psychologique.

Le colon en arrivant doit défricher le lopin de forêt primaire ou secondaire, appelé "chaco", que lui a donné l'état bolivien pour qu'il le mette en valeur sous peine de perdre la propriété de ce terrain s'il n'est pas cultivé les cinq premières années. Ce terrain serait remis ensuite à des voisins plus courageux ou convoitant les terres. Au cours de cette phase de mise en valeur de la terre, les colons sont continuellement agressés par des nuées d'insectes parmi lesquels se trouvent les phlébotomes, vecteurs de la leishmaniose cutanée. Ces phlébotomes vivent aux pieds ou aux sommets des arbres, ou bien dans les litières. Cette perturbation du milieu, abattage des arbres, brûlis, entraîne une activité accrue des phlébotomes qui transmettent la leishmaniose cutanée aux colons pendant ce travail de défrichage.

Personne ne connaît exactement l'incidence exacte de la leishmaniose cutanée sur ces populations, mais certains épidémiologistes travaillant à l'IBBA estiment qu'au cours de la première année de contact avec la forêt, environ 50 % des colons sont contaminés par cette maladie.

Les premiers temps, nous nous sommes intéressés principalement à deux régions de colonisation (voir carte N° 3) du département de La Paz, les Yungas (altitude entre 3000 m et 1000 m) une région de colonisation déjà ancienne (20 à 30 ans) proche de La Paz, et à l'Alto-Beni, situé dans le piémont andin à des

altitudes variant entre 1100 m et 200 m, une zone de colonisation plus récente. Ces deux régions se caractérisent par des climats sub-tropicaux ou tropicaux avec une pluviométrie importante (3 à 4 m d'eau par an), une saison sèche de juin à octobre et une saison pluvieuse de novembre à avril, toutes deux très marquées.

La principale activité de ces régoins est l'agriculture, production de fruits, d'agrumes, de bananes, de coca, l'élevage des bovins et l'exploitation du bois. La couverture sanitaire y est très peu développée, ce qui a pour conséquence de livrer à eux-mêmes les colons pour se soigner.

Une fois installé, le colon apprend très vite à reconnaître, avec l'aide des membres les plus anciens de sa communauté, une leishmaniose tégumentaire provoquée par le parasite *Leishmania braziliensis*. Les échanges avec les populations originaires de ces régions (Indiens Mozetenes ou Chimanes) et les colons ne se font pas facilement. Une certaine méfiance règne entre eux. La disparition des traditions culturelles de ces populations natives chez les jeunes, poussent ceux-ci à adopter les modes de vie des nouveaux arrivants. Le nombre de ces natifs est en constante diminution en particulier chez les Mozetenes.

L'absence de couverture sanitaire et le manque de connaissance d'un milieu profondément différent de celui qu'il cotoyait sur l'Altiplano obligent les colons à improviser des traitements. La leishmaniose tégumentaire représente pour eux une sorte de chancre qu'il faut brûler pour assainir la plaie. Cette représentation de la maladie, comme nous le verrons par la suite, est la même chez les Indiens Chimanes des forêts amazoniennes, à la différence près que chez ces derniers, l'espundia fait partie de leur environnement et qu'ils ne la craignent pas.

Lors de nos premières projections sur le terrain, les colons que nous avons rencontrés, nous ont indiqué qu'ils employaient d'autres moyens que les plantes, notamment, l'essence de voiture, le gasoil, le kérosène, l'acide sulfurique de batterie, le jus de citron, ou la poudre noire des piles. Certains même n'hésitent pas à brûler la lésion en l'approchant près d'une flamme ou même utiliser de l'explosif T.N.T. (trinitrotoluène) pour "cramer" la plaie. Cette caractéristique de causticité ou de corrosion des traitements est également commune à toutes les plantes utilisées contre l'espundia. Les latex d'arbre particulièrement corrosifs, tels que ceux de *Ficus* sp (Moraceae) ou d'*Ura crepitans* L. (Euphorbiaceae), sont couramment utilisés.

La plante "Sébastien" une Oxalidacée (*Oxalis* sp.), est le point de départ et le fil conducteur de toutes ces recherches. "Sebastian" pousse dans l'Alto-Beni en milieu subtropical, à 900 m d'altitude sur le Serrania de Marimono (à 250 km environ à l'Est de La Paz). C'est une herbacée que l'on rencontre au bord du

chemin dans une zone restreinte de quelques kilomètres de long. Malgré une prospection intense cette plante n'a pas été collectée ailleurs qu'à Marimono. Les feuilles fraîches sont écrasées pour les réduire en pâte, puis appliquées directement sur la lésion leishmanienne. L'emplâtre est renouvelé plusieurs fois par jour. Notre informateur Sebastian a cicatrisé ainsi une lésion de 1cm de diamètre en trois semaines environ.

Nous avons eu l'idée, avec des médecins parasitologues et dermatologues de l'IBBA, de fabriquer une pommade avec un extrait actif purifié de "Sebastian" pour vérifier son efficacité sur des malades ayant des problèmes avec le traitement aux antimoniés, résistance des parasites au médicament, allergie à l'antimoine ou personnes à risque ne pouvant pas recevoir de Glucantime<sup>R</sup>. Ce projet n'a jamais pu se concrétiser à cause du manque d'information sur l'activité et la toxicité de "Sebastian". Par contre il a été possible de réaliser un essai clinique sous contrôle médical sur une plus grande échelle que celle prévue au départ.

"Sebastian" connu son "heure de gloire" lorsqu'en 1984, des médecins voulurent l'expérimenter sur des travailleurs employés par une compagnie de prospection pétrolière dans les forêts primaires des derniers contreforts andins de l'Alto-Beni, deux cents travailleurs ayant été infectés par *Leishmania braziliensis* sur un total de six cents personnes prospectant en forêt.

Bien qu'il n'y eut aucun problème d'approvisionnement en Glucantime<sup>R</sup> plusieurs malades ne purent cicatriser leur lésion malgré des traitements supérieurs à 80 ampoules et parfois même de 150 à 180 ampoules de Glucantime<sup>R</sup> chez certains malades. Les médecins de notre institut eurent l'idée d'appliquer sur ces lésions résistantes au Glucantime<sup>R</sup> un onguent fabriqué avec la fraction active de "Sebastian" et un excipient à base de lano-vaseline.

Cet essai "clinique" avec la pommade "Sebastian" (Desjeux et al., résultats non publiés) sur 27 malades nous a permis d'observer 24 cicatrisations totales, et 3 échecs à ce traitement. Malheureusement, il n'a pas été possible de suivre l'évolution de la maladie chez les patients traités avec la pommade, sur les plans sérologique et clinique, et sur une période suffisamment longue pour pouvoir conclure à un effet thérapeutique de "Sebastian". Plus tard, au cours de l'étude biologique *in vivo* de cette plante nous n'avons pas pu détecter une activité leishmanicide. Nous pensons qu'il pourrait s'agir d'une activité cicatrisante qui reste à prouver.

L'expérience de la plante "Sebastian" a été enrichissante et a permis d'apprécier les limites des informations recueillies chez une population de colons récemment installée, dans un milieu nouveau pour eux et totalement



différent de celui qu'ils ont connu en altitude sur l'Altiplano.

Après cette collecte dans les zones de colonisation à rechercher les plantes supposées leishmanicides, le bilan était mince. Sur une dizaine de plantes récoltées sur information, seules deux espèces de *Bocconia* (Papaveraceae) avaient donné des résultats positifs *in vitro* sur les milieux de culture des parasites.

#### 2.1.4. Enquêtes ethnopharmacologiques chez les Chimanes

Nous étions loin de nos objectifs et nous commençons à douter de l'efficacité des plantes sur la leishmaniose cutanée. L'espoir mis dans la pommade "Sebastian" s'est "envolé" et nous a contraint à rechercher de nouvelles informations. Elles ont été trouvées chez des populations natives des régions tropicales des derniers contreforts des Andes aux limites des départements de La Paz et du Beni, les Chimanes. Cette rencontre avec les Chimanes n'aurait jamais eu lieu si nous n'avions pas fait la connaissance de deux "Padres" l'un suisse et l'autre alsacien par l'intermédiaire du Dr. Philippe DESJEUX.

Le premier, le Padre Christian FREZARD (suisse), est responsable de la paroisse de San Borja, une bourgade de 12.000 h dans le département du Beni et le second, le Padre Martin BAUR (alsacien), est installé depuis plus de 30 ans dans la réserve Chimanes et vit en Bolivie depuis plus de 50 ans.

Le padre Martin a construit une mission à Fatima de Chimane au pied des premières serranias (chaines de montagne) des Andes aux limites du département de La Paz et du Beni, à 25 mn d'avion au sud-ouest de San Borja ou à cinq ou six jours de pirogue par le fleuve, seul moyen de communication terrestre possible pour se rendre à Fatima. Nos deux Padres étaient très intéressés et sensibilisés par nos recherches.

Ils étaient déjà parties prenantes dans la lutte contre ce fléau qu'est l'espundia dans le cadre de programmes de développement au sein d' O.N.G. (Organisations Non Gouvernementales) humanitaires ou avec des organisations internationales. Ils nous ont proposé de venir étudier la pharmacopée utilisée par les Amérindiens Chimanes et de favoriser au maximum notre approche ethnopharmacologique. Nous avons bénéficié de leur connaissance, de l'environnement, de leurs infrastructures d'accueil, de leur expérience de plusieurs dizaines d'années de présence en Bolivie dans les régions amazoniennes, du terrain et surtout de leurs contacts avec les hommes vivant dans la forêt, les Chimanes.

Le Padre Martin habite dans une région à 100 % Chimanes (200 à 300 âmes environ). Il nous avait rapporté que ces derniers employaient couramment les plantes pour traiter les lésions leishmaniennes.

Les Chimanes vivent au pied des premières chaînes de montagne des Andes aux limites des départements du Beni et de La Paz aux bords des rios Yucumo, Chimane et Maniqui. Le groupe Chimanes est évalué à 4000 et 5000 personnes réparties sur une région de plus de 120 km de long sur 50 km de large. Nous ne savons rien de leurs origines. L'idiome parlé par les Chimanes ressemble en rien aux langues parlées par les Indiens de l'Altiplano, Aymaras ou Quechuas. A les écouter on croirait des asiatiques de l'extrême orient; ils parlent d'une façon quasiment inaudible pour un européen habitué au bruit. Certains d'entre eux comprennent et parlent l'espagnol, par exemple nos deux informateurs, Miguel et Maximiliano, tous les deux âgés de 55 ans.

Les Chimanes vivent dispersés par famille ou par clan dans un groupement de quelques habitations aux toits de tuiles de palmes; l'organisation en village n'existe pas chez les Chimanes. Les familles sont nombreuses, il n'est pas rare de rencontrer des familles nombreuses de 12 à 15 enfants. Ils sont monogames. Ils ont l'habitude de changer de lieu d'habitation en fonction des conditions des saisons et des conditions de pêche et de chasse. Il n'est pas rare qu'ils aillent à la ville (San Borja, Rurrenabaque, Yucumo ou Reyes) pour vendre leur production, de riz ou de tuiles de palmes très recherchées par les habitants du Beni. Les Chimanes vivent de chasse et de cueillette et cultivent des parcelles de terres prises à la forêt appelées "chaco", pour y planter du manioc, du maïs, du riz, des ignames, des bananes à cuire, et récemment grâce au Padre Martin du cacao. Le manioc et le maïs servent à fabriquer par mâchement un alcool, la chicha dont les Chimanes sont de grands consommateurs.

Ils s'installent généralement près des rivières ou des fleuves qu'ils parcourent avec des pirogues taillées dans la masse de l'arbre. Ce sont d'habiles pêcheurs et chasseurs. Ils pêchent soit avec des arcs et des flèches ou, quand le besoin de poissons est plus important, avec des plantes ichtyotoxiques, les "barbasco", les feuilles de *Tephrosia vogelii* (Leguminosae), ou la tige lianescente de *Serjania tenuifolia* (Sapindaceae) ou le latex de "soliman" *Ura crepitans* L. (Euphorbiaceae). Parfois ils achètent pour aller plus vite un bâton de dynamite qu'ils jettent dans la rivière en ayant au préalable emprisonnés avec des barrages de branches les poissons comme dans une mare.

Nous n'avons pas remarqué une organisation hiérarchique chez les Chimanes, ni de manifestation de chamanisme; la connaissance des plantes se transmet naturellement à tous les membres de la famille, un peu comme chez

les pygmées d'Afrique.

Aux premiers contacts, nous avons observé qu'un bon nombre de sujets adultes ou enfants présentaient des cicatrices caractéristiques d'une espundia. Nous leur avons demandé par quel moyen ils avaient réussi à cicatrifier les ulcérations provoquées par la leishmaniose cutanée. Nos deux informateurs, Miguel et Maximiliano se sont proposés de nous montrer ces traitements essentiellement à base de plantes. Les Chimanes ne nous ont jamais parlé d'application d'essence ou d'autres produits de ce genre sur les lésions.

Malgré leur méfiance à notre égard au premier abord et quelques difficultés pour communiquer avec eux, ils nous ont emmenés dans la forêt. Après plusieurs séjours de trois à quatre semaines à Fatima, ils nous ont montré trois plantes employées régulièrement pour traiter l'espundia.

La première plante est appelée "évanta" par les Chimanes; c'est une Rutacée identifiée par le spécialiste de la famille, J. KALLUNKI (New York Botanical Garden), à *Galipea longiflora* Krause. En dehors de son emploi pour traiter les leishmanioses cutanées, les décoctions d'écorces du tronc prises trois fois par jour guériraient les cas d'amibiase. A ce propos le Padre nous a confié qu'il y a trente ans, alors qu'il souffrait d'amibes et qu'il était soigné par injections d'émétine sans aucun effet, il a suivi un traitement avec les décoctions d'"eventa" et que depuis cette époque les amibes ne l'ont plus inquiété.

La deuxième plante appelée "apaïñiki" par nos informateurs Chimanes a été identifiée pour le directeur de l'Herbier National de Bolivie, le Dr. S. BECK, à *Pera benensis* Rusby de la famille des Euphorbiacées.

La troisième plante indiquée comme leishmanicide se nomme "sou'sou" et a été identifiée par C.A. TODZIA (Université du Texas, Austin, USA) à *Ampelocera edentula* Kuhn de la famille des Ulmacées.

Ces trois plantes sont utilisées en topiques sur les lésions leishmaniennes. Les écorces du tronc pour les trois espèces sont récoltées par un grattage soigneux du tronc et sont appliquées fraîches sous la forme d'un emplâtre directement sur les plaies. Le cataplasme est renouvelé plusieurs fois par jour jusqu'à cicatrisation complète de la lésion. L'application de ces plantes provoquent une sensation de brûlure qui reste une dizaine de minutes. Toutes les plantes sont employées localement et jamais sous forme de préparations prises oralement.

Cette application des plantes sur la plaie provoquent une petite irritation

de la peau qui se traduit par l'apparition d'une rougeur qui disparaît lorsque le traitement est suspendu.

Contrairement aux plantes récoltées précédemment dans les zones de colonisation, plusieurs extraits préparés à base de ces trois plantes ont montré une activité leishmanicide *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* au stade promastigote ainsi que sur plusieurs souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote, au laboratoire à La Paz.

A quelques reprises, il nous a été permis de voir des Chimanes présentant des formes muqueuses, attaques des cartilages de la cloison nasale, du palais ou de la gorge, ce qui démontreraient que les Chimanes sont également touchés par l'espundia, mais dans des proportions nettement moins importantes que les colons. Certains scientifiques parlent de phénomène d'immunisation, mais cela n'a pas encore prouvé scientifiquement.

Il n'est pas sûr que les Chimanes ou les colons fassent le rapprochement entre une leishmaniose cutanée cicatrisée et l'apparition plusieurs années après d'une leishmaniose cutanéomuqueuse, conséquence de la première. Ceci tendrait à changer avec les campagnes d'information et de sensibilisation organisées par le ministère de la Santé bolivien, par les ONG (Organisation Non Gouvernementale) et par certaines organisations internationales.

Souvent, l'espundia continue d'évoluer malgré la cicatrisation de la lésion cutanée, pour provoquer des lésions mutilantes au niveau des muqueuses du nez, des lèvres, du palais et de toutes les régions cartilagineuses de la figure. Les personnes atteintes de leishmaniose tégumentaire ne prennent pas conscience de la gravité de la maladie. Une fois que le parasite a "métastasé" dans les régions cartilagineuses de la face, les traitements locaux n'ont plus aucune efficacité sur ces formes cutanéomuqueuses, tout comme les injections de dérivés antimoniés (Glucantime<sup>R</sup>).

Les malades savent bien que la médecine locale n'a plus aucun effet. A notre connaissance rien n'est tenté pour enrayer le mal. Il ne reste plus au malade qu'à faire le long voyage jusqu'à La Paz (plus de 24 h par la route) pour commencer un traitement par perfusion d'amphotéricine B. Cette carence de ce type de service hospitalier apte à faire des perfusions est en train de disparaître par la mise en place de trois dispensaires (Sapecho, Rurrnabaque et San Borja) équipés pour effectuer des perfusions d'amphotéricine B, le seul traitement réellement efficace pour traiter ces formes de leishmaniose. Cette implantation de dispensaires équipés est dirigée par le ministère de la Santé bolivien, avec l'appui scientifique de l'IBBA et aussi sur le terrain avec toutes les bonnes volontés sur place.

### 2.1.5. La leishmaniose viscérale en Bolivie

En ce qui concerne la leishmaniose viscérale, provoquée par *Leishmania donovani*, seuls quelques cas ont été décrits en Bolivie, chez des enfants, dans les Yungas (Desjeux et al., 1986b). La plupart des cas passent souvent inaperçus par le manque de reconnaissance de la maladie par les populations et par le corps médical. Cette maladie est transmise par des phlébotomes et le réservoir domestique identifié avec certitude est le chien, ce qui explique que les enfants restent plus à la maison que les adultes soient les principales victimes de cette maladie. Cette infection provoque la mort si elle n'est pas traitée à temps. D'après certains épidémiologistes la leishmaniose viscérale aurait été importée en Amérique latine par les chiens des colons portugais ou espagnols (Desjeux et al., 1986b; Killick-Kendrick et al. 1980).

### 2.1.6. La maladie de Chagas en Bolivie

Au cours des six années passées en Bolivie, nous avons cherché à étendre le spectre d'activité de nos extraits de plantes à la maladie de Chagas, une des priorités de santé publique en Bolivie. Cette infection est provoquée par un protozoaire voisin des *Leishmania ssp*, *Trypanosoma cruzi*. Au cours des différentes missions sur le terrain il a été tenté à plusieurs reprises de collecter des informations concernant l'utilisation des plantes comme moyen thérapeutique. Aucune information n'a été portée à notre connaissance, même dans des régions où cette maladie est une endémie importante, par exemple plus de 50 % de la population serait touchée par ce fléau dans le département de Tarija au sud du pays frontalier de l'Argentine. Il faut préciser que très peu de signes extérieurs apparaissent chez les malades, à part, le signe de Romaña (oedème palpébral). La présence en abondance du vecteur dans les habitations, les triatomes appelés localement "vinchuca", n'incite pas leurs habitants à rechercher des remèdes à cette maladie, malgré sa gravité.

Les personnes infectées par *T. cruzi* vivent en milieu rural dans des habitations aux murs en pisé. Les triatomes craignant la lumière se cachent la journée dans les interstices entre les briques d'abode ou bien dans les récoltes de maïs stockées dans les greniers. La nuit les triatomes sortent de leur cachette et viennent chercher leur repas sanguin sur les personnes ou les animaux domestiques. Lorsque l'insecte a terminé le repas sanguin, il défèque sur l'épiderme. Le sujet piqué se gratte et favorise la pénétration dans l'organisme des éventuels parasites contenus dans les excréments.

Dans certaines régions de Bolivie (Cochabamba, Sucre, Tarija) il n'est pas rare que plus de la moitié des triatomes soient porteurs de *Trypanosoma cruzi*. Le Ministère de la Santé (Valencia Telleria, 1979) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont estimé qu'il y aurait deux millions de personnes touchées par la maladie de Chagas, soit un tiers de la population bolivienne. Certains épidémiologistes brésiliens évalueraient à 10 % le nombre des malades succombant au cours des premiers mois qui suivent leur contamination par les parasites, auxquels il faut ajouter 20 à 30 % des personnes infectées qui développeront des pathologies cardiaques ou du système digestif.

Les risques de contamination par transfusion sanguine ne sont pas négligeables, lorsque le sang n'a pas subi de traitement prophylactique avec le violet de gentiane.

La collecte d'informations a été étendue à l'utilisation traditionnelle des plantes pour combattre d'autres parasitoses comme l'amibiase, le paludisme et aussi à des emplois un peu éloignés des antiparasitaires, les plantes ichtyotoxiques, insecticides, répulsives. Pour compléter les récoltes, il a été ajouté à nos critères de collectes, la notion de chimiotaxonomie, genres de plantes susceptibles de contenir des métabolites secondaires connus pour leurs activités biologiques (alcaloïdes, quinones, terpènes, etc...).

### 2.1.7. Récoltes botaniques

A chaque récolte d'une plante, un numéro de récolte est attribué, avec la date de récolte, le lieu de la récolte, son emploi éventuel en médecine traditionnelle, puis une petite description de la plante, voire un petit dessin qui permettra de la retrouver facilement le cas échéant.

Avec une même plante, plusieurs parts d'herbiers sont préparés, de préférence avec des fleurs ou des fruits, sur le terrain. Une part est destinée à l'Herbier National de Bolivie, une est donnée au systématicien chargé de la détermination de la plante, une autre est envoyée au Museum d'Histoire Naturelle de Paris en Phanérogamie, une autre envoyée à l'Herbier ORSTOM de Cayenne, et une dernière reste à l'IBBA comme échantillon de référence.

75 % des 518 plantes récoltées ont pu être identifiées botaniquement au niveau du genre et de l'espèce grâce à la collaboration d'un réseau de systématiciens travaillant dans les plus grands herbiers du monde tels que, le New York Botanical Garden, l'Institute Smithsonian de Washington, le Field Museum de Chicago, le Missouri Botanical Garden de Saint Louis, le Kew Garden, le Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, l'Herbier du Centre ORSTOM

de Cayenne, sans oublier l'aide précieuse des botanistes de l'Herbier National de Bolivie à La Paz, le Dr. S. BECK, le Dr. J. SOLOMON et le Dr. D. SMITH.

Parmi ces plantes identifiées, cinq plantes sont considérées comme des espèces nouvelles par les systématiciens. Ces nouveaux taxons ont pour nom:

- *Cleome boliviensis* Eichl., Capparidaceae identifiée par H.H. ILTIS (Wisconsin, USA), récoltée à 400 m d'altitude dans la région de Rurrenabaque (Alto-Beni, département de La Paz).

- *Puya fournetii* L.B. Smith & R.W. Read, Bromeliaceae identifiée par L.B. SMITH (Smithsonian, Washington, USA), récoltée à 2900 m d'altitude dans les Yungas (département de La Paz).

- *Vernonia fournetii* H. Robinson & B. Kahn, Asteraceae (Robinson et Kahn, 1985) identifiée par H. ROBINSON (Smithsonian, Washington, USA) récoltée à 2500 m d'altitude dans les Yungas (département de La Paz).

- *Munnozia fournetii* H. Robinson, Asteraceae (Robinson, 1987) identifiée par H. ROBINSON (Smithsonian, Washington, USA) récoltée à 2950 m d'altitude dans les Yungas (département de La Paz).

- *Passiflora fournetii* C. Feuillet, Passifloraceae identifiée par C. FEUILLET (ORSTOM), récoltée à 3000 m d'altitude dans les Yungas (département de La Paz).

## ETAPE DE TRIAGE

### Préparation d'extraits

#### Triage biologique *in vitro*

- Promastigotes de *Leishmania* ssp  
*Leishmania braziliensis* (M 2903, M 2904)  
*L. amazonensis* (PH8, H-142)  
*L. donovani* (M 2682)
- Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*  
Tulahuen  
C8 CL1  
Tehuentepec

## PLANTES SELECTIONNEES

Schéma N° 2.2  
Plan de travail après la récolte des plantes sur le terrain



## 2.2. METHODOLOGIE DU CRIBLAGE BIOLOGIQUE (schéma N° 2.2.)

### 2.2.1. Tests biologiques *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* ssp au stade promastigote (Muñoz Ortiz, 1987)

#### 2.2.1.1. Culture biologique des leishmanies au stade promastigote

Le stade promastigote des différentes espèces de *Leishmania* ssp. est maintenu en culture *in vitro* par repiquages successifs (tous les 7 à 15 jours selon les espèces) en boîtes de culture de type "Corning" de 25 ml ou en tubes de culture.

Pour obtenir une meilleure croissance des parasites nous ajoutons 2 ml du milieu de culture NNN liquide modifié (Novy, Mac Neal, Nicoll) dans une boîte, puis 50 µl de milieu de culture contenant environ  $8 \times 10^6$  parasites par ml, soit environ 400.000 parasites par boîte. Cette inoculum est prélevé dans un tube dont la présence de promastigotes a été observée au microscope. Ces parasites sont en grande partie de formes jeunes. Après 48 heures à l'étuve à 28° C, nous additionnons de nouveau 2 ml de milieu NNN.

D'autres milieux de culture que le NNN peuvent être utilisés pour cultiver les promastigotes de *Leishmania* ssp., le LIT (Liver Infusion Tryptose), le Schneiders Drosophila et le RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum foetal de veau (GIBCO) décomplémenté à 56° C pendant 30 mn.

#### Technique de préparation du milieu NNN modifié

B.S.S. (Buffer Salt Solution)	500 ml
Bafto Beef "Gifco"	25 g
Neopeptone	10 g
Agar	10 g
Sang de lapin	
Sérum foetal de veau	

A 500 ml de BSS (Buffer Salt Solution) sont ajoutés 25 g de Bafto Beef et 10 g de néopeptone. L'ensemble est porté à ébullition. Après refroidissement de la solution le pH est ajusté à 7,4 avec une solution de NaOH 1N, puis 10 g d'agar sont introduits. La solution est portée à ébullition, stérilisée à l'autoclave à 1 bar pendant 30 mn, puis refroidie.

80 à 100 ml de sang de lapin sont additionnés, mélangés, et agités. La

solution est ensuite filtrée afin d'éliminer la gélose en suspension. Le filtrat est refiltré sur filtre stérile (Millipore) de 0,22 et 0,45  $\mu\text{m}$  sous flux laminaire auquel il est ajouté 10 % de sérum foetal de veau. Cette solution préparée est conservée à 4° C.

Les tests biologiques sont réalisés dans des microplaques stériles de type "Limbro" ou "Falcon" avec couvercle de 96 puits à fond plat. La capacité de chaque puits est d'environ de 0,35 ml, et de 0,28  $\text{cm}^2$  de surface.

Le solvant employé pour dissoudre les extraits de plantes est en général le DMSO (diméthylsulfoxyde). Avant d'entreprendre les essais avec les extraits de plantes, la cytotoxicité du DMSO a été évaluée. Il apparaît que ce solvant employé à des concentrations inférieures ou égales à 0,5 % n'a aucun effet sur la croissance des parasites.

### **2.2.1.2. Préparation des extraits végétaux**

En général trois extraits sont préparés à partir de chaque plante ou organe de plante par macération de quelques grammes de plantes broyées et séchées dans un Erlenmeyer pendant deux jours:

- un extrait apolaire avec de l'éther de pétrole,
- un extrait avec de l'acétate d'éthyle ou un solvant de polarité équivalente,
- un extrait alcoolique avec de l'alcool à 90°.

Après la macération, les extraits sont filtrés, évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide, puis séchés sous vide. Les plantes susceptibles de contenir des alcaloïdes ou des quinones font l'objet d'extractions spécifiques, avec du chloroforme après alcalinisation de la plante par de l'ammoniaque diluée au 1/2 pour extraire les alcaloïdes et avec du chloroforme après acidification de la plante avec de l'acide acétique à 3 % pour les quinones.

Il ne nous a pas été possible de préparer des extraits aqueux faute de lyophilisateur, et également de choisir les solvants que nous désirions à cause d'approvisionnements irréguliers et de la réglementation sur l'usage de certains solvants pouvant servir à la préparation de la cocaïne.

### 2.2.1.3. Essais biologiques *in vitro* sur *Leishmania* ssp avec les extraits végétaux

A 2 mg d'extrait de plante sont ajoutés 40  $\mu\text{l}$  de DMSO; l'ensemble est dissous par agitation (Vortex). A cette préparation est additionnée la quantité nécessaire de milieu (NNN) modifié pour obtenir la concentration désirée. Tous les tests sont effectués à la concentration finale de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  d'extrait de plante.

Si l'extrait est actif à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , nous recherchons la dose minimale qui inhibe complètement les parasites, en préparant des solutions à 50  $\mu\text{g}$ , 25  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , et 1  $\mu\text{g}$ .

### 2.2.1.4. Préparation des parasites

Les parasites sont pris en phase de croissance exponentielle. Le comptage des parasites s'effectue généralement en diluant 10 fois l'inoculum. Un aliquot de la solution contenant les parasites est prélevé puis compté à la cellule de Thoma.

Après ce comptage on ajuste la concentration parasitaire à  $10^6$  parasites par ml à l'aide d'une micropipette, puis on dépose 100  $\mu\text{l}$  de parasites dans chaque puits de la microplaque, soit l'équivalent de 100.000 parasites. Ensuite on ajoute la même quantité de milieu de culture (100  $\mu\text{l}$ ) contenant l'extrait de plante à la concentration de 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Chaque extrait de plante est testée en triplicate sur chaque souche de parasites et à chaque concentration. Dans les puits contenant les parasites seuls, on additionne 100  $\mu\text{l}$  de milieu sans parasite pour arriver à 200  $\mu\text{l}$ . Des puits comprenant des témoins parasites seuls sont également préparés avec le milieu de culture contenant la même quantité de DMSO (40  $\mu\text{l}$ ) ayant servi à dissoudre les extraits de plantes afin de contrôler un éventuel effet du solvant.

Les plaques sont refermées par un couvercle préalablement passé à la flamme afin d'éviter les contaminations, et sont mises à l'étuve à 28° C pendant 48 ou 72 h suivant les nécessités de l'expérimentation. Après ce passage en étuve, les plaques sont ensuite examinées au microscope inversé. Chaque puits est observé en le comparant aux puits témoins culture. Ce test est qualitatif, aucun comptage des parasites n'est effectué.

Les résultats sont exprimés par les symboles suivants:

- +++ Indice de lyse totale des parasites
- ++ Immobilité ou forte diminution de la croissance des parasites
- + Diminution de la mobilité des parasites

0 Parasites dans le même état que les parasites témoins, c'est à dire le même niveau de développement et la même mobilité que les témoins.

Il est arrivé d'observer que quelques rares extraits de plantes favorisaient la croissance des parasites.

Les souches de référence de *Leishmania* utilisées pour les essais biologiques préliminaires sont les suivantes:

- L. braziliensis* Réf:MHOM/BR/75/M2906 et MHOM/BR/75/ M2904
- L. amazonensis* Réf: IFLA/ BR/67/PH8 et MHOM/GF/84/ CAY H-142
- L. chagasi* Réf: MHOM/BR/74/ M2682

Toutes ces souches sont réidentifiées régulièrement à l'IBBA par les techniques électrophorétiques d'isoenzymes afin de dépister les contaminations et les mélanges de souches.

## **2.2.2. Culture et tests biologiques *in vitro* sur plusieurs souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote (Angelo Barrios, 1987)**

### **2.2.2.1. Culture *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote**

La forme épimastigote des différentes souches de *Trypanosoma cruzi* est maintenue en culture *in vitro* par repiquages successifs chaque semaine environ en boîtes de culture "Corning" de 25 ml ou en tubes de culture.

Les parasites sont cultivés en milieu liquide LIT complet (Yager's Liver Infusion Tryptose) à pH 7,2 supplémenté par 1 % de sérum foetal de veau décomplémenté à 56° C pendant 30 minutes (SVF, Biological Industries, Israël) et une solution d'antibiotiques contenant 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine et 250 U ml<sup>-1</sup> de pénicilline.

### **2.2.2.2. Préparation des extraits végétaux**

Les extraits obtenus par macération (voir 2.2.1.2. Préparation des extraits végétaux) sont également utilisés pour les essais biologiques *in vitro* sur les épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2.2.3. Essais biologiques *in vitro* sur *T. cruzi* avec les extraits végétaux

2 mg d'extrait sont pesés et dissous dans 40 µl de DMSO. A cette solution est ajoutée la quantité de milieu nécessaire (LIT) pour arriver à une concentration finale d'extrait de 100 mg.ml<sup>-1</sup>. Ces essais se font dans les mêmes conditions opératoires que les essais *in vitro* sur les stades promastigotes de *Leishmania* ssp en micro-plaques de 96 puits (voir 2.2.1.4. Préparation des parasites).

Après 48 ou 72 heures de contact avec les extraits de plantes nous observons au microscope les changements intervenus. Les appréciations sont notées de la même manière que celles observées avec les *Leishmania* ssp.:

- +++ Lyse totale des parasites
- ++ Parasites immobiles ou modifiés
- + Parasites moins mobiles que les témoins
- 0 Parasites identiques aux témoins ou plus nombreux

Les souches de *Trypanosoma cruzi* employées pour ces essais sont les suivantes:

- Tulahuen (originaire du Brésil)
- Tehuentepec (originaire du Mexique)
- C8 CL 1 (originaire du Brésil)

Toutes ces souches ont toutes été réidentifiées et retypées par les techniques de retypages isoenzymatiques par F. Brénière et M. Tibayrenc à l'IBBA.

Nombre de plantes récoltées et mises en collection	518
Nombre de plantes identifiées botaniquement au niveau de l'espèce	389
Nombre de plantes testées sur les souches de <i>Leishmania</i> ssp.	242
Nombre d'extraits préparés et testés sur les trois espèces de <i>Leishmania</i> ssp. au stade promastigote	environ 1050
Nombre de plantes actives à 100 µg.ml <sup>-1</sup>	57
Pourcentage d'extraits actifs sur au moins une espèce de <i>Leishmania</i> ssp. à 100 µg ml <sup>-1</sup>	24%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> sur <i>Leishmania braziliensis</i>	24%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> ml sur <i>Leishmania amazonensis</i>	24%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> ml sur <i>Leishmania donovani</i>	24%
Nombre de plantes testées sur <i>Trypanosoma cruzi</i>	242
Nombre d'extraits préparés et testés sur les trois souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade épimastigote	environ 1050
Nombre de plantes actives à 100 µg.ml <sup>-1</sup>	47
Pourcentage d'extraits actifs sur au moins une souche de <i>Trypanosoma cruzi</i> . au stade épimastigote à 100 µg ml <sup>-1</sup>	19%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> sur <i>T. cruzi</i> (Tulahuen)	19%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> sur <i>T. cruzi</i> (Tehuentepec)	19%
% d'extraits actifs à 100 µg.ml <sup>-1</sup> sur <i>T. cruzi</i> (C8 CL1)	19%

Tableau N° 2.1  
Bilan global de tous les essais biologiques *in vitro* de criblage sur les extraits bruts de plantes

## 2.3. SELECTION DES PLANTES

### 2.3.1. Résultats sur l'ensemble des récoltes

Environ la moitié des plantes récoltées a fait l'objet de tests biologiques préliminaires de triage (voir tableau N° 2.1.).

24 % des plantes avaient au moins un extrait actif à 100 µg.ml<sup>-1</sup> sur au moins une espèce de *Leishmania* ssp, et 19 % sur au moins une souche de *Trypanosoma cruzi*.

Il apparaît que les *Leishmania* ssp. au stade promastigote seraient légèrement plus sensibles aux extraits de plantes que les *T. cruzi* au stade épimastigote.

Si nous comparons les résultats obtenus sur chaque souche de parasites, nous constatons que la nature de la souche n'influe pas sur l'activité des extraits, ce qui à première vue peut paraître suprenant. Lorsque ces tests ont été mis en place nous attendions un comportement différent de chaque espèce de *Leishmania* ssp, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. donovani* ou de zymodènes de *Trypanosoma cruzi*. A priori ces tests sembleraient marquer plus une cytotoxicité qu'une réelle activité antiparasitaire.

Ces essais ont pour rôle d'orienter les recherches et de donner un point de repère pour les expérimentateurs afin d'obtenir par guidage biologique les produits responsables de l'activité. Ils présentent l'avantage d'être faciles à mettre en place, rapides et simples. Ils ne peuvent en aucun cas prétendre remplacer les tests *in vitro* sur les parasites infectant les cellules hôtes (macrophages ou culture cellulaire) et surtout l'expérimentation animale.

### 2.3.2. Résultats par type d'extraits

Les extraits préparés avec l'acétate d'éthyle et l'éthanol semblent plus actifs sur les trois espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote (voir tableau N°2.2.) et sur les trois souches de *T. cruzi* au stade épimastigote (voir Tableau N°2.3.) que les extraits préparés avec l'éther de pétrole.

Les extraits plus spécifiques, tels que les alcaloïdes totaux (extrait chloroformique alcalin), ou quinones totales (extrait chloroformique acide), malgré leur petit nombre testé sont en général très toxiques pour les parasites. Les deux tiers environ de ces extraits lysent les parasites à 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Type d'extraits	<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania donovani</i>	
	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>
Ethéro-pétrolique	280	19	280	19	280	19
Acétate éthyle	220	24	220	24	220	24
Ethanolique	270	23	270	23	270	23
Alcaloïdes totaux	21	71	21	71	21	67
Quinones totales	6	67	6	67	6	67

Tableau N°2.2

Résultats des essais biologiques *in vitro* par type d'extraits sur trois espèces de *Leishmania* ssp. au stade de promastigotes

Type d'extraits	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tulahuen)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (C8 CL1)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tehuntepec)	
	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>
Ethéro-pétrolique	280	15	280	15	280	15
Acétate éthyle	220	19	220	19	220	20
Ethanolique	270	20	270	20	270	20
Alcaloïdes totaux	21	71	21	71	21	71
Quinones totales	6	67	6	67	6	67

Tableau N°2.3

Résultats des essais biologiques *in vitro* par type d'extraits sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade d'épimastigote



Organe de la plante	Type d'extrait	<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania donovani</i>	
		Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Ecorces du tronc	Ethéro-pétrolique	89	27	89	27	89	27
	Acétate éthyle	66	39	66	39	66	38
	Ethanolique	90	22	90	22	90	22
	Alcaloïdes totaux	11	64	11	64	11	64
	Quinones totales	3	67	3	67	3	67
Ecorces de racines	Ethéro-pétrolique	16	37	16	37	16	37
	Acétate éthyle	7	14	7	14	7	14
	Ethanolique	16	31	16	31	16	31
	Alcaloïdes totaux	12	83	12	75	12	83
Feuilles	Ethéro-pétrolique	95	15	95	15	95	14
	Acétate éthyle	80	15	80	15	80	15
	Ethanolique	95	16	95	16	95	16
	Alcaloïdes totaux	6	67	6	67	6	67
Plante entière	Ethéro-pétrolique	122	16	122	17	122	16
	Acétate éthyle	110	24	110	24	110	24
	Ethanolique	117	15	117	15	117	14

Tableau N° 2.4  
 Résultats des essais biologiques préliminaires *in vitro* sur trois souches de *Leishmania* sp au stade de promastigote, en fonction de l'organe de la plante et du type d'extrait préparé

### 2.3.3. Bilan par organe de plantes

Il ressort des résultats des tests biologiques sur 935 extraits pris en compte dans les tableaux N° 2.4 (essais sur *Leishmania* ssp) et N°2.5 (essais sur *Trypanosoma cruzi*), que les extraits préparés à partir des feuilles sont moins actifs (15 %) que ceux préparés à partir d'écorces de tiges ou de racines (25 % et 30 %).

Les extraits préparés avec la plante entière, en général avec des herbacées ne dépassant pas 30-40 cm de hauteur, ont une activité biologique comparable à celle rencontrée avec les extraits préparés à partir de feuilles.

Organe de la plante	Type d'extrait	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tulahuen)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (C8 CL1)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tehuntepec)	
		Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$	Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$	Nb extraits testés	% actifs à 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$
Ecorces du tronc	Ethéro-pétrolique	89	22	89	22	89	22
	Acétate éthyle	66	36	66	36	66	35
	Ethanolique	90	19	90	19	90	19
	Alcaloïdes totaux	11	64	11	64	11	64
	Quinones totales	3	67	3	67	3	67
Ecorces de racines	Ethéro-pétrolique	16	31	16	31	16	31
	Acétate éthyle	7	14	7	14	7	14
	Ethanolique	16	31	16	31	16	31
	Alcaloïdes totaux	12	83	12	75	12	83
Feuilles	Ethéro-pétrolique	95	12	95	12	95	12
	Acétate éthyle	80	14	80	14	80	14
	Ethanolique	95	15	95	15	95	15
	Alcaloïdes totaux	6	50	6	50	6	50
Plante entière	Ethéro-pétrolique	122	11	122	11	122	11
	Acétate éthyle	110	16	110	16	110	16
	Ethanolique	117	12	117	12	117	12

Tableau N° 2.5

Résultats des essais biologiques préliminaires *in vitro* sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade d'épimastigote, en fonction de l'organe de la plante et du type d'extrait préparé

FAMILLE BOTANIQUE	<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania donovani</i>	
	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>
ANNONACEAE	8	75	8	75	8	75
ASTERACEAE	104	37	104	37	104	36
BERBERIDACEAE	6	67	6	67	6	67
BIGNONIACEAE	3	0	3	0	3	0
CAMPANULACEAE	4	0	4	0	4	0
EUPHORBIACEAE	5	20	5	20	5	20
LABIATAE	7	14	7	14	7	14
LEGUMINOSAE	9	0	9	0	9	0
LOGANIACEAE	4	0	4	0	4	0
MENISPERMACEAE	5	60	5	60	5	60
ONAGRACEAE	3	0	3	0	3	0
ORCHIDACEAE	5	0	5	0	5	0
PIPERACEAE	16	31	16	31	16	31
RUTACEAE	4	50	4	50	4	50
SAPINDACEAE	4	25	4	25	4	25
SOLANACEAE	15	13	15	13	15	13
ULMACEAE	1	100	1	100	1	100

Tableau N° 2.6  
 Résultats des tests préliminaires *in vitro* sur trois espèces de  
*Leishmania* ssp. au stade de promastigote, selon de la famille botanique  
 des plantes récoltées

### 2.3.4. Résultats par familles botaniques

La grande majorité des plantes ont été récoltées sur des critères chimiotaxonomiques (voir Tableaux N° 2.6 et 2.7) ce qui a eu pour effet d'obtenir un pourcentage assez élevé de plantes actives sur les différents parasites. Une quinzaine de plantes ont été collectées grâce à des informations sur l'utilisation en médecine traditionnelle pour traiter les leishmanioses cutanées (voir pages 66 à 68). Quelques plantes ont été ramassées grâce à d'autres indications, antidiarrhéiques, ichtyotoxiques, insecticides, etc...(voir page 71).

La famille, qui a fait l'objet du plus grand nombre de récoltes, est la famille des Astéracées.

30 % des Astéracées récoltées ont au moins un extrait actif à 100 µg.ml<sup>-1</sup> *in vitro* sur *Leishmania* ssp et un peu moins sur *T. cruzi* (27 %). Cette famille est la plus représentée en Bolivie. Selon les botanistes, il y aurait plus de 2.000 taxons de cette famille dans ce pays. Cette forte activité générale des Astéracées pourrait s'expliquer par la présence dans ces plantes de dérivés terpéniques (sesquiterpènes, diterpènes, monoterpènes etc...) connus dans la littérature pour leurs activités biologiques.

Toutes les espèces appartenant à des familles botaniques connues pour renfermer des alcaloïdes (Annonacées, Berbéridacées, Lauracées, Ménispermacées et Rutacées), principalement des dérivés isoquinoléiques, montrent une grande activité biologique sur *Leishmania* ssp et *T. cruzi*.

30 % des Piperacées ont au moins un extrait actif sur les deux parasites. Cette famille botanique est réputée pour renfermer des terpènes, des lignanes, ou des dérivés azotés (amides). Plusieurs Pipéracées sont employées couramment pour traiter les leishmanioses, *Potomorphe peltata* (L.) et *Piper elongatum* Wahl. Pourtant, avec ces deux espèces, aucun extrait s'est montré actif à 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Les Sapindacées, représentées largement par le genre *Serjania*, sont des plantes riches en saponines, utilisées par les Indiens Chimanes comme ichtyotoxiques, elles montrent une activité intéressantes sur les parasites.

Sur les 5 espèces d'Euphorbiacées récoltées, seule l'espèce *Pera benensis* Rusby, préconisée pour guérir les leishmanioses cutanées par les Chimanes, s'est montrée active sur les parasites (voir Chapitre IV de ce travail).

En revanche, sur 15 Solanacées testées, principalement du genre *Solanum*, deux seulement présentent une activité à 100 µg.ml<sup>-1</sup> sur les parasites ce qui semble un peu surprenant.

Ces résultats par famille de plantes confirment que le choix des plantes sur la connaissance de la chimiotaxonomie est un bon critère de sélection.

FAMILLE BOTANIQUE	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tulahuen)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (C8 CL1)		<i>Trypanosoma cruzi</i> (Tehuntepec)	
	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>	Nb extraits testés	% actifs à 100 µg. ml <sup>-1</sup>
ANNONACEAE	8	75	8	75	8	75
ASTERACEAE	104	27	104	27	104	27
BERBERIDACEAE	6	67	6	67	6	67
BIGNONIACEAE	3	0	3	0	3	0
CAMPANULACEAE	4	0	4	0	4	0
EUPHORBIACEAE	5	20	5	20	5	20
LABIATAE	7	14	7	14	7	14
LEGUMINOSAE	9	0	9	0	9	0
LOGANIACEAE	4	0	4	0	4	0
MENISPERMACEAE	5	60	5	60	5	60
ONAGRACEAE	3	0	3	0	3	0
ORCHIDACEAE	5	0	5	0	5	0
PIPERACEAE	16	25	16	25	16	25
RUTACEAE	4	50	4	50	4	50
SAPINDACEAE	4	25	4	25	4	25
SOLANACEAE	15	13	15	13	15	13
ULMACEAE	1	100	1	100	1	100

Tableau N° 2.7

Résultats des tests préliminaires *in vitro* sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade d'épimastigote, selon la famille botanique des plantes récoltées

Abréviations employées dans les tableaux de résultats des essais biologiques préliminaires

A = Aymara

A. E. = extrait acétate d'éthyle

Al. = extrait alcoolique (alcool éthylique)

A.T. = alcaloïdes totaux

C = Chimane

Chl. = extrait chloroformique

Conc  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  = concentration de l'extrait en  $\mu\text{g}$  par millilitre

E = espagnol

E.P. = extrait étheropétrolique

F. = feuilles

Fr. = Fruits

K = Kechua

Lat. = latex

*L. b.* = *Leishmania braziliensis*

*L. m.* = *Leishmania amazonensis*

*L. c.* = *Leishmania chagasi*

N° = numéro de récolte de la plante

Nom vern. = nom vernaculaire

O.P. = Organe de la plante testée

P. E. = plante entière

Qui. = extrait quinonique

R = écorces de racines

T. = écorces de tiges

*T. c.* = *Trypanosoma cruzi*

Teh. = Tehuentepec

Tr. = écorces du tronc

Tula. = Tulahuen

Type ext. = Type d'extrait testé

Ut. = utilisation en médecine traditionnelle

Code d'estimation de l'activité biologique:

+++ = lyse totale des parasites

++ = parasites immobiles, avec lyse partielle

+ = état des parasites différents des témoins

0 = aucune activité

**2.3.5. Résultats des essais biologiques préliminaires *in vitro* sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle comme leishmanicides.**

N°	Nom de la plante	O. P.	Type ext.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L.b.	L.m.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 Cl1	T. c. Teh.	
402	ASTERACEAE <i>Baccharis genistelloides</i> (Lam.) Pers. <u>Nom vern:</u> Charara (K)	P.E.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
761	BIGNONIACEAE <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Martius <u>Nom vern:</u> Arabisco (E)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
846	EUPHORBIACEAE <i>Pera benensis</i> Rusby <u>Nom vern:</u> Apaiñiki (C)	Tr.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	0	0	0	0	0	0	
				Qui.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
			25		+++	+++	+++	+++	+++	+++	
			10		+++	+++	+++	+++	+++	+++	
			5		0	0	0	0	0	0	
			100		+++	+++	+++	+++	+++	+++	
			R.	E.P.	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		10			+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		5			+++	0	0	+++	+++	+++	
		1			0	0	0	0	0	0	
		100			+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		Qui.		50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				5	+++	0	+++	+++	+++	+++	
				1	0	0	0	0	0	0	
				100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		Fr.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
				Qui.	100	0	0	0	0	0	0
Al.	100			0	0	0	0	0	0		
Qui.	E.P.		100	0	0	0	0	0	0		
	100		+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	50		0	0	0	0	0	0			

N°	Nom de la plante	O. P.	Type ext.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L.b.	L.m.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 C11	T. c. Teh.	
851	EUPHORBIACEAE <i>Ura crepitans</i> L. Martius <u>Nom vern:</u> Soliman(C)	Tr.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
		Lat.	Al.	100	0	0	0	0	0	0	0
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	0
696	LEGUMINOSAE- CESALPINIACEAE <i>Acacia</i> sp. <u>Nom vern:</u> Wikamallki (K)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
577	LEGUMINOSAE- PAPILIONACEAE <i>Erythrina</i> sp. <u>Nom vern:</u> Flor de Mayo (E)	Tr.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
581	MORACEAE <i>Ficus</i> sp. <u>Nom vern:</u> Matapalo (E)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
		Lat.	Al.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
349	OXALIDACEAE <i>Oxalis</i> sp. <u>Nom vern:</u> "Sebastian"	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
568	PAPAVERACEAE <i>Bocconia integrifolia</i> H & B <u>Nom vern:</u> Palo amarillo (E)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	25	0	0	0	0	0	0				
555	PAPAVERACEAE <i>Bocconia pearcei</i> Hutch. <u>Nom vern:</u> Amakari (K)	T.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	+++	+++	+++	++	++	++	
				5	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
			F.	A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					25	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	0		0	0	0	0	0			



N°	Nom de la plante	O. P.	Type Ext.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L. b.	L. a.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 Cl1	T. c. Teh.	
570	PIPEARECAE <i>Piper elongatum</i> Wahl <u>Nom vern:</u> Matico macho (E)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
583	PIPERACEAE <i>Potomorphe peltata</i> (L.) Miqu. <u>Nom vern:</u> Sipu-sipu (K)	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
850	RUTACEAE <i>Galipea longiflora</i> Kr. <u>Nom vern:</u> Evanta (C)	F.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	0	0	0	
				25	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
				Al.	100	++	++	++	++	++	++
				50	0	0	0	0	0	0	
			T.	E.P.	100	++	++	++	++	++	++
					50	0	0	0	0	0	0
		A.T.		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
		R.		50	0	0	0	0	0	0	
				Al.	100	0	0	0	0	0	
			E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
					50	+++	+++	+++	+++	+++	
					25	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
					50	0	0	0	0	0	
					Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++
Fr.			50	0	0	0	0	0			
	E.P.	100	0	0	0	0	0				
	A.T.	100	0	0	0	0	0				
Al.		100	0	0	0	0	0				
		50	0	0	0	0	0				
		Al.	100	0	0	0	0				
884	ULMACEAE <i>Ampelocera edentula</i> Kuhl. <u>Nom vern:</u> Sou'sou (C)	Tr.	E.P.	100	0	0	0	0	0		
			A.E.	100	0	0	0	0	0		
			Chl.	100	0	0	0	0	0		
			Qui.	100	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	+++	+++	+++	+++	+++		
				25	0	0	0	0	0		
				Al.	100	0	0	0	0		

### Commentaires:

Quatorze plantes nous ont été indiquées comme moyens thérapeutiques pour traiter les leishmanioses cutanées provoquées par *Leishmania braziliensis*.

Toutes ces plantes possèdent une caractéristique commune, elles provoquent, une fois appliquée localement sur la lésion, une sensation plus ou moins forte de brûlure ou plus exactement de chaleur.

Onze de ces plantes résultent d'informations collectées auprès des colons des Yungas et de l'Alto-Beni d'origine Kechua ou Aymara installés dans ces zones tropicales. Huit de ces plantes ne reconfirment pas leur activité biologique *in vitro* sur *Leishmania* ssp.

Parmi ces plantes, deux espèces du genre *Bocconia* (Papaveraceae), *Bocconia integrifolia* H & B et *Bocconia pearcei* Hutch. (espèces très proches souvent confondues par les utilisateurs locaux) conduisent à des extraits actifs sur les parasites. Ces Papavéracées ont déjà fait l'objet d'une étude phytochimique (Maccio, 1946; Manske, 1953; Oechslin et al., 1991). Elles contiennent des alcaloïdes de type benzophénanthridine, essentiellement de la sanguinarine et ses dérivés ainsi que de la chélérythrine et ses dérivés ( Krane et al., 1984). Le latex de *Bocconia pearcei* est jaune foncé, d'où le nom de "palo-amarillo" en espagnol qui signifie bois jaune. Cette coloration est probablement due à la forte teneur en sanguinarine dans cette plante.

Le fait de ne pas avoir rencontré une activité sur les différentes espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup> avec les extraits de neuf autres plantes ne signifie pas forcément que celles-ci ne sont pas efficaces pour traiter les leishmanioses. C'est l'inconvénient majeur et les limites du test avec les promastigotes qui peut éliminer des médicaments type "Glucantime" inactifs sur le stade promastigote, mais actifs sur la forme intracellulaire du parasites et celle rencontrée chez le malade, le stade amastigote.

Trois des quatre plantes indiquées par nos informateurs Chimanes sont actives, à l'exception de *Ura crepitans* L., une Euphorbiacée connue dans le monde tropicale par sa résine capable de provoquer au contact de la peau des brûlures d'une extrême gravité. La résine de cet arbre, qui peut atteindre plus d'un mètre de diamètre, est employée pour pêcher.

Les trois autres plantes, *Pera benensis* Rusby (Euphorbiaceae), *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae) et *Ampelocera edentula* Kuhl. (Ulmaceae), confirment leur activité *in vitro* au laboratoire sur les trois espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigotes, ainsi que sur les trois souches de *T. cruzi* au stade d'épimastigote.

Le choix de ces plantes par les Chimanes n'est probablement pas le fruit du hasard, mais sans doute le résultat de nombreux essais empiriques de l'application sur les plaies d'espundia de toutes sortes d'écorces, de résines, de feuilles qu'ils peuvent rencontrer dans la forêt amazonienne.

La composition chimique et la confirmation de l'activité biologique antiparasitaire des principes actifs de ces trois plantes seront décrites dans les chapitres III, IV et V.

2.3.6. Tests biologiques préliminaires *in vitro* avec des plantes récoltées sur des informations ethnopharmacologiques diverses (insecticides, ichtyotoxiques, répulsifs, anti-diarrhéiques, anti-amibiens etc...)

N°	Nom de la plante	O. P.	Type ext.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L. b.	L. a.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 CL1	T. c. Teh.	
792	ANNONACEAE	R.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
	<i>Guatteria</i> sp		A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	<u>Nom vern:</u>	Tr.	E.P.	50	0	0	0	0	0	0	
	Sayakasi (C)		A.T.	100	0	0	0	0	0	0	
481	ANNONACEAE	Tr.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	<i>Oxandra espiantana</i>		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	(Spruce) Baillon		50	+++	+++	+++	0	0	0		
	<u>Nom vern:</u>		25	+++	+++	+++	0	0	0		
584	BERBERIDACEAE	T.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
	<i>Berberis paucidentata</i>		A.T.	100	+++	+++	+++	++	++	++	
	Rusby.	T.	E.P.	50	+++	+++	+++	0	0	0	
	<u>Nom vern:</u>		25	0	++	+++	0	0	0		
	Charoli (K)	R.	E.P.	10	0	0	0	0	0	0	
	Ut: anti-diarrhéique		Al.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
			E.P.	50	++	+++	+++	0	0	0	
786	LAURACEAE	T.	E.P.	25	0	0	0	0	0	0	
	<i>Aniba canellila</i> H.B.K.		100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	<u>Nom vern:</u>	R.	A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	Canelon (E)		E.P.	50	0	0	0	0	0	0	
	Ut: anti-diarrhéique	F.	Al.	100	0	0	0	0	0	0	
			E.P.	100	+++	0	+++	+++	+++	+++	
743	PIPERACEAE	P.E.	Chl.	50	0	0	0	0	0	0	
	<i>Peperomia</i> sp.		E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	<u>Nom vern:</u>		A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	Congona del monte (E)		E.P.	50	0	0	0	0	0	0	
780	Ut: insecticide	T.	Al.	100	0	0	0	0	0	0	
	SAPINDACEAE		E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	<i>Serjania tenuifolia</i>		50	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Radlk.		25	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	<u>Nom vern:</u>		10	0	0	0	0	0	0		
	Wasi (C)		A.E.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Ut: ichtyotoxique			50	0	0	+++	0	0	0	
			Al.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	0	0	+++	+++	+++	+++	
	10	0		0	0	0	0	0			
		F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
			E.P.	50	0	0	0	0	0		

### Commentaires:

Toutes ces plantes fournissent au moins un extrait actif à 100 µg.ml<sup>-1</sup> sur les trois espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote et *T. cruzi* au stade épimastigote.

Quatre plantes ont été indiquées par les colons de l'Alto-Beni et des Yungas, *Guatteria* sp., *Oxandra espintana* (Spruce) Baillon (Annonaceae), *Berberis paucidentata* (Lechler) (Berberidaceae) et *Peperomia* sp. (Piperaceae) et deux par les Indiens Chimanes, *Aniba canellila* H.B.K. (Lauraceae) et *Serjania tenuifolia* Radlk. (Sapindaceae).

Quatre d'entre elles renferment des alcaloïdes, *Guatteria* sp., *Oxandra espintana* (Spruce) Baillon, *Berberis paucidentata* Rusby (Weber et al., 1989) et *Aniba canellila* H.B.K (Oger et al., 1991).

A partir des écorces du tronc de *Oxandra espintana* (Annonaceae) a été isolé un monoterpène aromatique original particulièrement actif *in vitro* sur de nombreuses espèces de *Leishmania* au stade promastigote et de souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote, l'espintanol. Ce monoterpène a également été synthétisé (Hocquemiller et al., 1991).

Cette activité *in vitro* n'a pas été confirmée sur le modèle animal, souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* et traitées par l'espintanol. Dans les mêmes conditions des souris Balb/c infectées par des trypomastigotes de la souche Tehuentepec de *T. cruzi* et traitées par l'espintanol ont toutes succombées 20 jours après l'infection parasitaire (Fournet et al., résultats non publiés).

Des racines et des tiges de *Berberis boliviana* Rusby (Weber et al., 1989) ont été isolés des alcaloïdes de type bisbenzyltétrahydroisoquinoléine. Plusieurs de ceux-ci se sont montrés actifs *in vitro* sur les formes de culture de plusieurs souches de *Leishmania* et de *Trypanosoma cruzi* (Fournet et al., 1988a; Fournet et al., 1988b).

*Aniba canellila* H.B.K, appelé par les Chimanes et les populations du Beni "canelon", possède une odeur qui rappelle beaucoup celle de la cannelle. Les écorces du tronc de cet arbre pouvant atteindre un mètre de diamètre sont mâchonnées par les enfants Chimanes comme un bonbon. Les écorces en poudre servent à parfumer le chocolat fabriqué localement par les paysans. L'infusion des écorces du tronc arrêterait les diarrhées. Le bois de cet arbre est

très apprécié par les Indiens Chimanes pour construire leur pirogues creusées directement dans la masse, car il est imputrescible et résiste à toutes les attaques des parasites du bois. Des alcaloïdes de type benzyloquinoléine ont été isolés des écorces du tronc et ensuite synthétisés (Oger et al., 1991). Un test *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) et traitées avec un extrait chloroformique total n'a pas confirmé l'activité rencontrée *in vitro* (Fournet et al., résultats non publiés).

*Serjania tenuifolia* Radlk, une Sapindacée lianescente très riche en saponines, est utilisée par les Indiens Chimanes pour pêcher dans les mares.

Aucune étude chimique approfondie ni confirmation de l'activité biologique sur d'autres modèles n'a été effectuée avec des extraits de *Serjania tenuifolia* Radkl et de *Peperomia* sp (Piperaceae).

### 2.3.7. Résultats d'essais préliminaires biologiques *in vitro* sur quelques plantes récoltées sur des critères chimiotaxonomiques

N°	Nom de la plante	O. P.	Type extr.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L. b.	L. a.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 C11	T. c. Teh.			
775	ANNONACEAE <i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schld.	F.	A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
				50	0	0	0	0	0	0			
			T.	A.T.	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				25	0	0	0	0	0	0			
879	ANNONACEAE <i>Unonopsis buchtienii</i> R.E. Fries	R.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
				50	0	0	0	0	0	0			
				A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				25	0	0	0	0	0	0	0		
779	ANNONACEAE <i>Xylopi aromatic</i> (Lam.) Mart.	T.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
				50	0	0	0	0	0	0			
				A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
						50	0	0	0	0	0		
		R.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	0	0	0	0	0	0			
				A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				25	0	0	0	0	0	0			
612	ASTERACEAE <i>Gnaphalium graveolens</i> H.B.K. <u>Nom vern:</u> wira-wira (K)	F.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
				50	0	0	0	0	0	0			
				A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
						50	0	0	0	0	0		
		A.I.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				25	0	0	0	0	0	0			
			616	ASTERACEAE <i>Munnozia fournetii</i> H. Robinson	T	E.P.	100	0	0	0	0	0	0
							A.E.	100	+	+	+	0	0
	A.I.					100	++	++	0	0	0	0	
F.	E.P.	100			0	0	0	0	0	0			
		A.E.			100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
		50			+++	+++	+++	+++	+++	+++			
		25			+	0	0	0	0	0			
		A.I.			100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
		50			+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	25	+++	+	0	0	0	0						
	10	+	0	0	0	0	0						
434	ASTERACEAE <i>Munnozia maronii</i> (André) H. Robinson	F.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
					50	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
					25	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				10	0	+++	0	0	0	0			
				5	0	0	0	0	0	0			
				A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
				50	0	0	0	0	0	0			

N°	Nom de la plante	O.P.	Type ext.	Conc µg. ml <sup>-1</sup>	L. b.	L. a.	L. c.	T. c. Tula	T. c. C8 C11	T. c. Teh.	
562	ASTERACEAE <i>Perezia multiflora</i> (H.B.K.) Less <u>Nom vern:</u> Sutuma (K)	P.E.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	0	0	0	
				25	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0		
787	MENISPERMACEAE <i>Abuta rufescens</i> Aublet. <u>Nom vern:</u> Kayaya (C)	R.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	0	0	0	0	0	0	
				Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
				50	0	0	0	0	0		
878	MENISPERMACEAE <i>Anomospermum bolivianum</i> Kruk. & Mold.	R.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.T.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0	0	
615	PIPERACEAE <i>Peperomia galioides</i> H.B.K.	P.E.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	++	++	+++	0	0	0	
				5	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				10	0	0	0	0	0	0	
				Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
				50	0	0	0	0	0		
747	PIPERACEAE <i>Peperomia</i> sp.	P.E.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0		
580	PIPERACEAE <i>Piper bolivianum</i> C.D.C.	F.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
				A.E.	100	0	0	0	0	0	0
				Al.	100	0	0	0	0	0	0
		T.	E.P.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
				A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
				50	0	0	0	0	0	0	
			Al.	100	0	0	0	0	0		
691	RANUNCULACEAE <i>Clematis cericea</i> H.B.K.	P.E.	E.P.	100	0	0	0	0	0	0	
			A.E.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
				50	0	0	0	0	0	0	
				Al.	100	+++	+++	+++	+++	+++	+++
				50	0	0	0	0	0	0	



### Commentaires:

Ces treize plantes choisies parmi deux cents plantes récoltées sur des critères chimiotaxonomiques ont toutes au moins un extrait actif *in vitro* sur les trois espèces au stade promastigote, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. chagasi* et sur les trois souches de *T. cruzi* au stade épimastigote, Tulahuén, C8CL1 et Tehuentepec à 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Parmi ces plantes choisies, quelques unes d'entre elles renferment des alcaloïdes:

- les Annonacées, *Cardiopetalum calophyllum* Schdl. (Séguineau et al., 1991), *Unonopsis buchtienii* R. E. Fries (en cours d'étude), *Xylopia aromatica* (Moraes et Roque, 1988),

- les Ménispermacées, *Abuta rufescens* (Cava et al., 1972) et *Anomospermum bolivianum* Kruk. & Mold (en cours d'étude).

D'autres plantes sont très riches en dérivés terpéniques:

- les Astéracées *Munnozia maronii* André (Bohlmann et Grenz, 1979), *Munnozia fournetii* H. Robinson (esp. Nov.), *Perezia multiflora* (H. B. K.) Less (Zdero et al., 1988),

- les Pipéracées, *Peperomia galioides* H. B. K. (Angelo Barrios, 1987).

A partir de l'extrait éthéropétrolique de la Composée *Munnozia maronii*, a été isolé par guidage biologique un produit actif *in vitro* sur un grand nombre d'espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote et de souches de *T. cruzi* au stade épimastigote (Muñoz et Fournet, 1988) à une concentration inférieure à 1 µg.ml<sup>-1</sup>. Ce composé chimique a été identifié à un sesquiterpène lactone, la déhydrozaluzine C. Ce sesquiterpène lactone n'a malheureusement pas confirmé son activité leishmanicide sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* et traitées par la déhydrozaluzine C (Fournet et al., 1992b).

Le mode de récoltes des plantes, d'après nos connaissances chimiotaxonomiques, suppose de la part du récolteur qu'il soit capable de reconnaître sur le terrain les familles botaniques et les genres susceptibles de l'intéresser. Ce savoir s'acquiert après une expérience non négligeable de ce type de travail de terrain en milieu tropical et aussi dans des biotopes qu'il n'a pas l'habitude de rencontrer (montagnes, vallées interandines, forêts de brouillard).

Ces récoltes contribuent également à mieux connaître la flore bolivienne, encore méconnue par les spécialistes. Cette flore très riche serait estimée par les botanistes entre 15 000 et 20 000 taxons. Nos modestes récoltes (plus de 400 plantes différentes) apportent une infime contribution à la floristique de ce pays.

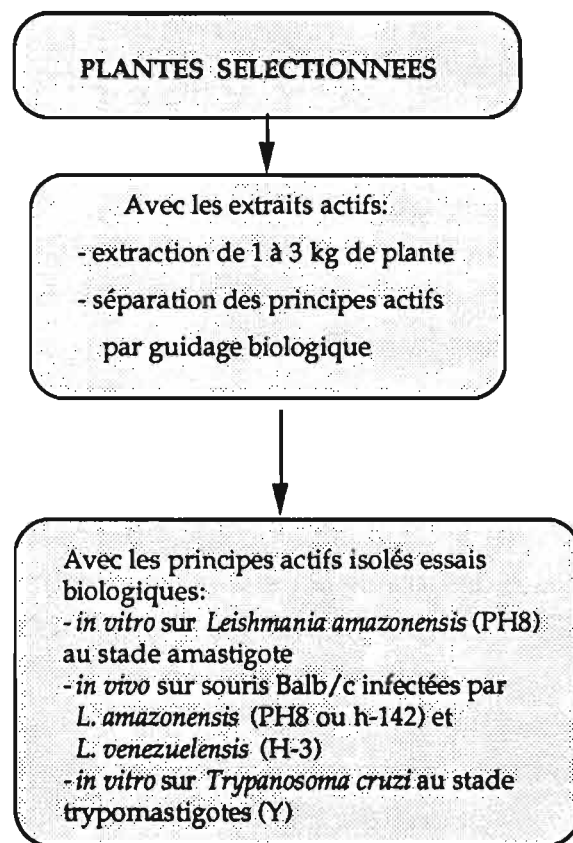


Schéma N° 2.3  
Méthodologie d'extraction, d'isolement des principes actifs et  
essais biologiques sur les produits purs

## 2.4. ESSAIS BIOLOGIQUES SUR LES PRODUITS ISOLES

### 2.4.1. Méthodes chimiques d'extraction, d'isolement et d'identification des principes actifs

Suite au triage biologique préliminaire *in vitro* des extraits totaux des échantillons végétaux récoltés, les plantes jugées biologiquement intéressantes font l'objet d'une étude approfondie (voir schéma N° 2.3). Cette étude comprend l'extraction de 1 à 3 kg de matériel végétal et l'isolement des principes actifs responsables de l'activité anti-parasitaire par guidage biologique. Les plantes réputées leishmanicides en médecine traditionnelle sont étudiées en priorité; ensuite celles utilisées traditionnellement pour traiter d'autres pathologies, et enfin celles susceptibles de contenir des principes actifs connus ou semblables à ceux déjà décrits dans la littérature pour leurs activités biologiques.

1 à 3 kg d'organe de chaque plante sélectionnée sont extraits par le même solvant organique employé lors des essais biologiques préliminaires ou bien par un solvant de même polarité.

L'extrait organique obtenu est évaporé, séché, pesé, puis testé sur les parasites en milieu de culture à la concentration d'activité trouvée lors des essais biologiques préliminaires. Il est ensuite fractionné afin d'en isoler les composés actifs.

Plusieurs méthodes chromatographiques ont été employées pour cette séparation:

- la chromatographie sous vide sur Büchner pour les extraits totaux (Coll et Bowden, 1986; Pelletier et al., 1986),
- la chromatographie sur colonne de silice H Merck, avec ou sans pression,
- les colonnes de résine de Séphadex LH 20 (pour molécules de faibles poids moléculaires),
- la flash chromatographie pour les dernières purifications (Still et al., 1978).

Chaque fraction isolée est testée biologiquement *in vitro* sur trois espèces de *Leishmania* au stade promastigote, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, et *L. donovani chagasi* et sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote, Tulahuen, C8CL1, et Tehuentepec de la même manière qu'au cours des essais biologiques préliminaires (voir chapitre 2.2., essais biologiques préliminaires).

Toutes les fractions actives sont conservées, puis à nouveau traitées

jusqu'à la séparation des molécules responsables de l'activité. Il arrive qu'au cours du traitement des extraits, des produits non actifs cristallisent; ces produits sont mis de côté pour identification chimique.

Les structures chimiques des produits isolés à La Paz ont été déterminées après, au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Châtenay-Malabry grâce aux données physicochimiques des différents composés, notamment l'analyse spectrale de RMN du proton ou du carbone 13, des spectres de masse, ultraviolet et infrarouge. Ces données peuvent être complétées par la mesure des points de fusion lorsque les produits sont cristallisés.

#### **2.4.2. Protocoles expérimentaux des essais biologiques sur les produits purifiés**

Avec chaque produit actif purifié, dans la mesure où les quantités recueillies de ce produit sont suffisantes (minimum 400 à 500 mg), nous effectuons les tests biologiques suivants:

- Essais *in vitro* sur le stade intracellulaire ou amastigote de *Leishmania amazonensis* (PH8) par la méthode d'infection de macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c.

- Essais *in vivo* sur souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (souche PH8 ou et H-142) et par *L. venezuelensis* (H-3). Avant d'effectuer les essais sur les souris Balb/c, la toxicité du produit à tester est évaluée par la détermination de la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>).

Au cours des expérimentations, plusieurs voies d'inoculation du produit sont essayées, par voie générale, sous cutanée au niveau dorsal et localement à l'endroit de l'infection parasitaire, sur le coussinet plantaire de la patte arrière.

Avant de procéder à ces essais avec les principes actifs, il a fallu déterminer la quantité de parasites à inoculer en injectant différentes concentrations d'amastigotes de *L. amazonensis* (PH8) et de *L. venezuelensis* (H-3). Cette concentration varie en fonction de la virulence de la souche. Avec une souche peu virulente, la croissance des granulomes est trop faible pour observer un effet thérapeutique; avec un souche trop virulente les souris succombent avant la fin de l'expérimentation. Le médicament de référence employé est l'antimoniote de N-méthyl glucamine ou Glucantime<sup>R</sup>.

Outre les essais sur *Leishmania* prioritaires dans ce travail, il a été procédé à des tests biologiques sur *Trypanosoma cruzi*, notamment sur la forme circulante du parasite, les trypomastigotes. Ces essais réalisés à Asunción,

Paraguay à l'IICS (Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud) viennent en complément de nos tests sur la forme épimastigotes de *T. cruzi* effectués en routine à l'IBBA.

Deux expérimentations sur des souris Balb/c infectées par *Trypanosoma cruzi* ont été réalisées chez le Pr. Y. CARLIER au laboratoire de parasitologie de l'Université Libre de Bruxelles, sur l'alcaloïde majoritaire de *Galipea longiflora*, la 2-phényl-quinoléine et la naphthoquinone majoritaire *Pera benensis* Rusby, la plumbagone.

Les essais biologiques avec les formes circulantes ou infectantes de *T. cruzi* n'ont pas pu être mis en place à l'IBBA, faute de l'infrastructure de sécurité nécessaire à de tels essais et aussi par l'inexpérience de notre part, pouvant conduire à des erreurs de manipulation dangereuses pour les expérimentateurs.

### **2.4.3. Essais biologiques *in vitro* sur les amastigotes de *Leishmania amazonensis* infectant les macrophages de souris Balb/c (Torrès Guerrin, 1986)**

#### **2.4.3.1. Maintien des parasites**

Les formes amastigotes de *L. amazonensis* ont été obtenues par inoculation sous cutanée de promastigotes des souches IFLA/BR/67/PH8 ou MHOM/GF/84/CAY H-142 au niveau de la face dorsale des pattes arrières de hamsters (Charles Rivers, USA) pesant 120-130 grammes. Les granulomes apparaissent en 8 à 12 semaines suivant la virulence de la souche.

Pour les protocoles suivants, les hamsters sont infectés par les stades amastigotes récupérés dans les granulomes. Par cette méthode, les granulomes se développent plus rapidement.

#### **2.4.3.2. Récolte des macrophages**

Les souris mâles ou femelles adultes de race Balb/c (race de souris très sensible aux *Leishmania* ssp et à *Trypanosoma cruzi*) pèsent entre 18 et 22 grammes. Elles subissent une diète hydrique de 12 heures afin de réduire le volume abdominal et diminuer ainsi les risques de lésion intestinale au moment de l'injection intrapéritonéale. Par ce jeun, nous évitons les risques de contamination fécale du matériel cellulaire à collecter. Les animaux sont asphyxiés aux vapeurs de chloroforme. La peau de la région périombilicale est incisée en prenant soin de la décoller du plan musculaire. Dans la région sous

ombilicale on injecte ensuite rapidement, 8 à 10 ml de PBS "Phosphate Buffer Solution" froid hépariné (48 U d'héparine pour 10 ml de PBS). L'héparine, l'absence de calcium et de magnésium dans le milieu, et son maintien à basse température (4° C) inhibent l'adhésion des macrophages péritonéaux aux supports pendant les manipulations de récolte.

Le liquide d'ascite est immédiatement récupéré par ponction lente au niveau d'un flanc, l'aiguille étant maintenue écartée des anses intestinales afin d'éviter le colmatage de la seringue. 7 à 8 ml sont ainsi obtenus pour chaque souris. Pendant que l'on répète le protocole avec d'autres souris, le liquide d'ascite est stocké à 4° C dans un tube plastique destiné à la centrifugation.

Les liquides péritonéaux sont réunis et centrifugés à 900 t.mn<sup>-1</sup> à 4° C pendant 10 mn. Le surnageant est prélevé et jeté, les cellules remises en suspension dans le PBS hépariné et de nouveau centrifugées dans les mêmes conditions. L'opération est renouvelée deux fois. On additionne au dernier culot 5 ml de milieu de culture, MEM (Minimum Essential Medium) avec 10 % de SVF (Sérum Foetal de Veau), 2 % de L. glutamine, et 1 % d'antibiotiques (10 mg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine et 1000 U.I.ml<sup>-1</sup> de pénicilline). La solution est homogénéisée.

Les éléments cellulaires sont comptés à la cellule de Thoma, puis la concentration ajustée afin d'obtenir 2 x 10<sup>6</sup> cellules par ml. Avec chaque souris on obtient environ 10<sup>6</sup> cellules. Les cellules sont réparties dans une boîte "Costar" à 24 puits contenant 24 lamelles stériles, à raison de 100 µl par lamelle soit 10<sup>5</sup> cellules par puits. La boîte est ensuite mise sous une cloche contenant un mélange gazeux spécial pour compenser les effets de l'altitude à La Paz (3500 m) où la pression partielle d'oxygène est plus faible qu'au niveau de la mer. Cette solution a été adoptée après plus de deux ans de recherche et d'essais infructueux de culture des macrophages. Après 2 à 3 h sous cette cloche à 37° C, les cellules ayant adhérées ("plating"), la solution est éliminée à la pipette Pasteur et remplacée par du milieu nutritif (MEM) complet à raison de 1 ml par cupule.

#### **2.4.3.3. Préparation des parasites et infection**

Pour obtenir des amastigotes, nous choisissons un hamster présentant un granulome non ulcéré, de taille suffisante. L'animal est tué au chloroforme. La patte arrière infectée par les parasites est nettoyée à l'alcool iodé puis à l'éthanol à 70° C. A l'aide d'une pince et d'un bistouri stériles, le granulome est réséqué, le clivage se fait plus facilement si la lésion est importante. Le granulome est alors

haché au dessus d'un mortier contenant du sable stérile et 5 ml de chlorure de sodium à 0,9 %. Le tout est homogénéisé au pilon et la suspension est recueillie à la pipette et centrifugée à  $2000 \text{ t.mn}^{-1}$  pendant 10mn à  $4^{\circ} \text{ C}$ . Nous obtenons trois couches; le surnageant contenant les débris de parasites et de cellules, le fond avec le sable et les gros débris du granulome, et la couche intermédiaire composée de parasites et de globules rouges. Cette couche est prélevée et mise dans un tube, rincée au chlorure de sodium à 0,9 % et centrifugée à nouveau pour séparer les globules rouges des parasites.

Les parasites sont repris dans un milieu nutritif MEM (Minimum Essential Medium) avec 10 % de SVF, 2 % de L. glutamine et 1 % d'antibiotiques. Ils sont dilués et comptés à la cellule de Thoma. Un granulome permet d'obtenir environ  $10^8$  parasites. La concentration est ajustée à  $10^6$  parasites par ml. Les parasites ainsi obtenus servent non seulement à l'infection *in vitro* des macrophages, mais aussi à infecter d'autres hamsters qui serviront de réservoirs de parasites pour de nouvelles expérimentations et également à infecter les souris Balb/c qui servent à réaliser les essais biologiques *in vivo* des produits isolés à partir des plantes. Cette technique d'isolement des parasites est la même pour toutes les espèces de *Leishmania* utilisées pour ce travail, *L. amazonensis* (PH8 et H-142) et de *L. venezuelensis* (Bonfante-Garrido, 1983).

L'infection des macrophages *in vitro* se fait en remplaçant le milieu nutritif par la suspension de parasites, à raison d'un millilitre par lamelle soit  $10^6$  parasites, ce qui donnerait la proportion théorique de 5 parasites pour une cellule. En réalité, compte tenu du pourcentage de macrophages dans les cellules récoltées, nous aboutissons à un chiffre de 10 parasites par macrophage. Les boîtes sont stockées sous une cloche à  $37^{\circ} \text{ C}$  avec le mélange gazeux spécial pendant 2 heures, temps suffisant pour obtenir l'infection des macrophages. Ensuite le milieu qui contenait les parasites est alors éliminé et remplacé par du milieu neuf.

#### **2.4.3.4. Test d'activité sur les amastigotes intracellulaires**

Après l'infection des macrophages, les cellules sont mises dans un milieu nutritif (MEM avec 10 % de SVF, 2 % de L. glutamine, 1 % d'antibiotiques) qui contient les extraits dissouts à  $100 \mu\text{g}$ ,  $50 \mu\text{g}$ ,  $25 \mu\text{g}$  et  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Trois cupules sont préparées pour chaque concentration. Trois lamelles de cellules infectées non traitées serviront de témoin. Les boîtes sont remises à incuber en étuve pendant 48 heures. Ensuite les lamelles sont fixées et colorées, après rinçage au PBS.

#### 2.4.3.5. Fixation et coloration des préparations

Les préparations sont fixées par une solution de Zencker (eau distillée 100 ml, chlorure mercurique 5 g, bichromate de potassium 2,5 g et sulfate de sodium 1 g) supplémentée par 4 % d'acide acétique pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Le mordantage est effectué par la solution de Lugol (eau distillée 50 ml, iode sublimée 2 g, iodure de potassium 4 g) pendant 5 minutes et suivi d'un nouveau rinçage au thiosulfate de sodium à 10 %.

Les lamelles sont ensuite colorées au Giemsa R (réactifs RAL) au 1/10, pendant 15 minutes, rincées à l'eau courante et séchées.

Pour le montage les lamelles sont collées sur une lame avec une goutte de fixateur de Gurr (High Wycombe Bucks, U.K.).

#### 2.4.3.6. Lecture

La lecture des lamelles colorées se fait à l'immersion (grossissement 100 x). Pour chaque lamelle dix champs sont examinés. Le nombre de macrophages et le nombre de parasites intra cellulaires sont notés pour chaque champ. La moyenne des dix champs, puis la moyenne des triplicates est calculée. Nous en déduisons, pour chaque concentration testée et pour les témoins, le nombre moyen de parasites par cellule, et l'indice de survie (Berman et Lee, 1984) des parasites qui est calculé de la façon suivante:

$$I.S. = \frac{\text{nombre de parasites dans 100 cellules traitées}}{\text{nombre de parasites dans 100 cellules témoins}} \times 100$$

Il y a une vingtaine de cellules par champ, on examine donc environ deux cents cellules par lamelle, soit six cents cellules pour chaque concentration testée.

#### 2.4.3.7. Tests de viabilité cellulaire

Pour pouvoir avoir une idée de la toxicité des extraits testés, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire sur des macrophages non infectés par les parasites. Les cellules sont mises au contact des produits à tester à plusieurs concentrations (100 µg - 50 µg - 25 µg - 10 µg - 1.µg ml<sup>-1</sup>) pendant 48 heures. Les tests sont effectués en triplicate pour chaque concentration testée, de même que trois lamelles témoins.

Au moment de la lecture le milieu contenant les extraits est remplacé par une solution de bleu Trypan "Sigma" à 0,4 %. Après une minute de contact, les lamelles sont sorties des cupules, retournées sur une lame et examinées au



microscope. Le cytoplasme des cellules mortes se colore en bleu, ce qui permet de les différencier des cellules viables qui ne prennent pas le colorant. Le pourcentage de survie des macrophages est alors calculé par rapport au témoin.

**2.4.4. Essais *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par des amastigotes de *Leishmania amazonensis* ou de *L. venezuelensis* (Brener, 1960; Coleman et al., 1988; Neal, 1976; Peters et al., 1980a; Peters et al., 1980b)**

**2.4.4.1. Mesure de la toxicité des produits (DL<sub>50</sub>)(Woodard, 1965)**

Avant d'effectuer les essais sur les souris avec les produits isolés à partir des plantes, il est indispensable de connaître le degré de toxicité des produits isolés.

La méthode choisie est la mesure de la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) à dose unique. La DL<sub>50</sub> correspond à la dose théorique capable de tuer dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience pour une espèce animale donnée. Cette évaluation est fondée sur l'évaluation de réponse tout ou rien: mort ou survie des animaux. La courbe représentative de la mortalité en fonction du logarithme des doses étant supposée être une droite entre les deux doses qui encadrent la DL<sub>50</sub>, celle-ci est calculée par interpolation comme suit.

$$\log DL_{50} = \log B + \frac{0,5 - N}{M - N} \log g$$

B= dose immédiatement inférieure à la DL<sub>50</sub>

N= mortalité provoquée par la dose B (pourcentage exprimé en fraction décimale par rapport à 1)

M= mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL 50 (pourcentage exprimé en fraction décimale de 1)

g : raison de la progression

Pour nos essais de mesure de toxicité, les conditions opératoires suivantes ont été choisies:

- animal d'expérimentation: les souris Balb/c.
- nombre d'animaux par concentration de produit: 6 souris de même sexe et de même poids et de même âge.
- doses d'expérimentation en mg.kg<sup>-1</sup>: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 (raison de la

progression 2). Pour des raisons d'ordre pratique, manque de produit ou économie des produits, il n'a pas été possible d'effectuer des essais à 800 ou 1600 mg lorsque tous les animaux avaient survécu à la dose de 400 mg.kg<sup>-1</sup>.

- voie d'inoculation des produits: intrapéritonéale
- calcul de la DL<sub>50</sub> à temps 0, après 24 h, 48 h, et 72 h.

En fonction de la DL<sub>50</sub> obtenue à 72 h, nous avons employé arbitrairement pour les traitements la dose DL<sub>50</sub>/4, parfois cette dose a été diminuée pour éviter tout problème de toxicité lorsque l'écart entre la dose thérapeutique et la dose toxique était trop étroit, par exemple dans le cas de la plumbagone (voir Chapitre IV).

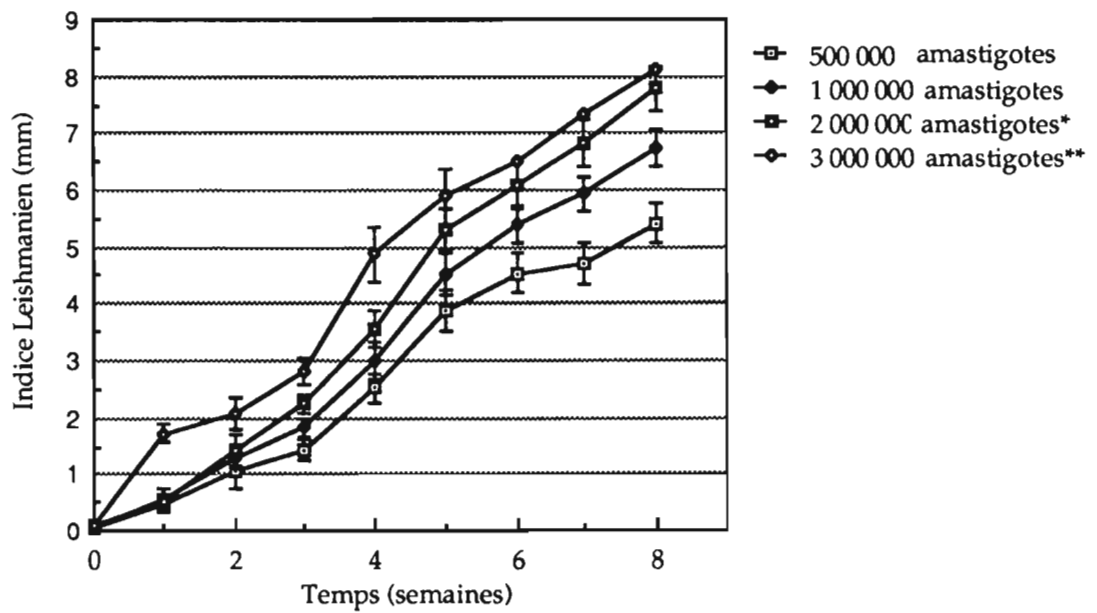
#### 2.4.4.2. Protocole expérimental

Chaque groupe expérimental comprend 10 souris Balb/c de même sexe, de même poids et de même âge. Pour chaque expérimentation, plusieurs lots expérimentaux sont constitués:

- un lot témoin parasite (Tém.),
- un lot témoin parasite qui reçoit pendant la durée du traitement une solution de PBS (Tém.+ PBS), le milieu qui contient les parasites. Au cours des différents protocoles nous n'avons pas observé un effet de la solution de PBS.
- un lot de souris reçoit comme traitement le médicament de référence l'antimoniote de N-méthyl glucamine ou Glucantime<sup>R</sup> commercialisé par Specia France à raison de 200 mg.kg<sup>-1</sup>. Cette dose a été choisie en fonction des données de la bibliographie (Brener, 1960; Brener, 1962; Coleman et al., 1988).
- un lot de souris traitées avec un produit isolé d'une plante à une concentration sensiblement égale à la DL<sub>50</sub>/4 du composé.

#### 2.4.4.3. Animaux d'expérimentation

Les animaux d'expérimentation sont des souris Balb/c de 18-24 g mâles ou femelles âgées de 8 semaines environ. Nous avons choisi les souris Balb/c à cause de leur grande sensibilité aux *Leishmania* ssp et à *Trypanosoma cruzi*.



Nombre de souris par lot expérimental : 10

\* A la 7<sup>ème</sup> semaine décès de 2 souris

\*\* A la 5<sup>ème</sup> semaine décès de 2 souris, à la 6<sup>ème</sup> semaine décès de 3 souris (à partir de cette semaine le calcul de l'intervalle de confiance n'est plus significatif)

Courbe N° 2.1

Evolution de l'Indice Leishmanien (IL) en fonction de la quantité d'amastigotes de *Leishmania amazonensis* (PH8) inoculée à des souris Balb/c

#### 2.4.4.4. Infection avec *Leishmania amazonensis* ou *L. venezuelensis*

Les souris sont infectées par des parasites au stade amastigote de *Leishmania amazonensis*, des souches de référence IFLA/BR/67/PH8 soit MHOM/GF/84 CAY H 142 ou de *L. venezuelensis* de référence H-3 provenant de Barquisimeto, Venezuela (hôte: Homme), par voie sous cutanée au niveau du coussinet ventral de la patte arrière droite, la patte gauche restant comme témoin.

La quantité d'amastigotes inoculée est de  $10^6$  amastigotes dans 0,2 ml de PBS pour les espèces *Leishmania amazonensis* (PH8) et *L. venezuelensis* (H-3) et de  $3 \times 10^6$  amastigotes pour la souche *L. amazonensis* (H-142) dans le même volume de PBS. Cette concentration de parasites a été préalablement déterminée par des essais d'infection de souris Balb/c à différentes concentrations de parasites (Courbes N° 2.1 et 2.2 page 83).

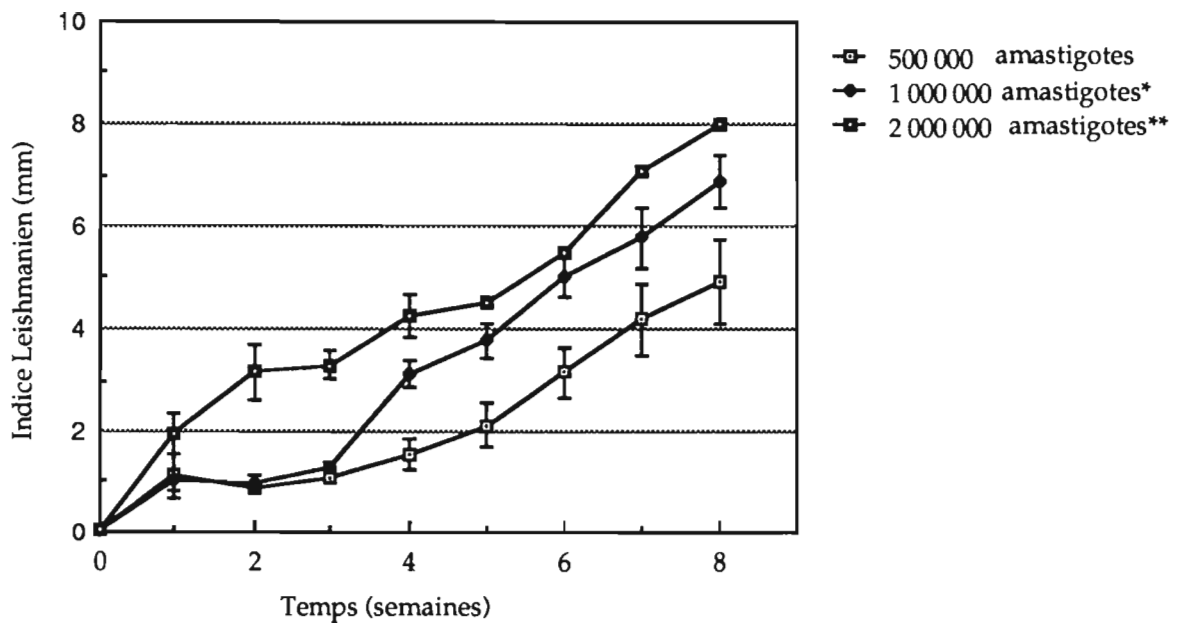
Les amastigotes proviennent de hamsters. Ils sont obtenus de la même manière que la collecte des amastigotes servant aux essais *in vitro* dans le modèle macrophages (voir la technique de récolte des amastigotes).

#### 2.4.4.5. Traitement avec les principes actifs isolés des plantes

Les traitements commencent 24 heures après l'inoculation des amastigotes de *Leishmania* ssp et durent 14 jours consécutifs. Des essais avec des traitements de 7 jours consécutifs ont été effectués sans succès. En effet au cours de ces essais, les différences de mesure entre les lots expérimentaux témoins et Glucantime<sup>R</sup> n'étaient pas assez importantes pour pouvoir être interprétées. Un traitement de 14 jours consécutifs paraît excessif, mais il recrée les conditions d'une thérapie chez l'Homme infecté par *L. braziliensis* et traité par le Glucantime<sup>R</sup>.

L'antimoniote de N-méthyl glucamine est dissous dans de l'eau distillée et injecté à la dose de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans  $200 \mu\text{l}$ . Le produit à tester est solubilisé dans  $40 \mu\text{l}$  de polysorbate (Tween 80, Prolabo) complété avec du milieu PBS pour obtenir la concentration désirée. Ensuite  $200 \mu\text{l}$  de la solution obtenue sont inoculés par voie sous cutanée au niveau dorsal. La concentration du produit dépend de sa toxicité. Peu de problèmes ont été rencontrés lors de l'injection des produits. Il a été observé chez toutes les souris traitées une inflammation à l'endroit des piqûres, qui en général disparaissait à l'arrêt du traitement.

Des essais d'inoculation des médicaments au niveau de la patte infectée ont été réalisés pour essayer de reproduire les conditions d'application des



Nombre de souris par lot expérimental: 10

\* A la 7<sup>ème</sup> décès d'une souris

\*\* A la 4<sup>ème</sup> 5 souris décédées, à la 5<sup>ème</sup> semaine 6 souris décédées (à partir de cette semaine le calcul de l'intervalle de confiance n'est plus significatif), à la 6<sup>ème</sup> semaines 7 souris décédées, à la 7<sup>ème</sup> semaines 9 souris décédées

#### Courbe N° 2.2

Evolution de l'Indice Leishmanien (IL) en fonction de la quantité d'amastigotes de *Leishmania venezuelensis* (H-3) inoculée à des souris Balb/c

plantes en médecine traditionnelle. Les souris sont infectées de la manière décrite ci-dessus, mais le traitement s'effectue 14 jours après l'infection parasitaire et en une seule injection au niveau du coussinet plantaire de la patte arrière infectée par les parasites.

Pour ces essais, les concentrations de produits administrés sont multipliées par deux. Les produits sont préparés de la même manière que lors des traitements par voie générale, dissolution de l'antimoniote de N-méthyl glucamine dans l'eau distillée, et des produits d'origine végétale dans le polysorbate (Tween 80) puis le PBS.

#### 2.4.4.6. Paramètres étudiés

Les diamètres des lésions de la patte infectée et de la patte témoin sont mesurés chaque semaine pendant 8 semaines, en commençant les premières mesures 48 heures avant l'inoculation des parasites à l'aide d'une micromètre gradué en 1/10 mm (Réf: Kroelin 1 ODI 00T6). Le calcul de la différence des deux mesures donne l'épaisseur de la lésion, que certains pharmacologues appellent l'Indice Leishmanien (IL) (Coleman et al., 1988). Cette terminologie sera employée dans ce travail.

#### 2.4.4.7. Etudes statistiques

Les résultats sont exprimés par le calcul de la moyenne arithmétique des Indices Leishmaniens et le calcul de l'intervalle de confiance de la moyenne observée au risque  $\alpha$  à 5% qui est calculé avec la formule suivante:

$$\text{Intervalle de confiance} = \frac{\bar{x} \pm s}{\sqrt{n}}$$

$\bar{x} = 2,23$  si  $n$ (nombre de souris)=10 au risque  $\alpha = 5\%$

$\bar{x} = 2,45$  si  $n = 6$  au risque  $\alpha = 5\%$

$s$  = la moyenne observée

Un produit est considéré comme actif lorsque la moyenne des diamètres des lésions des souris traitées avec ce produit est égale ou inférieure à la moyenne des diamètres des lésions mesurées sur les souris traitées à l'antimoniote de N-méthyl glucamine (Glucantime<sup>R</sup>). Les substances actives ont généralement fait l'objet de plusieurs protocoles dans la mesure où les quantités de produit disponible étaient suffisantes.

### **2.4.5. Essais biologiques *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* au stade de trypomastigote (Croft et al., 1988; Cruz et al., 1980; Hammond et al., 1986; Neal et Van Bueren, 1988).**

Ces essais ont été réalisés à Asunción à l'Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) sous la direction de la Dra A. DE ARIAS.

#### **2.4.5.1. Obtention de sang de souris Balb/c pendant la phase aigüe de la maladie de Chagas**

Des souris Balb/c sont infectées par voie intrapéritonéale par 25.000 trypomastigotes de la souche de *Trypanosoma cruzi* Y. Avec cette souche de *T. cruzi*, le pic de parasitémie est obtenu 7 jours après l'inoculation. Le sang est prélevé par ponction cardiaque dans lequel y est ajouté une solution anticoagulante de citrate sodium à 3,8 %, dans la proportion sang-anticoagulant 7/3. La concentration de trypomastigotes est évaluée par comptage au microscope à la cellule de Thoma. Par la suite, cette concentration est amenée à environ  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  trypomastigotes.ml<sup>-1</sup> pour l'expérimentation.

#### **2.4.5.2. Préparation des extraits à tester**

2 mg d'extrait à tester sont dissous dans un millilitre d'une solution saline de Krebs' Ringer glucosée à pH 7.4 contenant 0,25 % d'éthanol ou de DMSO suivant la solubilité de l'extrait à dissoudre.

Le produit de référence utilisé est le violet de gentiane, seul produit couramment employé en prophylaxie de la maladie de Chagas dans les banques de sang en Amérique latine. La concentration finale d'extrait est de 200.µg ml<sup>-1</sup>, la concentration d'activité du violet de gentiane à 4° C.

#### **2.4.5.3. Test *in vitro* sur *T. cruzi* au stade trypomastigote**

Pour les essais, nous employons des plaques d'hémoagglutination, chaque puits reçoit 0,1 ml de la solution d'extrait plus 0,9 ml du sang contenant les trypomastigotes. Des puits contenant une solution saline de Krebs' Ringer et du sang total infecté servent de témoins de la parasitémie. Le médicament de référence, le violet de gentiane, est mis dans les mêmes conditions opératoires que les extraits.

Tous les essais sont réalisés en triplicate. Les plaques sont agitées pendant 10 minutes et maintenues à 4° C pendant 24 heures. L'activité trypanocide des extraits est ensuite évaluée par comptage du nombre de parasites dans les différents puits. Lorsqu'un puits est dépourvu de parasite, le sang contenant le produit supposé actif sur les trypomastigotes est inoculé à des souris Balb/c normales. L'évolution de la parasitémie est contrôlée une fois par semaine pendant 4 semaines chez les souris inoculées. Si après cette période la parasitémie est nulle nous pouvons considérer que le produit est effectivement actif sur les trypomastigotes.

Il est aussi important de pouvoir contrôler l'effet des produits à tester sur la structure du sang. Ce contrôle est fait lors de la lecture des plaques.

#### **2.4.6. Essais biologiques *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par *Trypanosoma cruzi* au stade trypomastigote**

Les essais sur souris Balb/c infectées par *T. cruzi* n'ont pu être réalisés à l'IBBA pour des raisons de sécurité et un manque d'expérience de ce type d'expérimentation de notre part. Ils ont été effectués au laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine de l'Université Libre de Bruxelles sous la conduite du Pr. Y. CARLIER et financés par l'ORSTOM.

##### **2.4.6.1. Protocole expérimental**

Pour chaque extrait testé, deux groupes de souris sont constitués:

- le groupe témoin de toxicité: 10 souris non infectées mais recevant l'extrait dans son solvant (milieu PBS avec 5 % de polysorbate 80 "Tween 80 Prolabo").

- le groupe expérimental : 12 souris infectées et recevant la substance dans son solvant.

Pour l'ensemble du protocole deux groupes témoins:

- le groupe témoin d'infection: 10 souris infectées et ne recevant aucune substance

- le groupe témoin de l'effet du solvant: 10 souris infectées recevant des injections de solvant ne contenant pas de substances à tester.

##### **2.4.6.2. Souris**

Les souris utilisées sont des souris Balb/c, âgées de 8 semaines et pesant de



20 à 30 g. Le sexe mâle a été choisi pour sa plus grande sensibilité à l'infection, susceptible de mieux détecter l'activité thérapeutique.

#### **2.4.6.3. Infection par *Trypanosoma cruzi* au stade trypomastigote**

L'infection a été réalisée chaque fois avec 25.000 trypomastigotes de *T. cruzi* (souche Tehuentepec), injectés par voie intrapéritonéale. Cette voie a été choisie pour la mortalité importante qu'elle entraîne afin de mieux mesurer un éventuel effet thérapeutique par une diminution de la mortalité.

#### **2.4.6.4. Préparation des extraits de plantes**

Les extraits sont tous dissous dans du tampon PBS à pH 7,2, 0,01 M contenant 5 % de polysorbate 80 (Tween 80, Prolabo). La dose a été ajustée à la concentration voulue d'extrait (généralement DL<sub>50</sub>/3) et au poids des souris. Le volume de l'inoculation est de 200 µl à chaque injection. Le traitement avec les extraits a été systématiquement réalisé par injection sous-cutanée, tous les jours entre le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après l'infection, soit 7 jours consécutifs.

#### **2.4.6.5. Paramètres étudiés**

Pour ces essais trois paramètres ont été systématiquement étudiés:

- la mortalité des souris au cours de l'expérience.
- la mortalité cumulative 30 jours après l'infection.
- la parasitémie mesurée par la méthode de Pizzi-Brener (Brener, 1962; Pizzi, 1957), tous les deux jours, du 8<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> jour après l'infection, période habituelle de la phase aigüe de la maladie. Le maximum de parasitémie a été utilisé pour les comparaisons statistiques entre les groupes infectés, de même que la date d'apparition de ce pic de parasitémie. L'étude a été arrêtée 30 jours après l'infection.

#### **2.4.6.6. Etude statistique**

La moyenne arithmétique et l'écart type des parasitémies pour chaque groupe de souris ont été systématiquement calculés. Les comparaisons statistiques des données ont été effectuées par le test de Student pour les parasitémies maximales et les dates de ces parasitémies ou de la mortalité. Le test de X<sup>2</sup> a été utilisé pour comparer les mortalités.

TROISIEME PARTIE

ETUDES CHIMIQUE ET  
BIOLOGIQUE DE  
*GALIPEA LONGIFLORA* Kr.  
(RUTACEAE)

## Présentation

Dans la partie précédente de ce travail, nous avons présenté l'approche ethnopharmacologique, les résultats des essais biologiques préliminaires de criblage et les protocoles biologiques expérimentaux. Après ce travail de screening, trois plantes utilisées par les Chimanes ont confirmé leur activité biologique au laboratoire sur les cultures de leishmanies *in vitro*.

Les études chimiques et biologiques de ces trois plantes feront l'objet des trois chapitres suivants:

- la partie III "Etudes chimique et biologique de *Galipea longiflora* Krause, une Rutacée,
- la partie IV "Etudes chimique et biologique de *Pera benensis* Rusby, une Euphorbiacée,
- la partie V " Etudes chimique et biologique d'*Ampelocera edentula* Kuhl., une Ulmacée.

### 3.1 ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE *GALIPEA LONGIFLORA* Kr. (RUTACEAE)

#### 3.1.1. Etude botanique du genre *Galipea* et de *Galipea longiflora* Krause

Le genre *Galipea* Aublet fait partie de la famille des Rutaceae. Ce genre est néotropical, huit à dix espèces le composent (Elias, 1970). Ce sont des arbustes ou de petits arbres avec des feuilles alternes, trifoliées et quelques fois unifoliées. Le genre *Galipea* fait partie de la sous tribu néotropicale des Cusparariinae, un groupe de Rutacées comprenant 22 genres, pas encore très bien défini par les systématiciens. Le genre *Galipea* a été décrit la première fois par Aublet en 1775 à partir de *Galipea trifoliata* récolté en Guyane française.

Le genre *Galipea* se rencontre en Amérique du Sud et en Amérique centrale. Il est caractérisé (Elias, 1970; Engler, 1896) par la combinaison d'un calice cupulaire à cinq dents, d'une corolle tubulaire, de deux étamines fertiles et de trois à cinq staminodes insérées près de l'apex du tube de la corolle à des anthères jointes à la base. L'ovaire est composé de cinq carpelles latéraux qui forment un fruit capsulaire.



Figure N° 23.

*Galipea longiflora* Kr. A. Inflorescence, B. Feuilles, C. Infrutescence, D. Méricarpe avec fruit, E. Endocarpe, F. Graine

*Galipea longiflora* Krause (Figure N° 23), décrit pour la première fois en 1914 par Krause (Krause, 1914), est un arbuste de 10 à 15 m de haut, connu en Bolivie dans les forêts tropicales des derniers contreforts des Andes, dans l'Alto-Beni des départements de La Paz et du Beni et dans les régions limitrophes du Brésil au Nord-Est du pays.

Les feuilles sont alternes, trifoliées avec un pétiole glabre de 3 à 20 cm de long. Les pétiolules mesurent de 0 à 2 cm de long. Les feuilles terminales sont entières, glabres, cassantes, légèrement obovées, acuminées à la base, un peu décurrentes ou cunéées; elles mesurent de 15 à 40 cm de long et 4 à 16 cm de large avec 8 à 15 nervures secondaires par côté. Les feuilles latérales sont elliptiques et cunéées, mesurent 12 à 30 cm de long sur 4 à 12 cm de large avec 5 à 11 nervures secondaires par côté. Ces nervures sont saillantes sur les deux faces du limbe.

Les inflorescences, en panicules terminales, sont très pubescentes, le pédoncule rigide mesure entre 5 et 20 cm de long. Le rachis fleuri de 10 à 50 cm de long, avec des branches latérales sessiles ou sub-sessiles, porte des bractées lancéolées de 2 à 3 cm de long sur 0.7 à 0.8 mm de large. A la base de ces bractées se trouvent à 3 mm dans la fleur et 1,5 à 7 mm dans le fruit, cinq à deux pédicelles plus petits.

Le calice cupulé de 12 à 15 mm de long est composé de 5 lobes lancéolés, de 3 à 3,5 mm de long, densément pubescents à l'extérieur et légèrement sericés à l'intérieur, persistant dans le fruit.

La corolle, avec 5 pétales lobés très pubescents sur la face externe, est blanche, le tube mesure 38 à 40 mm de long et 6 à 10 mm de large hirsute à l'intérieur. Les lobes sont imbriqués dans le bourgeon, oblancéolés, ronds au sommet et pubescents à l'intérieur.

Les étamines fertiles au nombre de deux sont insérées près de l'apex du tube, avec des filaments de 12 mm de long, des anthères oblongues de 15 à 20 mm de long avec un appendice basal de 2,5 mm. Les staminodes au nombre de cinq sont insérées près de l'apex du tube mesurent 25 à 32 mm de long, pubérulentes chacune avec un gland apical sphérique. Le disque cupulé, sinué en conformité avec les carpelles au nombre de cinq, superficiellement denté, mesure 3,5 mm. L'ovaire comprend cinq carpelles de 3,5 mm, glabres dans le bourgeon et très pubescents dans la fleur. Chaque carpelle se compose de 2 ovules superposés. Le style de 80 à 100 mm de long est glabre. Le stigmate est capité.

Les fruits sont des méricarpes généralement au nombre de cinq (avortant souvent), libres, de 8 à 11 mm de long sur 6 à 8 mm de large. Chaque fruit

possède un bec dorsal terminal de 1.8 à 3.5 mm de long. Les fruits sont souvent durs et parfois pubescents, glandulaires, verts quand ils sont frais et brun-vert à vert quand ils sont secs.

Les graines de 5 à 8 mm de long sur 4 à 5 mm de large, une seule par méricarpe, sont largement elliptiques, ovées, glabres et brunes.

Les échantillons de *Galipea longiflora* Krause ont été récoltés à Fatima de Chimanes dans le département du Beni à 400 m d'altitude en forêt primaire et mis en collection sous la référence A.F. 850. Cet herbier a été identifié par un spécialiste de la famille des Rutacées sud-américaines, J.A. KALLUNKI du New York Botanical Garden. Un double de cet herbier a été déposé à l'Herbier National de Bolivie à La Paz.

*Galipea longiflora* Kr. pousse en peuplement d'importance moyenne (une vingtaine d'individus par peuplement). Il est très localisé sur les collines qui forment les premiers contreforts andins de l'Alto-Beni appelés par les Chimanes "monte". L'écorce du tronc dégage une odeur ou plus exactement un parfum très spécifique à cet arbre.

L'écorce de couleur brune est reconnaissable avec un suber très important de couleur crème. En séchant, il se forme sur la surface de l'écorce des petits cristaux en forme d'aiguilles, identifiés à de la 2-phénylquinoléine.

### 3.1.2. Ethnopharmacologie de *Galipea longiflora* Krause

Les Indiens Chimanes appellent *Galipea longiflora* Kr., "évanta". L'évanta est employé pour cicatriser les lésions cutanées d'espundia, nom qu'ils donnent à la leishmaniose cutanée dûe à une infection par *Leishmania braziliensis*.

Les écorces du tronc d'évanta sont employées fraîches. Le récolteur Chimane racle les écorces du tronc avec un couteau ou une machette de manière à obtenir une poudre. Cette poudre est compactée pour confectionner un emplâtre qui sera appliqué directement sur la lésion. Cet emplâtre reste sur la lésion une demi-heure environ. Sitôt appliqué, il provoque une sensation de brulûre au niveau de la plaie. Il est renouvelé plusieurs fois par jour et jusqu'à la cicatrisation complète de la lésion. A notre connaissance, les autres parties de la plante, feuilles, écorces de racine ou fruits, ne sont pas utilisées pour traiter localement les leishmanioses cutanées.

Les Chimanes emploient également l'évanta pour traiter les dysenteries d'origine amibienne ou non. Ils préparent avec les écorces du tronc une décoction. Cette décoction est donnée deux à trois fois par jour, à raison d'une tasse à café à chaque fois. Nos informateurs nous ont fait remarquer que la dose

prescrite ne devait pas être dépassée sous peine de provoquer de fortes douleurs intestinales.

L'évanta est une plante très appréciée par les Indiens Chimanes. Elle est également très réputée chez d'autres groupes ethniques d'origine indienne de cette partie de la Bolivie et également parmi la population locale du Beni d'origine hispanique, les Kambas. Cette plante fait partie des remèdes traditionnels majeurs de cette région.

### 3.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS

#### Généralités

Tous les organes de la plante, les écorces de tronc, les écorces de racines, les feuilles, les fruits, et les graines ont fait l'objet d'essais biologiques *in vitro* sur trois espèces de leishmanies (*Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. donovani*) au stade promastigote et sur trois souches de *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen, C8C11 et Tehuentepec) au stade épimastigote.

La séparation et l'isolement des différents principes actifs ont été réalisés à l'IBBA (Instituto Boliviano de Biología de Altura, La Paz, Bolivie).

Suite aux essais biologiques préliminaires *in vitro*, il s'avère que la présence d'alcaloïdes dans les écorces de racines, de tronc et dans les feuilles de *Galipea longiflora* est responsable de l'activité antiparasitaire des extraits préparés à partir de ces organes de plante. Cette activité biologique n'a pas été détectée avec les différents extraits préparés avec les fruits et les graines.

La séparation et l'isolement des alcaloïdes de *Galipea longiflora* a fait largement appel aux techniques chromatographiques, notamment les chromatographies sur colonne de silice H (Kieselgel 60, MERCK 7734) avec une pression de 0,35 bar, les chromatographies couches minces (CCM) sur DC Alufolien 60 F 254 (MERCK 5554) et pour purifier les produits, la flash chromatographie (FC) sur silice 60 (MERCK, 230-400 MESH).

Les solvants employés pour les chromatographies sur colonne sont des mélanges d'hexane et d'acétate d'éthyle de polarité croissante, et pour les CCM, hexane-acétate d'éthyle 90-10, benzène-acétate d'éthyle 95-5 et chloroforme-benzène-méthanol-ammoniac 50-50-0,5-vapeurs.

L'isolement est conduit en fonction des résultats obtenus au cours des essais biologiques *in vitro* sur les *Leishmania ssp.* et *Trypanosoma cruzi* avec chaque fraction isolée. Au cours de cette séparation, les produits trop minoritaires ont été volontairement laissés de côté à cause de la faible quantité

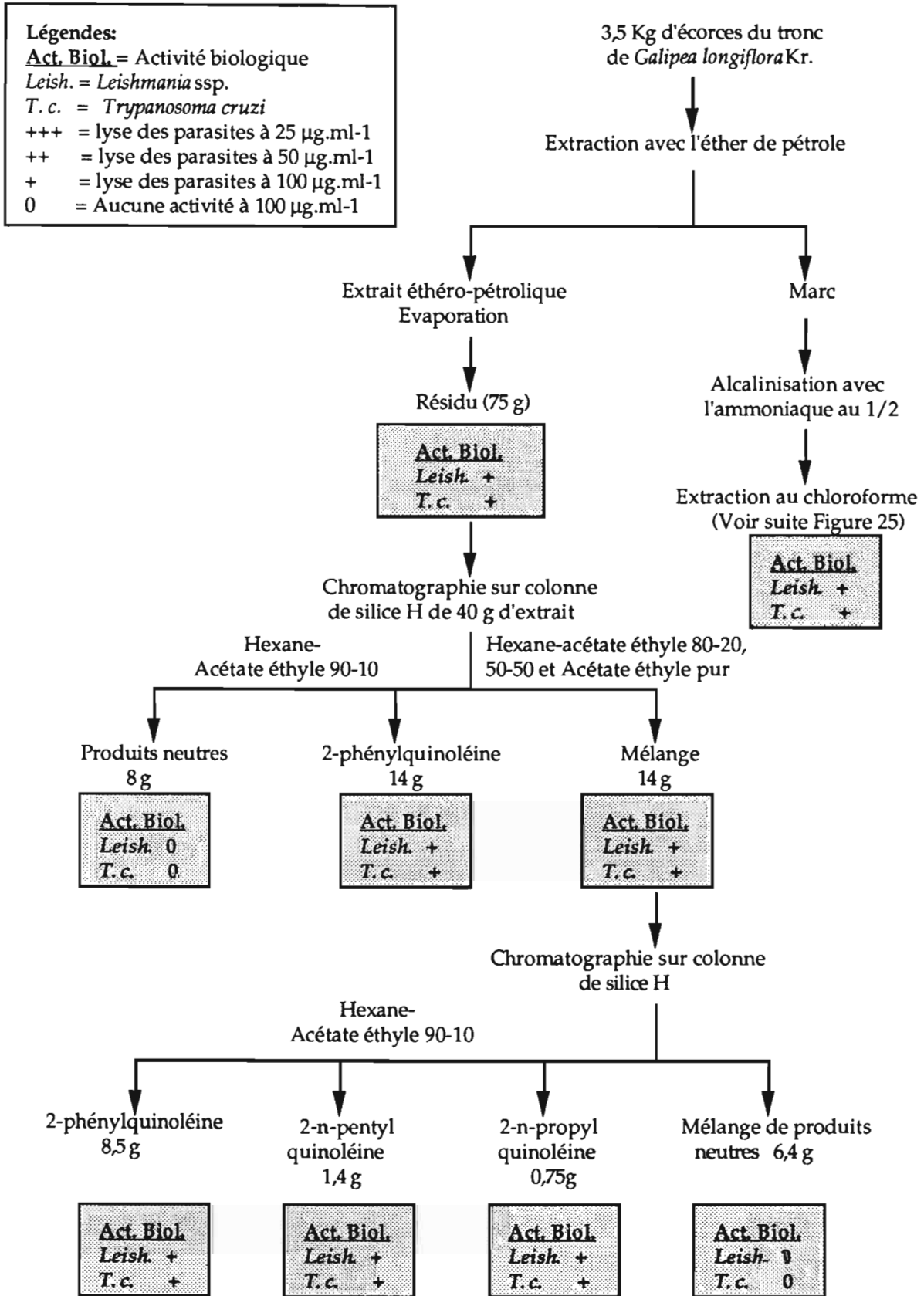


Figure N° 24 Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de *Galipea longiflora* Kr. par l'éther de pétrole



isolée, insuffisante pour couvrir les besoins de la réalisation des essais biologiques, en particulier les essais sur le modèle animal. Pour effectuer dans de bonnes conditions les essais biologiques sur le modèle animal, une quantité minimale de 400 mg est nécessaire.

### 3.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de *Galipea longiflora* Kr. (voir figures N° 24 et 25)

Les écorces de tronc séchées broyées (3,5 kg) sont extraites par l'éther de pétrole dans un extracteur de type Soxhlet. Après évaporation du solvant, l'extrait obtenu est séché sous pression réduite, puis fait l'objet d'un contrôle de son activité biologique *in vitro* sur les milieux de culture contenant les leishmanies et les trypanosomes à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>. L'extrait lyse totalement les parasites à cette concentration, mais pas à 50 µg.ml<sup>-1</sup>. Une CCM de l'extrait dans le solvant de migration, hexane-acétate d'éthyle 90/10, et une révélation de la plaque au réactif de Dragendorff montrent la présence de nombreux alcaloïdes dans l'extrait. Une partie de cet extrait, 40 g sur les 75 g obtenus, est chromatographiée sur colonne de silice H avec une pression de 0,35 bar. Cette chromatographie permet d'éluer les produits suivants:

- un mélange de 8 g de produits neutres élués avec le solvant hexane-acétate d'éthyle 90/10
- avec le même solvant de colonne, 14 g de l'alcaloïde I (2-phénylquinoléine)
- diverses fractions alcaloïdiques (14 g) éluées avec les solvants hexane-acétate d'éthyle, 80/20, 50/50 et l'acétate d'éthyle seul.

Cette dernière fraction, active sur les parasites à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>, fait l'objet d'une nouvelle séparation sur une colonne chromatographique de silice 60 H (MERCK 5554) qui permet d'isoler les produits suivants avec le solvant hexane-acétate d'éthyle 90/10:

- 8,5 g de l'alcaloïde majoritaire, l'alcaloïde I (la 2-phénylquinoléine)
- 1,4 g de l'alcaloïde II (la 2-*n*-pentylquinoléine)
- 0,75 g de l'alcaloïde III ( la 2-*n*-propylquinoléine)
- 6,4 g de produits neutres

L'importance des produits neutres dans cet extrait s'explique par le fait que l'extrait brut obtenu n'a pas été traité par la méthode classique de purification des alcaloïdes, c'est à dire par le passage acide-base. Le rendement en alcaloïdes extraits par l'éther de pétrole est évalué à 13 g par kilogramme d'écorces de tronc.

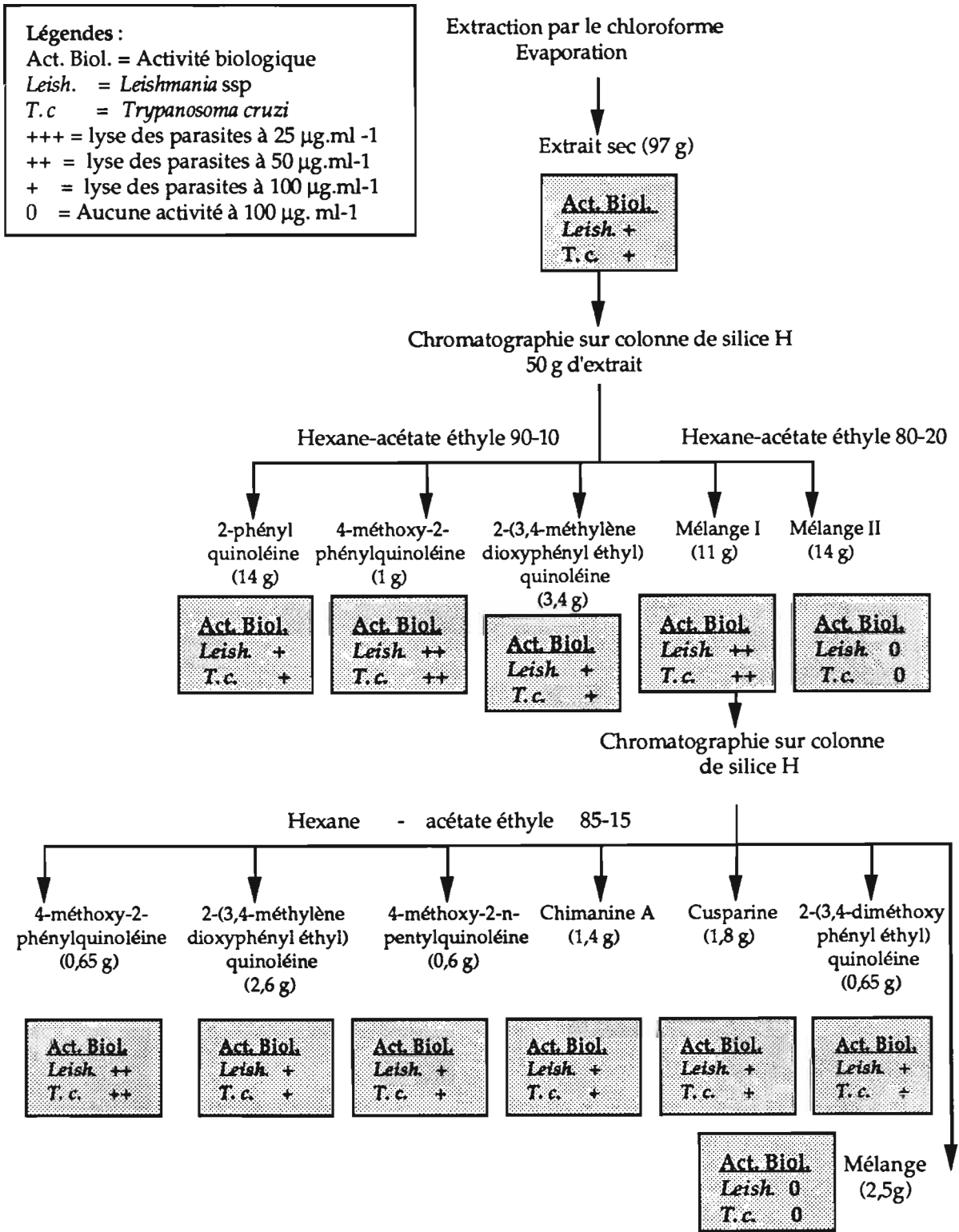


Figure N° 25  
 Suite de la figure N° 24 décrivant l'extraction des écorces de tronc

Ensuite le marc séché est alcalinisé par de l'ammoniaque au demi, puis extrait par du chloroforme pendant huit heures environ dans un extracteur de type Soxhlet. Après l'évaporation du solvant et séchage de l'extrait sous pression réduite, une partie de l'extrait (50 g) sur les 97 g obtenus est directement chromatographiée sur une colonne de silice H (Merck<sup>R</sup>) avec une pression de 0,35 bar.

De cette première chromatographie sont élués dans l'ordre suivant:

- 14 g de l'alcaloïde I (la 2-phénylquinoléine) par le mélange hexane-acétate d'éthyle 90/10.
- 1 g de l'alcaloïde IV (la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine) avec le même solvant
- 3,4 g de l'alcaloïde V ( la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)quinoléine avec le même solvant que la fraction précédente
- 11 g d'un mélange alcaloïdique actif à 50 µg.ml<sup>-1</sup> sur les parasites
- 14 g d'un mélange de produits neutres sans activité biologique.

Le mélange actif I de 11 g fait de nouveau l'objet d'une séparation sur une colonne de silice H (Merck<sup>R</sup>) avec une pression de 0,35 bar. Sont obtenus par élution au solvant hexane-acétate d'éthyle 85-15, les produits suivants:

- 0,65 g de l'alcaloïde IV ( la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine)
- 2,6 g de l'alcaloïde V ( la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)quinoléine)
- 0,6 g de l'alcaloïde VI ( la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine)
- 1,4 g de l'alcaloïde VII (la 4-méthoxy-2-*n*-propylquinoléine ou chimanine A)
- 1,8 g de l'alcaloïde VIII (la 2-(3,4-méthylènedioxydioxyphényl éthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine)
- 0,65 g de l'alcaloïde IX ( la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl)quinoléine
- 2,5 g d'un mélange de produits alcaloïdiques et neutres non identifiés et inactifs sur les parasites.

Le rendement brut en alcaloïdes totaux de l'extrait chloroformique est estimé à 23,5 g par kilogramme de plante. La teneur totale en alcaloïdes des écorces du tronc de *Galipea longiflora* Kr. est de 36,5 g par kilogramme de plante.

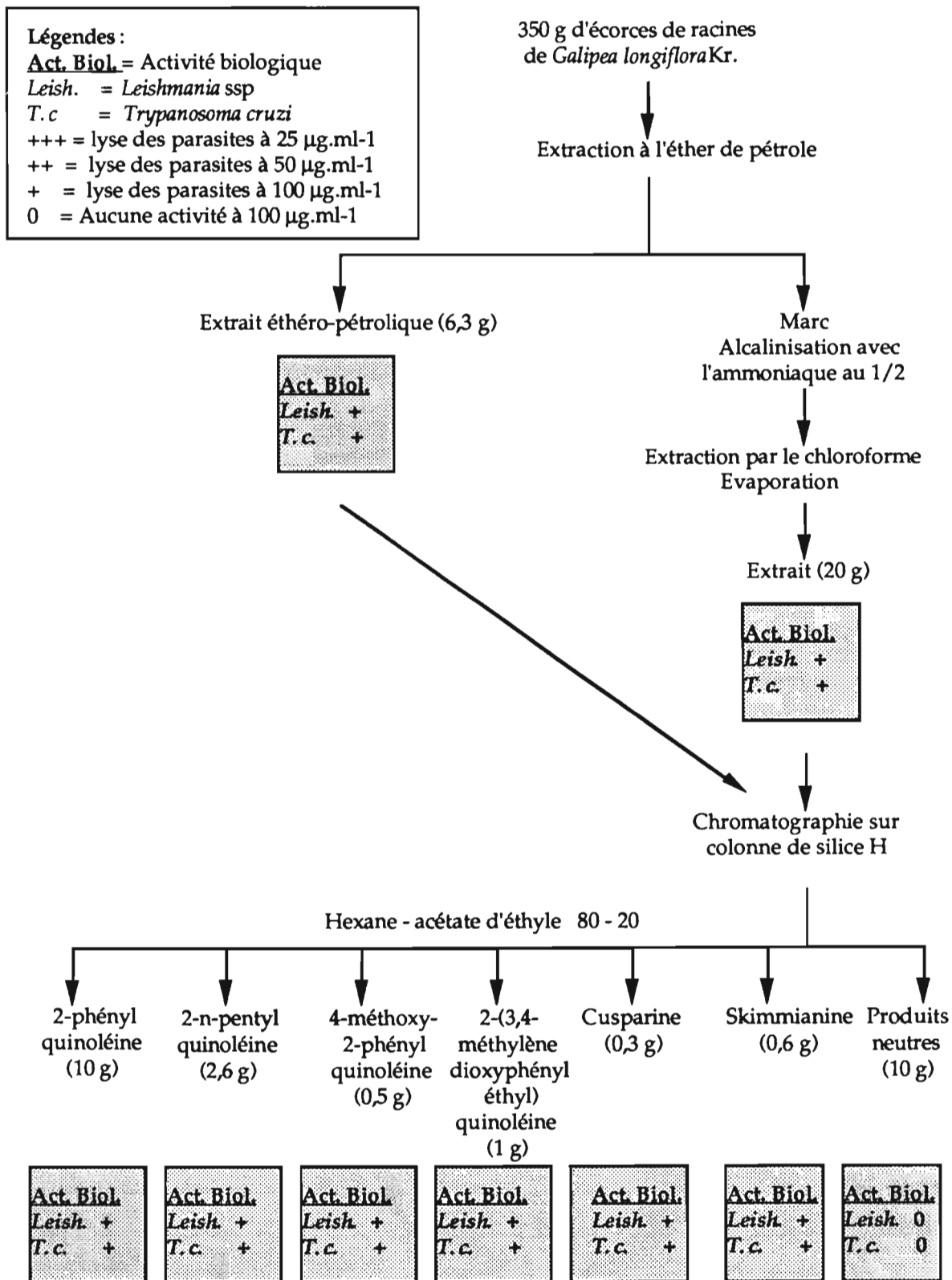


Figure N° 26

Extraction et isolement des principes actifs des écorces  
de racines de *Galipea longiflora* Kr.

### 3.2.2. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines de *Galipea longiflora* Kr. (Figure N° 26)

Les écorces de racines (350 g) séchées et broyées sont extraites par l'éther de pétrole dans un extracteur de type Soxhlet. Après évaporation du solvant et séchage sous pression réduite, il reste un résidu de 6,3 g présentant une activité *in vitro* sur les parasites en culture à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Le marc est alcalinisé par l'ammoniaque au demi, puis extrait par le chloroforme. Après évaporation du solvant et séchage sous pression réduite de l'extrait un résidu de 20 g est obtenu.

La composition alcaloïdique des extraits éthero-pétrolique et chloroformique semblant qualitativement la même sur CCM, ils sont réunis, chromatographiés sur une colonne de silice H avec une pression de 0,35 bar en commençant l'élution au mélange hexane-acétate d'éthyle 80/20.

De cette chromatographie sur colonne sont isolés les alcaloïdes suivants par ordre de sortie de la colonne:

- 10 g de l'alcaloïde I ( la 2-phénylquinoléine)
- 2,6 g de l'alcaloïde II ( la 2-*n*-pentylquinoléine)
- 0,5 g de l'alcaloïde IV ( la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine)
- 1 g de l'alcaloïde V ( la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine)
- 0,3 g de l'alcaloïde VIII ( la cusparine)
- 0,6 g de l'alcaloïde X ( la skimmianine)
- 10 g de produits neutres non actifs sur les parasites *in vitro*.

Un seul de ces alcaloïdes n'a pas été isolé dans les écorces de tronc, l'alcaloïde X la skimmianine. La forte proportion de produits neutres s'explique par le fait que les extraits bruts n'ont pas fait l'objet d'un passage acide-base.

Le rendement en alcaloïdes des écorces de racines est évalué à 42 g par kilogramme d'écorces de racines.

**Légendes :**  
**Act. Biol.** = Activité biologique  
*Leish.* = *Leishmania* ssp  
*T. c.* = *Trypanosoma cruzi*  
 +++ = lyse des parasites à 25µg.ml-1  
 ++ = lyse des parasites à 50µg.ml-1  
 + = lyse des parasites à 100µg. ml-1  
 0 = Aucune activité à 100µg.ml-1

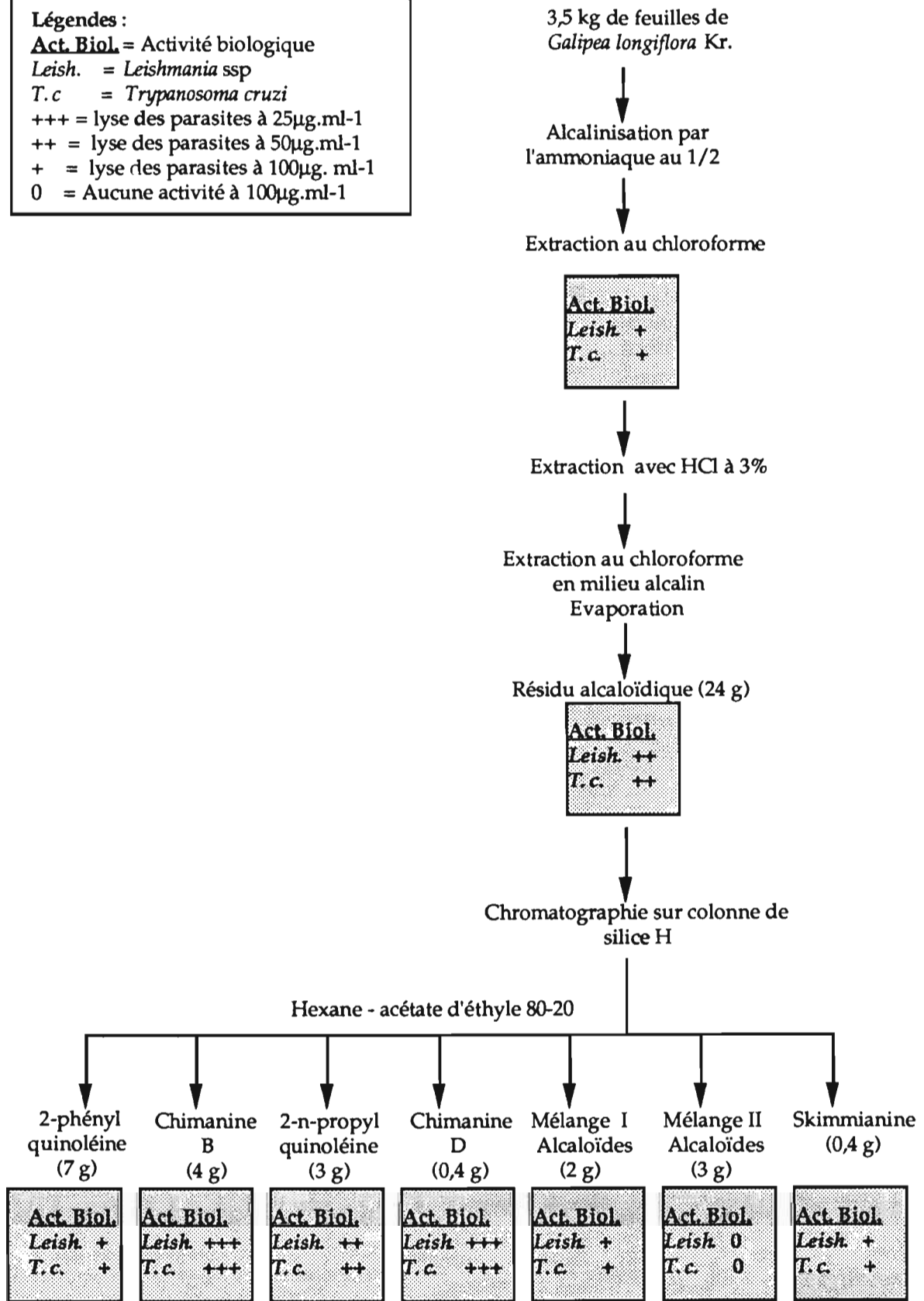


Figure N° 27  
 Extraction et isolement des principes actifs des feuilles de *Galipea longiflora* Kr.

### 3.2.3. Extraction et isolement des principes actifs des feuilles de *Galipea longiflora* Kr. (voir Figure N° 27)

Les feuilles sèches broyées (3,5 kg) sont alcalinisées par l'ammoniaque au demi, puis extraites par le chloroforme dans un extracteur de type Soxhlet. Après une dizaine d'heures d'extraction, l'extrait est évaporé au quart de son volume total. Un aliquot est prélevé, évaporé, séché sous pression réduite puis testé à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . L'extrait chloroformique obtenu est actif *in vitro* sur les parasites à cette concentration.

Pour la purification des alcaloïdes des feuilles, ces derniers ont été soumis à un passage acide-base (extraction des alcaloïdes par l'acide chlorhydrique à 3 % sous forme de chlorhydrates, puis alcalinisation par l'ammoniaque au 1/2 de cette phase aqueuse, et extraction des bases par le chloroforme). Ce procédé a été employé pour séparer les bases des chlorophylles et autres pigments colorés susceptibles de gêner le bon déroulement de la séparation des alcaloïdes.

Finalement 24 g d'alcaloïdes totaux sont obtenus après évaporation et séchage sous vide de l'extrait. Le rendement en alcaloïdes extraits par le chloroforme est évalué à 7 g par kilogramme de feuilles.

Cet extrait est actif à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  *in vitro* sur les parasites en culture.

Les alcaloïdes totaux sont ensuite chromatographiés sur une colonne de silice H (Merck<sup>R</sup>) avec une pression de 0,35 bar. L'élution démarre au mélange hexane-acétate d'éthyle 80/20. De cette chromatographie sont isolés les alcaloïdes suivants par ordre d'élution:

- 7 g de l'alcaloïde I (la 2-phénylquinoléine)
- 4 g de l'alcaloïde XI ( la chimanine B)
- 3 g de l'alcaloïde III ( la 2-*n*-propylquinoléine)
- 0,4 g de l'alcaloïde XII ( la chimanine D)
- 2 g d'un mélange de plusieurs alcaloïdes actifs sur les parasites à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- 3 g d'un mélange alcaloïdique, inactif sur les parasites à la concentration de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
- 0,4 g de l'alcaloïde X ( la skimmianine)

Au cours d'une purification de l'alcaloïde XII, 25 mg d'un alcaloïde très minoritaire ont été obtenus. Cet alcaloïde porte le numéro XIII et a été identifié à la chimanine C.

	Ecorces de racines	Ecorces de tronc	Feuilles
Rendement total en alcaloïdes (g.kg <sup>-1</sup> )	42	36,5	7

Alcaloïde

Estimation de la composition alcaloïdique

	Ecorces de racines	Ecorces de tronc*	Feuilles*
I	66,7 %	47,7 %	29 %
II	17,3 %	2,4 %	
III		1,3 %	12,5 %
IV	3,3 %	2,8 %	
V	6,7 %	10,2 %	
VI		1,0 %	
VII		2,4 %	
VIII	2,0 %	3,1 %	
IX		1,1 %	
X	4,0 %		1,7 %
XI			16,7 %
XII			1,7 %
XIII			0,5 %

Tableau N° 3.1  
Composition alcaloïdique des différents organes de  
*Galipea longiflora* Kr.

\* Le total de la composition alcaloïdique est inférieur à 100 % car des mélanges de produits isolés au cours de la séparation, ont été pris en compte pour le calcul du pourcentage



Les graines (300 g) ont également été extraites successivement par l'éther de pétrole et le chloroforme en milieu alcalin. Aucun de ces extraits n'est actif *in vitro* sur les parasites à la concentration de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Les graines sont très riches en 2-phénylquinoléine, cette dernière cristallise lors de l'évaporation du solvant. L'étude phytochimique de ces extraits n'a pas été effectuée car ils sont inactifs *in vitro* sur les parasites.

### 3.2.4. Composition alcaloïdique des différents organes de *Galipea longiflora* Kr. (Tableau N° 3.1)

Douze alcaloïdes ont été isolés par guidage biologique et un treizième alcaloïde très minoritaire a été séparé au cours de la purification d'une fraction intermédiaire au laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Châtenay-Malabry. Il n'a pas été testé sur les modèles biologiques mis en place à l'IBBA.

L'alcaloïde I est majoritaire dans tous les organes de plantes, il représente plus des deux tiers des alcaloïdes totaux des écorces de racines, la moitié des alcaloïdes des écorces de tronc, le tiers des alcaloïdes des feuilles et la totalité des alcaloïdes des graines.

Les compositions alcaloïdiques qualitatives des écorces de tronc et des écorces de racines paraissent presque identiques, elles se différencient par la présence de l'alcaloïde VI (la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine) dans les écorces de tronc et de l'alcaloïde X (la skimmianine) isolée des écorces de racines et également des feuilles. La composition alcaloïdique des feuilles se différencie nettement des autres organes de la plante à l'exception de l'alcaloïde I (la 2-phénylquinoléine), majoritaire et de l'alcaloïde III (la 2-*n*-propylquinoléine) isolés des écorces de tronc.

Les rendements en alcaloïdes des écorces de racines et des écorces de tronc sont très élevés, respectivement 42  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  et 36  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , alors que la teneur en alcaloïdes des feuilles n'est que de 7  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Dans les feuilles ont été isolés les alcaloïdes les plus actifs, les alcaloïdes III, XI et XII tous actifs *in vitro* à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  sur les leishmanies et les trypanosomes.

### 3.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES ALCALOÏDES ACTIFS *IN VITRO* DU *GALIPEA LONGIFLORA* Kr.

#### Appareillage

Les points de fusion sont mesurés en tubes capillaires et ne sont pas corrigés.

Les spectres sont enregistrés sur les appareils suivants:

- Ultraviolet, PHILIPS PU 8725, éthanol ( $\lambda$  max,  $\log \epsilon$ )
  
- Infrarouge, PERKIN ELMER 257, KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )
  
- RMN  $^1\text{H}$ , BRUKER AC 200 P,  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  ppm,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\delta = 7,27$  ppm)
  
- RMN  $^{13}\text{C}$ , BRUKER AC 200 P à 50 MHz
  
- Masse, NERMAG R 1010 C en impact électronique (IE) à 70 eV ( $m/z$  (%))

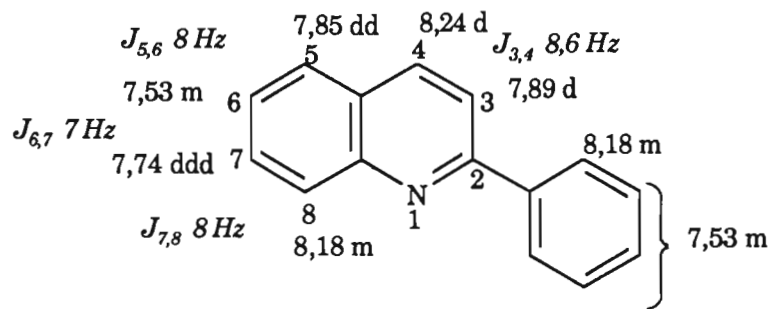


Figure N° 28  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-phénylquinoléine (Alcaloïde I)

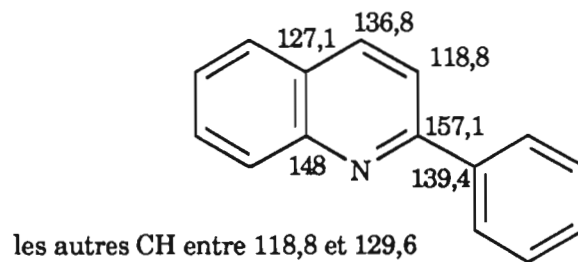


Figure N° 29  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-phénylquinoléine (Alcaloïde I)

### 3.3.1. Alcaloïde I: 2-phénylquinoléine

L'alcaloïde I a été isolé dans tous les organes de la plante, c'est l'alcaloïde majoritaire. Il représente respectivement 66,7% des alcaloïdes totaux (A.T.), des écorces de racines, 47,7 % des A.T. des écorces du tronc et 29% des A.T. des feuilles. Il lyse *in vitro* les leishmanies et les trypanosomes en culture à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Il est si abondant que l'on peut apercevoir ses cristaux sur les écorces du tronc et des racines séchées.

L'examen du spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure N° 28) montre une absence de signaux en dessous de 7,3 ppm qui indique que l'alcaloïde I possède une structure totalement aromatique. Le spectre de RMN <sup>13</sup>C (Figure N°29) montre la présence de 11 CH aromatiques entre 118,8 et 136,8 ppm et de 4 carbones quaternaires entre 127,1 et 157,1 ppm, ce qui permet d'attribuer à cet alcaloïde une formule brute de C<sub>15</sub> H<sub>11</sub> N compatible avec l'ion moléculaire à *m/z* 205 (100 %) du spectre de masse. Les déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C permettent de proposer une structure de phénylquinoléine. La position en 2 du groupement phényle est déduite de la valeur de la constante de couplage entre les 2 protons du noyau pyridinique ( $J_{3,4} = 8,6$  Hz), incompatible avec une position en 4 du substituant ( $J_{2,3} = 5-6$  Hz). Cette structure est confirmée par les déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup>C. La preuve finale de la structure de l'alcaloïde I est apportée par la comparaison directe avec le produit de synthèse (Aldrich). Ce composé n'a jamais été isolé à l'état naturel, il était connu seulement de synthèse (Schöpf et Lehmann, 1932).

Cette quinoléine a été isolée la première fois au cours de l'étude de la composition chimique d'un extrait éthéro-pétrolique d'un lot d'écorces de tronc de *Galipea longiflora* Kr. récolté à Fatima de Chimane le 8/8/87 (Réf: A.F. 790, Fournet et al., 1989).

#### ALCALOÏDE I: 2-PHÉNYLQUINOLÉINE

*Cristaux blancs (Hexane), F = 84 ° C*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

208 (4,63), 256 (4,65), 322 (2,87)

Spectre de masse: *m/z* (%)

*M*<sup>+</sup>. 205 (100), 203 (59), 102 (12)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 28

Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 29

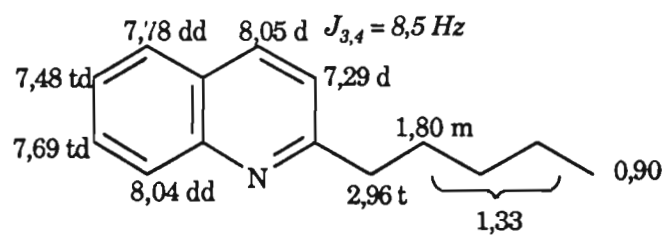


Figure N° 30  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-*n*-pentylquinoléine (Alcaloïde II)

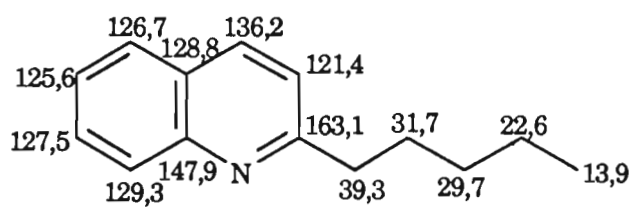


Figure N° 31  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-*n*-pentylquinoléine (Alcaloïde II)

### 3.3.2. Alcaloïde II: 2-*n*-pentylquinoléine

L'alcaloïde II a été isolé par guidage biologique à partir des écorces de tronc (2,4 %) et des écorces de racines (17,3 %). Il lyse *in vitro* les parasites à la concentration de 100µg.ml<sup>-1</sup>.

Il se présente sous la forme d'une huile. Le spectre de RMN du proton (Figure N° 30) montre la présence de 4 protons aromatiques adjacents à 7,78, 7,48, 7,69 et 8,04 ppm et un système AB de 2 protons à 7,29 et 8,05 ppm attribuable aux deux protons pyridiniques d'une quinoléine substituée en 2 ou 4. La constante de couplage de 8,5 Hz montre que les protons sont situés en position 3 et 4, et donc le substituant en position 2, comme pour l'alcaloïde I. Sur le spectre de masse, l'ion moléculaire à *m/z* 199 indique que la quinoléine est substituée par une chaîne pentyle dont les signaux apparaissent sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H à 2,96 ppm (2H, triplet, CH<sub>2</sub> en 1'), 1,80 ppm (2H, multiplet, CH<sub>2</sub> en 2'), 1,33 ppm (4H, multiplet, CH<sub>2</sub> en 3' et 4') et 0,90 ppm (3H, triplet, CH<sub>3</sub> en 5').

L'alcaloïde II est donc la 2-*n*-pentylquinoléine, ce que confirment les signaux observés en RMN <sup>13</sup>C (Figure N° 31) et l'ion à *m/z* 143 du spectre de masse qui correspond à un réarrangement de type rétro-Diels-Alder avec élimination de butène (M-56). Il s'agit d'un alcaloïde connu, déjà isolé de deux espèces du genre *Galipea*, *G. officinalis* Hancock (Mester, 1973) et très récemment de *G. bracteata* originaire du Brésil (Vieira et Kubo, 1990).

#### ALCALOÏDE II: 2-N-PENTYLOUINOLÉINE

##### *Huile*

##### Spectre UV : éthanol ( $\lambda$ max, (log $\epsilon$ ))

206 (4,57), 229 (4,45), 232 (4,42), 271 (3,56), 315 (3,62)

##### Spectre de masse: *m/z* (%)

*M*<sup>+</sup>. 199 (1), 170 (11), 156 (22), 149 (36), 143 (100)

##### Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 30

##### Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 31

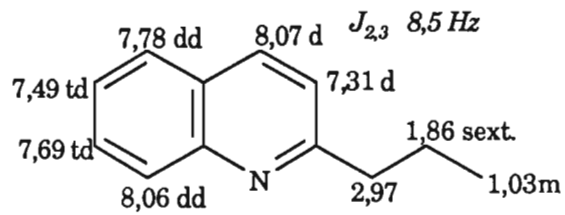


Figure N° 32  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-*n*-propylquinoléine (Alcaloïde III)

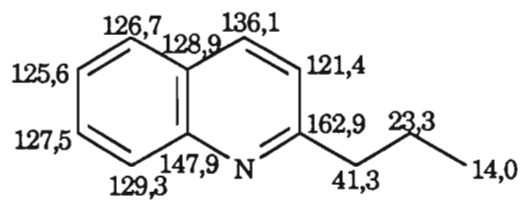


Figure N° 33  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-*n*-propylquinoléine (Alcaloïde III)

### 3.3.3. Alcaloïde III: 2-*n*-propylquinoléine

L'alcaloïde III se présente sous la forme d'une huile; il a été isolé à partir des écorces de tronc (1,3 %) et des feuilles (12,5 %). Il est actif *in vitro* sur les parasites en milieu de culture entre 50 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Le spectre de RMN du proton (Figure N° 32) présente les mêmes signaux que celui de l'alcaloïde II dans la zone aromatique, ce qui prouve une structure de quinoléine substituée en position 2. Le spectre de masse montre un ion moléculaire à  $m/z$  171 qui indique la présence d'une chaîne saturée en C<sub>3</sub>. La partie aliphatique du spectre de RMN <sup>1</sup>H montre les signaux d'une chaîne propyle linéaire à 2,97 ppm (2H, triplet, CH<sub>2</sub> - 1'), 1,86 ppm (2H, sextuplet, CH<sub>2</sub> - 2') et 1,03 ppm (3H, triplet, CH<sub>3</sub> - 3').

Ces données spectrales permettent de proposer pour l'alcaloïde III une structure de 2-*n*-propylquinoléine. Cette structure est confirmée par le spectre de RMN <sup>13</sup>C qui présente tous les signaux du noyau quinoléine (Figure N° 33) ainsi que les trois signaux de la chaîne propyle à 41,3 ppm (CH<sub>2</sub> - 1'), 23,3 ppm (CH<sub>2</sub> - 2') et 14,0 ppm (CH<sub>3</sub> - 3').

Sur le spectre de masse, nous remarquons un pic de base à  $m/z$  143 (M-28) dont la formation peut s'expliquer par un réarrangement de type rétro Diels-Alder avec perte d'éthylène.

Cette quinoléine a déjà été isolée à partir de *Galipea bracteata* (Vieira et Kubo, 1990) et était connue de synthèse (Gilman et al., 1959).

#### ALCALOÏDE III: 2-N-PROPYLQUINOLÉINE

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

207 (4,63), 229 (4,55), 233 (4,52), 274 (3,50), 316 (3,64)

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ : 171 (5), 170 (10), 156 (27), 143 (100)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 32

Spectre de RMN <sup>13</sup>C: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 33



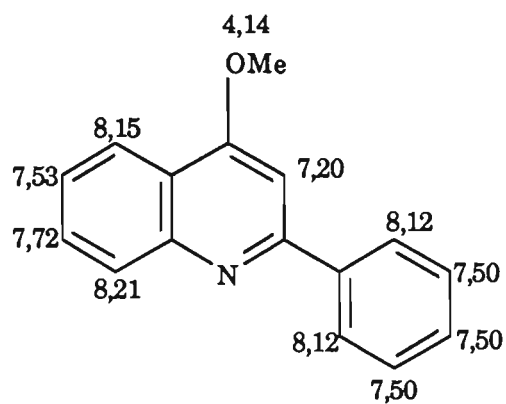
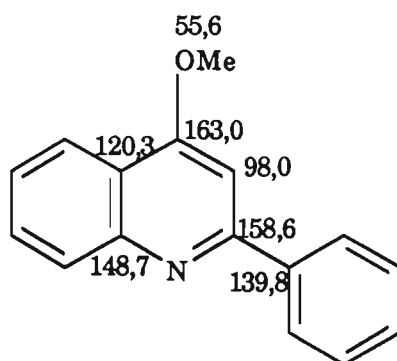


Figure N° 34

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (Alcaloïde IV)



les autres CH (9) entre 121,6 et 130,1

Figure N° 35

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (Alcaloïde IV)

### 3.3.4. Alcaloïde IV: 4-méthoxy-2-phénylquinoléine

L'alcaloïde IV a été isolé à partir des écorces de tronc (2,8 %) et des écorces de racines (3,3 %). Il lyse *in vitro* les différentes souches de parasites en culture à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

L'examen du spectre de masse de l'alcaloïde IV nous indique un poids moléculaire de 235 (100 %), soit 30 unités de masse de plus que l'alcaloïde I et un ion important à  $m/z$  204 (M-31, 75 %) indiquant la présence d'un groupement méthoxyle sur la molécule.

Le spectre de RMN du proton (Figure N° 34) confirme l'existence d'un groupement méthoxyle par la présence d'un singulet de 3 protons à 4,14 ppm. La présence d'un seul proton pyridinique montre que le méthoxyle supplémentaire est situé en position 3 ou 4 de ce noyau. Le déplacement chimique du proton résiduel à 7,20 ppm oriente vers une position en 4 du méthoxyle, confirmée par le déplacement chimique du proton en 5 qui apparaît à 8,15 ppm au lieu de 7,85 ppm pour l'alcaloïde I. L'alcaloïde IV est donc la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine, structure en parfait accord avec les déplacements chimiques observés en RMN du carbone - 13 (Figure N° 35).

Cette quinoléine est connue et a déjà été isolée à partir de *Lunasia amara* (Rutaceae) (Goodwin et al., 1959).

#### ALCALOÏDE IV: 4-MÉTHOXY-2-PHÉNYLQUINOLÉINE

*Cristaux blanc (Hexane) F = 66° C*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

211 (4,53), 254 (4,62), 265 (3,88), 326 (2,95)

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ : 235 (100), 234 (81), 206 (61), 205 (58), 204 (75), 191 (14), 165 (21)

Spectre de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) Figure N° 34

Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) Figure N° 35

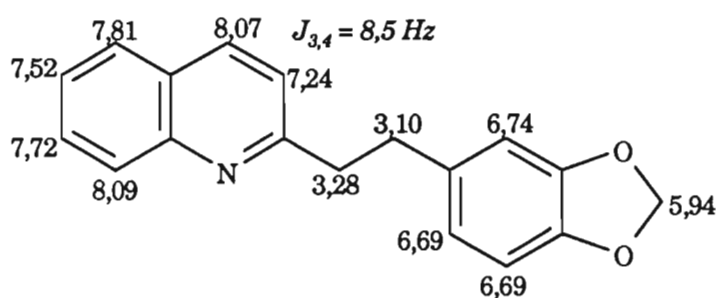


Figure N° 36  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine  
 (Alcaloïde V)

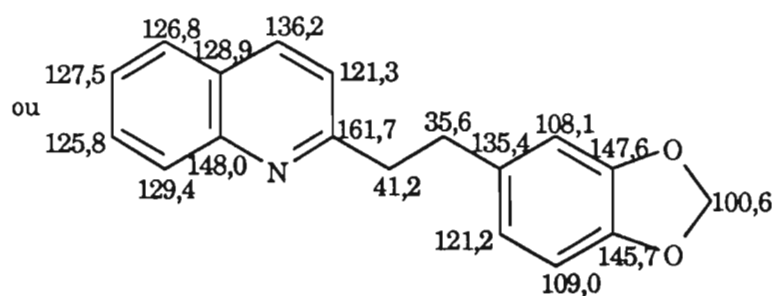


Figure N° 37  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)  
 quinoléine (Alcaloïde V)

### 3.3.5. Alcaloïde V: 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine

Cet alcaloïde a été isolé à partir des écorces de tronc (10,2 %) et des écorces de racines (6,7 %). Il est actif sur les parasites *in vitro* à la concentration de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Le spectre de RMN du proton (Figure N° 36) présente les signaux déjà observés pour une quinoléine substituée en position 2. Il montre aussi un singulet de deux protons à 5,94 ppm et trois protons aromatiques à 6,69 ppm (2H) et 6,74 ppm (1H) indiquant la présence d'un groupement 3,4-méthylènedioxyphényle. Nous remarquons enfin deux multiplets de 2 protons chacun à 3,28 et 3,10 ppm attribuables à deux groupes méthylène situés entre les deux noyaux. L'alcaloïde V est donc identifié à la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine. Cette structure est confirmée par le spectre de RMN du carbone-13 (Figure N° 37) qui montre tous les signaux attendus, ainsi que par la présence d'un fragment intense en spectrométrie de masse à  $m/z$  135 ( $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2^+$ , 75 %) caractéristique d'un groupement 3,4-méthylènedioxybenzyle.

Cet alcaloïde a été isolé la première fois (Fournet et al., 1989) à partir d'un extrait éthéro-pétrolique d'écorces de tronc de *Galipea longiflora* Kr, récolté à Fatima de Chimanes le 8/8/87 (Réf: A.F. 790, Fournet et al., 1989).

Depuis cette date, il a été identifié dans *Galipea bracteata* récolté au Brésil (Vieira et Kubo, 1990).

#### ALCALOÏDE V: 2-(3,4-MÉTHYLÈNEDIOXYPHÉNYLÉTHYL) QUINOLÉINE

*Cristaux blanc (Méthanol) F = 65 ° C*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

205 (4,59), 227 (4,58), 300 (3,66), 314 (3,51)

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ : 277 (99), 276 (100), 156 (18), 135 (75), 129 (15)

Spectre de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) Figure N° 36

Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) Figure N° 37

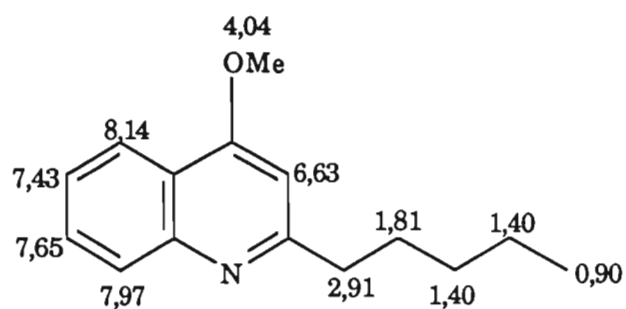


Figure N° 38

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine (Alcaloïde VI)

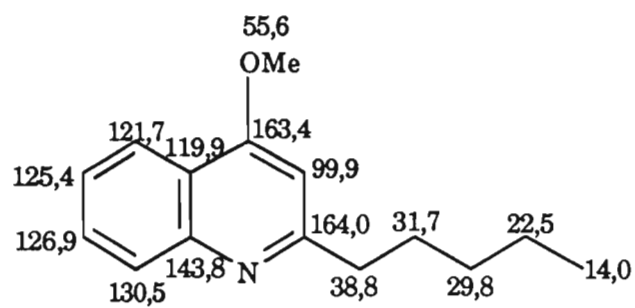


Figure N°39

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine (Alcaloïde VI)

### 3.3.6. Alcaloïde VI: 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine

Cette quinoléine est très minoritaire, elle ne représente que 1 % des écorces de tronc. Elle se présente sous la forme d'une huile. Elle est active *in vitro* sur les parasites en culture à 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Les spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de l'alcaloïde VI montrent de nombreuses analogies avec ceux de l'alcaloïde II déjà identifié à la 2-*n*-pentylquinoléine.

On note la présence des protons et carbones d'une chaîne pentyle, ainsi que les 4 CH aromatiques adjacents de la partie benzénique de la quinoléine. Par contre, le système AB des 2 protons pyridiniques a disparu, remplacé par un singulet de 1 proton à 6,63 ppm et un méthoxyle qui résonne à 4,04 ppm. L'alcaloïde VI est donc un dérivé méthoxylé en 3 ou 4 de l'alcaloïde II. Ceci est confirmé par le spectre de masse qui indique un poids moléculaire de 229 avec un pic de base à *m/z* 173, soit 30 unités de masse de plus que l'alcaloïde II. La position en 4 du méthoxyle est fixée par comparaison des spectres de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C avec ceux de l'alcaloïde II.

En RMN <sup>1</sup>H, nous remarquons le déplacement à champ faible du proton en 5 (8,14 ppm au lieu de 7,78 ppm) et une résonance à champ fort du proton pyridinique qui doit être situé en position 3. Sur le spectre de RMN <sup>13</sup>C, les déplacements chimiques observés pour les carbones 3, 4, 5 et 9 confirment la localisation en 4 du méthoxyle.

Toutes ces données concordent pour identifier l'alcaloïde VI à la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine.

Ce composé est connu; il a été isolé de *Galipea officinalis* (Mester, 1973), de *Galipea longiflora* (Fournet et al., 1989) au cours d'une première étude phytochimique de cette plante et récemment de *Galipea bracteata* originaire du Brésil (Vieira et Kubo, 1990).

#### ALCALOÏDE VI: 4-MÉTHOXY-2-N-PENTYLOUINOLÉINE

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

227 (4,71), 277 (3,62), 311 (2,68)

Spectre de masse: *m/z* (%)

*M*<sup>+</sup>: 229 (3), 200 (14), 186 (21), 174 (12), 173 (100), 130 (10)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 38

Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 39

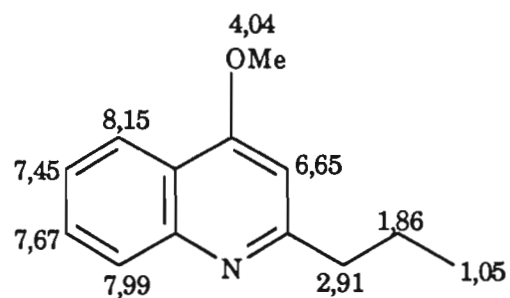


Figure N° 40  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-*n*-propylquinoléine ou  
 Chimanine A (Alcaloïde VII)

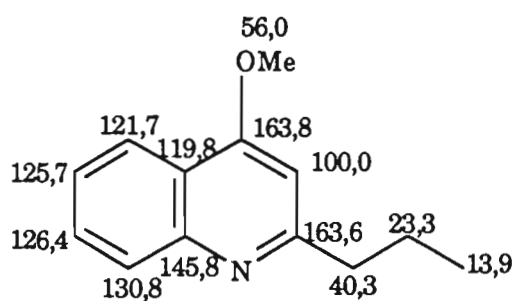


Figure N° 41  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-*n*-propylquinoléine ou  
 Chimanine A (Alcaloïde VII)

### 3.3.7. Alcaloïde VII: 4-méthoxy-2-*n*-propylquinoléine ou Chimanine A

L'alcaloïde VII est isolé à partir des écorces de tronc et représente 2,4% des alcaloïdes totaux. Il est actif *in vitro* à 50 µg.ml<sup>-1</sup> sur les stades extracellulaires de *Leishmania* ssp et de *Trypanosoma cruzi*.

Les spectres de RMN du proton et du carbone-13 (Figures N° 40 et 41) montrent de nombreuses analogies avec ceux des alcaloïdes III et VI.

On observe en effet les signaux caractéristiques d'une 2-alkyl-4-méthoxyquinoléine à des déplacements chimiques sensiblement identiques à ceux de l'alcaloïde VI.

Par contre, les signaux correspondant à la partie aliphatique de la molécule montrent que l'alcaloïde VII possède une chaîne propyle en position 2, comme l'alcaloïde III.

Ces éléments sont renforcés par le spectre de masse qui présente un ion moléculaire à *m/z* 201 et un pic de base à *m/z* 173 obtenu par réarrangement de type rétro- Diels-Alder. Le décalage de 28 unités de masse entre ces ions confirme l'existence du groupe propyle non ramifié en position 2.

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer à l'alcaloïde VII, une structure de 4-méthoxy-2-*n*-propylquinoléine. Ce composé est nouveau, et nous lui donnons le nom de chimanine A, en hommage à nos informateurs Chimanes qui ont contribué à la réalisation de ce travail grâce à leurs précieuses informations.

#### ALCALOÏDE VII: 4-MÉTHOXY-2-N-PROPYLQUINOLÉINE OU CHIMANINE A

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

228 (4,74), 290 (3,81)

Spectre de masse: *m/z* (%)

*M*<sup>+</sup>. 201 (14), 200 (20), 186 (60), 173 (100), 130(51)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 40

Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 41



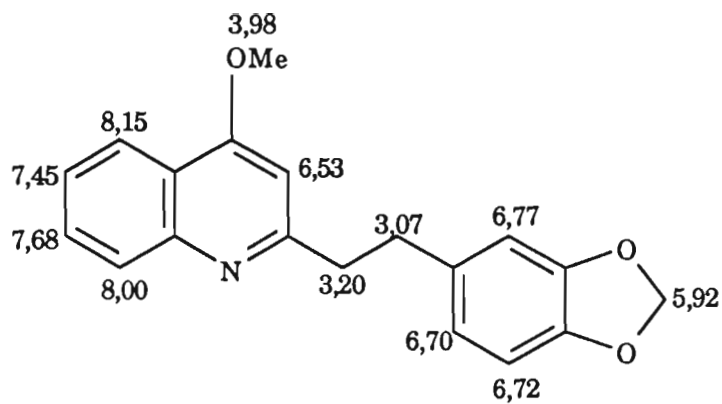


Figure N° 42  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine (Alcaloïde VIII)

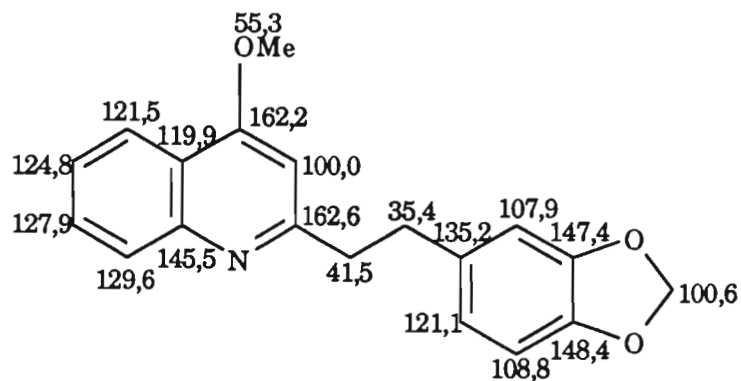


Figure N° 43  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine (Alcaloïde VIII)

### 3.3.8. Alcaloïde VIII: 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine

Cet alcaloïde a été isolé des écorces de tronc (3,1 % des alcaloïdes totaux) et des écorces de racines (2,0 % des alcaloïdes totaux). Il lyse totalement les parasites *in vitro* à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Les spectres de RMN du proton (Figure N° 42) et de RMN <sup>13</sup>C (Figure N° 43) de l'alcaloïde VIII sont très proches de ceux de l'alcaloïde V. Ils présentent entre autres un groupement méthylènedioxy à 5,92 ppm, 3 protons aromatiques entre 6,70 et 6,77 ppm ainsi que deux multiplets de deux protons chacun à 3,20 et 3,07 ppm, l'ensemble correspondant à un groupe 3,4-méthylène dioxy phényl éthyle. On observe par ailleurs tous les signaux caractéristiques d'une 2-alkyl quinoléine substituée par un méthoxyle. La position en 4 de ce dernier est déduite des variations de déplacement chimique des protons en 3 et 5, ainsi que des carbones 3, 4, 5 et 9, par rapport à l'alcaloïde V.

La spectrométrie de masse indique un poids moléculaire de 307 (M<sup>+</sup>, 100 %) de 30 unités de masse supérieur à celui de l'alcaloïde V, la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine.

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'alcaloïde VIII à un composé connu, la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine déjà isolée à partir de *Galipea officinalis* (Meister, 1973) et chez d'autres Rutacées.

#### ALCALOÏDE VIII: 2(3,4-MÉTHYLÈNEDIOXYPHÉNYLÉTHYL)- 4-MÉTHOXY QUINOLÉINE OU CUSPARINE

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

205 (4,66), 228 (4,48), 285 (3,67), 316 (3,45)

Spectre de masse: m/z (%)

M<sup>+</sup>: 307 (100), 306 (56), 292 (41), 186 (36), 159 (24), 135 (32)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 42

Spectre de RMN <sup>13</sup>C: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 43

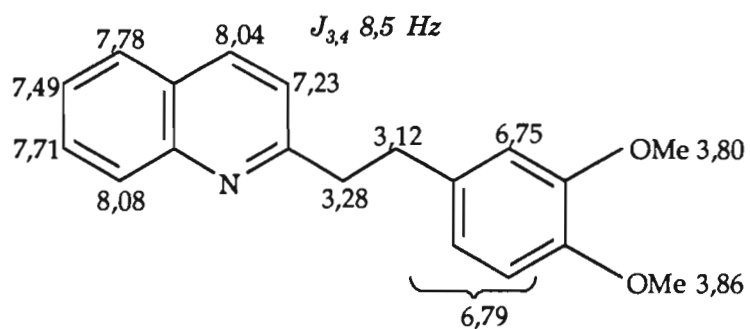


Figure N° 44  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine  
 (Alcaloïde IX)

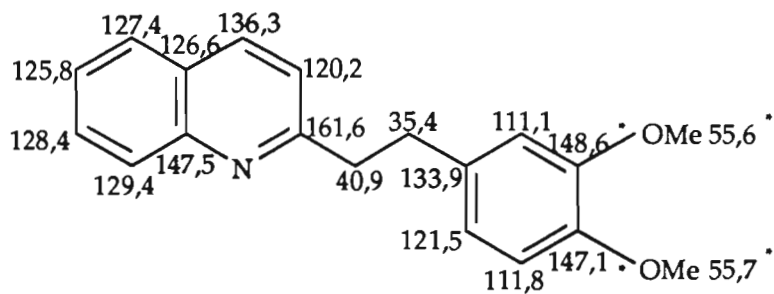


Figure N° 45  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine  
 (Alcaloïde IX)

### 3.3.9. Alcaloïde IX: 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine

L'alcaloïde IX, très minoritaire, a été isolé à partir des écorces de tronc (1,1% des alcaloïdes totaux). Il lyse *in vitro* les promastigotes de leishmanies et les épimastigotes de trypanosomes à 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

L'alcaloïde IX présente de nombreuses analogies structurales avec l'alcaloïde V; en particulier, les spectres de RMN <sup>1</sup>H (Figure N° 44) et de RMN <sup>13</sup>C (figure N° 45) indiquent tous les signaux correspondant à une 2-alkyl quinoléine non substituée en position 4. Nous observons également une ressemblance au niveau du subsistant en 2 (2 groupes méthylènes, 3 protons aromatiques), à la différence près que le signal à 5,94 ppm (2H) du méthylènedioxy est remplacé par deux singulets de 3 protons chacun à 3,80 et 3,86 ppm attribuables à deux méthoxyles. La présence de ces méthoxyles est confirmée par le spectre de RMN <sup>13</sup>C (signaux à 55,6 ppm et 55,7 ppm) et par le spectre de masse sur lequel l'ion moléculaire à *m/z* 293 et l'ion correspondant au groupement benzyle substitué (*m/z* 151, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 100 %) sont décalés de 16 unités de masse par rapport à l'alcaloïde V.

Toutes ces données permettent d'attribuer à l'alcaloïde IX une structure de 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine.

Cette quinoléine a été isolée la première fois lors de l'étude phytochimique de l'extrait éthéro-pétrolique des écorces de tronc de *Galipea longiflora* Kr., récoltées par A. Fournet à Fatima de Chimanes le 8/9/1987 (Fournet et al., 1989).

#### ALCALOÏDE IX: 2(3,4-DIMÉTHOXYPHÉNYLÉTHYL) QUINOLÉINE

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

206 (4,59), 228 (4,57), 256 (3,74), 276 (3,79), 302 (3,58), 315 (3,55)

Spectre de masse: *m/z* (%)

*M*<sup>+</sup>: 293 (81), 292 (40), 278 (36), 156 (15), 152 (10), 151 (100), 129 (11))

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 44

Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 45

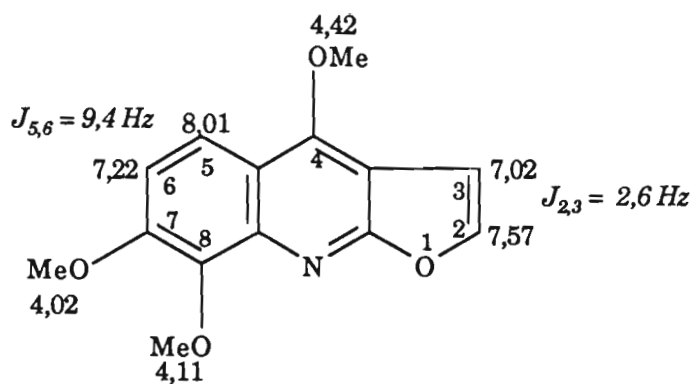


Figure N° 46  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la skimmianine (Alcaloïde X)

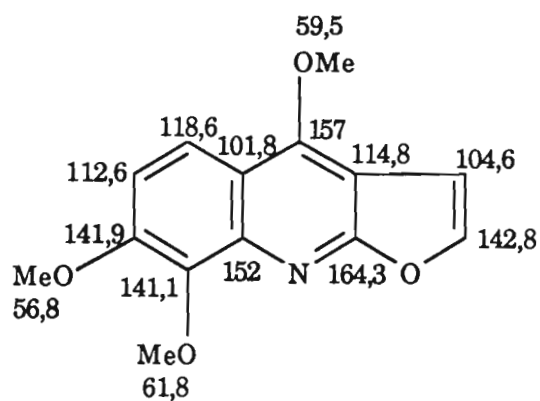


Figure N° 46 bis  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la skimmianine (Alcaloïde X)

### 3.3.10. Alcaloïde X: skimmianine

L'alcaloïde X a été isolé des écorces de racines (4 % des alcaloïdes totaux) et des feuilles (1,7 %). Il lyse les parasites *in vitro* à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure N° 46) indique la présence de 3 groupements méthoxyles aromatiques et l'absence de protons aliphatiques. Les 4 protons aromatiques de la molécule apparaissent sous la forme de 2 systèmes AB, l'un à 7,22 et 8,01 ppm ( $J = 9,4$  Hz), l'autre à 7,02 et 7,57 ppm ( $J = 2,6$  Hz). Cette constante de couplage très faible peut correspondre à un noyau furane, ce qui permet d'envisager pour l'alcaloïde X une structure de furoquinoléine triméthoxylée, compatible avec l'ion moléculaire à  $m/z$  259 observé sur le spectre de masse. Le méthoxyle résonant à 4,42 ppm peut être localisé en *para* de l'azote sur le cycle quinoléique, les deux autres étant situés en 5, 6 ou 7, 8. En comparant les déplacements chimiques des protons benzéniques à ceux des furoquinoléines mono méthoxylées en 6 ou 7, le proton à 7,22 ppm peut être localisé en 6 et donc les méthoxyles en 7 et 8. Le méthoxyle à champ fort (4,02 ppm) est situé en position 7 car il présente une tache de corrélation (COSY 45°) avec le proton en 6 à 7,22 ppm.

L'alcaloïde X est donc une furo (2,3-*b*) quinoléine triméthoxylée en 4, 7 et 8. Ses données spectrales sont identiques à celles de la skimmianine ( Ahond et al., 1978), molécule souvent isolée des Rutacées et déjà identifiée lors de la première étude phytochimique de *Galipea longiflora* Kr. (Fournet et al., 1989).

#### ALCALOÏDE X: SKIMMIANINE

*Cristaux blancs (Méthanol) F = 181 ° C*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

250 (4,61), 322 (3,80), 332 (3,65)

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ · 259 (66), 258 (30), 244 (100), 242 (16), 230 (73), 229 (33), 228 (36), 216 (44), 215 (27), 213 (55), 201 (43), 199 (25).

Spectre de RMN<sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 46

Spectre de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 46 bis

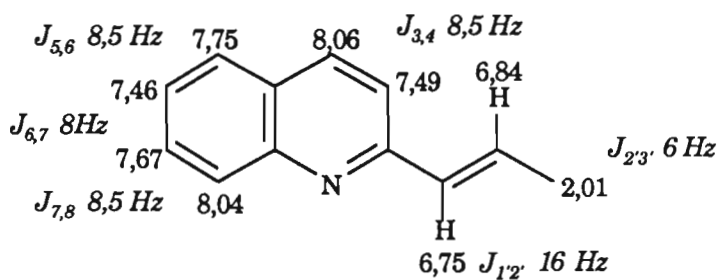


Figure N° 47  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(*E*)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine B  
 (Alcaloïde XI)

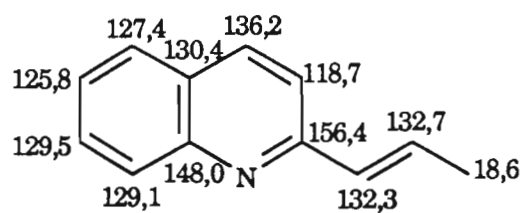


Figure N° 48  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(*E*)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine B  
 (Alcaloïde XI)

### 3.3.11. Alcaloïde XI: 2-(E)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine B

L'alcaloïde se rencontre seulement dans les feuilles dans lesquelles il représente 16,7% des alcaloïdes totaux. Il est actif *in vitro* sur *Leishmania* ssp. au stade promastigote et *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote à la concentration de 25 µg.ml<sup>-1</sup>.

L'alcaloïde XI possède 2 unités de masse de moins que l'alcaloïde III et ne présente pas le fragment à M-28 (100 %) correspondant au réarrangement de type rétro-Diels-Alder, ce qui laisse supposer une oxydation de la chaîne propyle en 1, 2 ou 2, 3.

Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure N° 47) on observe les 6 protons du noyau quinoléique, en particulier les 2 protons du cycle pyridinique qui apparaissent à 7,49 et 8,06 ppm sous la forme de deux doublets avec une constante de couplage de 8,5 Hz, ce qui permet de les situer sur les carbones 3 et 4. La molécule est donc substituée en 2, et présente les signaux caractéristiques d'une chaîne propényle, à 6,75 ppm (1H, d, J = 16 Hz), 6,84 ppm (1H, qd, J = 6 et 16 Hz) et 2,01 ppm (3H, d, J = 6 Hz). La constante de couplage de 16 Hz entre les protons 1' et 2' prouve une configuration "trans" de la double liaison.

L'alcaloïde XI est donc la 2-propénylquinoléine, déjà obtenue par synthèse (Ishikura et al., 1985) mais incomplètement décrite. Sa structure est confirmée par la RMN <sup>13</sup>C (Figure N° 48), les déplacements chimiques de tous les carbones protonés ayant été attribués sans ambiguïté par corrélation hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et avec découplage des protons (séquence XHCORR-D).

C'est la première fois que la 2-(E)-prop-1'-énylquinoléine est isolée à l'état naturel, nous lui attribuons le nom de chimanine B.

#### ALCALOÏDE XI: 2-(E)-PROP-1'-ÉNYLQUINOLÉINE OU CHIMANINE B

##### Huile

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

216 (4,38), 250 (4,50), 285 (3,84)

Spectre de masse: m/z (%)

M<sup>+</sup>: 169 (49), 168 (100), 143 (27), 129 (66), 128 (44)

Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 47

Spectre de RMN <sup>13</sup>C: (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 48



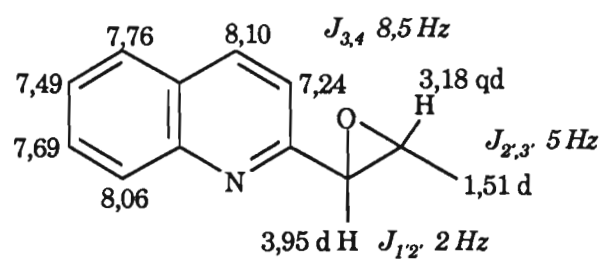


Figure N° 49  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(1',2'-*trans*-époxypropyl) quinoléine ou  
 chimanine D (Alcaloïde XII)

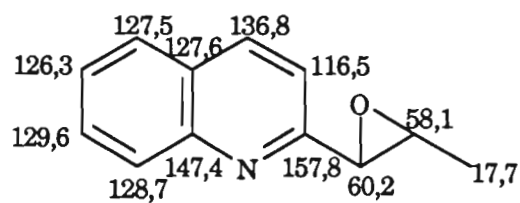


Figure N° 50  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 2-(1',2'-*trans*-époxypropyl) quinoléine ou  
 chimanine D (Alcaloïde XII)

### 3.3.12. Alcaloïde XII: 2-(1',2'-*trans*-époxypropyl)quinoléine ou chimanine D.

Cet alcaloïde a été isolé des feuilles dans lesquelles il représente 1,7 % des alcaloïdes totaux. Il lyse *in vitro* les leishmanies et les trypanosomes à la concentration de 50 µg.ml<sup>-1</sup>.

Les spectres de RMN du proton et du carbone-13 de l'alcaloïde XII (Figures N° 49 et 50) sont quasiment superposables à ceux de l'alcaloïde III dans la partie aromatique, ce qui permet de proposer une structure de 2-alkyl quinoléine. Le spectre de RMN <sup>13</sup>C présente en outre un méthyle qui résonne à 17,7 ppm et deux carbones tertiaires à 58,1 et 60,2 ppm, ce qui laisse envisager la présence d'un groupement époxyde en 1, 2 sur la chaîne propyle. Cette hypothèse est confirmée par le spectre de RMN du proton qui présente un groupe méthyle à champ faible (1,51 ppm) résonnant sous forme de doublet et deux protons à 3,95 ppm (*d*, *J* = 2 Hz) et 3,18 ppm (*qd*, *J* = 5 et 2 Hz) géminés à l'époxyde. Ces attributions ont été confirmées par irradiations sélectives des différents signaux. D'autre part, une corrélation hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a permis de fixer avec certitude les attributions de tous les carbones protonés de la molécule. Il faut noter que les déplacements chimiques des carbones 6 et 7 doivent être inversés par rapport aux valeurs publiées pour la 2-*n*-pentylquinoléine (Vieira et Kubo, 1990).

La spectrométrie de masse confirme la structure de cet époxyde avec un ion moléculaire à *m/z* 185. La présence de l'époxyde se traduit par la disparition de l'ion correspondant au réarrangement de type rétro-Diels-Alder et par l'apparition de 2 ions intenses à *m/z* 129 (91 %) et 128 (100 %) correspondant à une rupture entre la quinoléine et le groupe époxyde avec ou sans transfert d'hydrogène. La stéréochimie de l'époxyde est fixée par RMN du proton grâce à la constante de couplage de 2 Hz entre les protons 1' et 2' qui prouve leur position en "trans", qui résulte à l'évidence d'une oxydation de la double liaison "trans" de la chimanine B.

L'alcaloïde XII est donc un alcaloïde nouveau, la 2-(1',2'-*trans*-époxypropyl) quinoléine que nous appelons, la chimanine D.

#### ALCALOÏDE XII: 2-(1,2-TRANS -ÉPOXYPROPYL)QUINOLÉINE OU CHIMANINE D

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

207 (4,53), 234 (4,56), 281 (3,54)

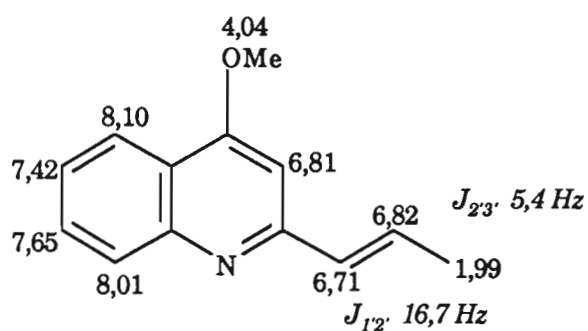


Figure N° 51  
 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-(E)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine C (Alcaloïde XIII)

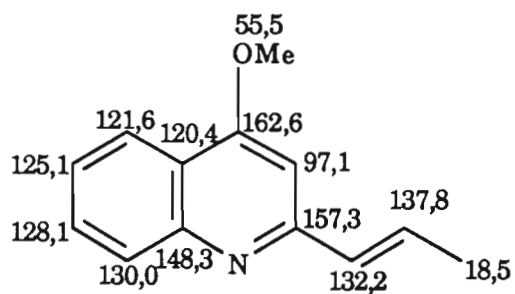


Figure N° 52  
 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-méthoxy-2-(E)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine C (Alcaloïde XIII)

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ : 185 (39), 170 (81), 169 (78), 157 (46), 156 (49), 129 (91), 128 (100)

Spectre de RMN  $^1H$ : (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 49

Spectre de RMN  $^{13}C$ : (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 50

### 3.3.13. Alcaloïde XIII: 4-méthoxy-2-(E)-prop-1-énylquinoléine ou chimanine C.

Cet alcaloïde n'a pas été isolé à La Paz par guidage biologique. Il a été détecté sur un spectre de RMN du proton au cours de la purification d'une fraction intermédiaire contenant les chimanines B et D. Il n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation de son activité biologique sur les leishmanies et les trypanosomes. Il a été isolé à partir des feuilles; une trentaine de milligrammes a été obtenue, soit environ 0,5 % des alcaloïdes totaux des feuilles.

L'alcaloïde XIII présente des données spectrales analogues à celles des alcaloïdes XI et VII. Il possède un méthoxyle en position 4, mis en évidence par le déplacement chimique du proton 5 à 8,10 ppm et une chaîne propènyle sur le carbone 2. La configuration "trans" de la double liaison est prouvée par la constante de couplage de 16,7 Hz entre les protons 1' et 2'.

Il s'agit donc de la 4-méthoxy-chimanine B ou 4-méthoxy-2-(E)-prop-1-énylquinoléine. Ce composé est nouveau et nous lui donnons le nom de chimanine C.

ALCALOÏDE XIII: 4-MÉTHOXY-2-(E)-PROP-1'-ÉNYLQUINOLÉINE OU CHIMANINE C

*Huile*

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

249 (4,47), 257 (4,43), 291 (3,87)

Spectre de masse (IC, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  (%)

$M^+$  C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup> 228 (36), MH<sup>+</sup> 200 (100), M<sup>+</sup> 199 (35)

Spectre de RMN  $^1H$ : (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 51

Spectre de RMN  $^{13}C$ : (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 52

### 3.3.14. Discussion sur la composition alcaloïdique de *Galipea longiflora* Kr.

Treize alcaloïdes ont été identifiés à partir de tous les organes de *Galipea longiflora* Kr. Tous ces alcaloïdes sont de type quinoléine substituée en 2 par des chaînes alkyles ou aryles. Douze alcaloïdes ont été isolés par guidage biologique à partir des écorces de tronc, des écorces de racines et des feuilles du lot A.F. 850 récolté le 6/8/88 dans les forêts primaires de Fatima de Chimanes. Six quinoléines sont communes avec celles isolées précédemment à partir du lot A.F. 790 (Fournet et al., 1989) pour lequel la composition alcaloïdique a été étudiée de "manière phytochimique", ce qui n'a pas été le cas avec le lot A.F. 850.

En comparant la composition qualitative en alcaloïdes des deux lots de *Galipea longiflora* Kr. étudiés, il apparaît que les quinoléines avec une chaîne styrényle ou pentényle n'ont pas été mises en évidence dans le lot A.F. 850, de même qu'aucune quinoléine substituée en 2 par une chaîne propyle n'a été isolée à partir du lot A.F. 790.

Dans ce travail, quatre quinoléines nouvelles ont été isolées, les chimanines A, B, C et D, toutes substituées en 2 par une chaîne propylique. La chimanine B, la 2-(E)-prop-1'-énylquinoléine, est nouvelle à l'état naturel, mais était connue de synthèse (Ishikura et al., 1985).

La présence de quinoléines substituées en 2 n'est pas très courante dans la nature. Ces dérivés semblent être une caractéristique chimiotaxonomique de la famille des Rutacées et en particulier du genre *Galipea*. L'étude récente d'un *Galipea* brésilien, *Galipea bracteata* (Vieira et Kubo, 1990) confirmerait cette particularité chimiotaxonomique.

Les fruits et les graines de *Galipea longiflora* Kr. ont fait l'objet d'une étude préliminaire sans donner aucun résultat positif sur les parasites *in vitro*. Pour cette raison, ces extraits n'ont pas été étudiés.

<sup>1</sup> *Leishmania braziliensis*

<sup>2</sup> *Leishmania amazonensis*

<sup>3</sup> *Leishmania donovani*

Numéros et noms des alcaloïdes	Concentration inhibant 90% des parasites en µg.ml <sup>-1</sup> (IC <sub>90</sub> )				
	<i>L. b.</i> <sup>1</sup> (2903)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> (PH 8)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> (H-142)	<i>L.d.</i> <sup>3</sup> (2682)	<i>L.d.</i> <sup>3</sup> (HS70)
I 2-phénylquinoléine	100	100	100	100	100
II 2- <i>n</i> -pentylquinoléine	100	100	100	100	100
III 2- <i>n</i> -propylquinoléine	50	50	50	50	50
IV 4-méthoxy-2-phénylquinoléine	50	50	50	50	50
V 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine	100	100	100	100	100
VI 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	100	100	100	100	100
VII Chimanine A	100	100	100	100	100
VIII Cusparine	100	100	100	100	100
IX 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine	100	100	100	100	100
X Skimmianine	100	100	100	100	100
XI Chimanine B	25	25	25	25	25
XII Chimanine D	25	25	25	25	25

#### Médicaments de référence

Pentamidine	1	1	1	1	1
Antimoniote de méglumine ou Glucantime <sup>R</sup>	>100	>100	>100	>100	>100

Tableau N° 3.2

Inhibition de la croissance de plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote, après 48h de contact avec douze quinoléines isolées à partir de *Galipea longiflora* Kr. et deux médicaments de référence, la pentamidine et l'antimoniote de méglumine

### 3.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES AVEC LES QUINOLEINES DE *GALIPEA LONGIFLORA* KR.

#### 3.4.1. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote

Toutes les quinoléines isolées sont actives *in vitro* sur les cinq souches de promastigotes de leishmanies à la concentration de  $100\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Tableau N° 3.2).

L'espèce de *Leishmania* ssp. n'influe pas sur l'activité des produits. Ceci avait déjà été observé lors des essais préliminaires de criblage avec les extraits totaux de plantes. Cette activité biologique non sélective des quinoléines est peut-être dûe au fait que les tests sur le stade promastigote des leishmanies reflètent plus une toxicité qu'une véritable activité leishmanicide.

Malgré tout, il apparaît que quelques quinoléines sont plus toxiques que d'autres, notamment les chimanines B et D qui inhibent complètement toutes les espèces de leishmanies à  $25\mu\text{g.ml}^{-1}$  et à un degré moindre la 2-*n*-propylquinoléine et la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine à  $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Trois de ces quinoléines sont substituées en 2 par une chaîne propyle.

Ces essais sur la forme de culture au stade promastigote des leishmanies donnent une idée de l'activité. Celle-ci doit être confirmée par des essais sur le stade intracellulaire du parasite, l'amastigote, soit par le modèle *in vitro* cellule-hôte infectée par les parasites (macrophages ou lignées cellulaires de macrophages), soit *in vivo* par l'infection d'animaux de laboratoire par les leishmanies et ensuite l'administration d'un traitement pour ralentir l'infection parasitaire.

Toutes les quinoléines testées sont plus actives que l'antimoniote de méglumine et moins actives que la pentamidine. Ces deux médicaments ont un comportement radicalement différent sur les parasites. Le premier ne lyse pas les promastigotes, mais il est actif sur les amastigotes et sa cytotoxicité sur les cellules hôtes est très faible. En revanche, la pentamidine est active sur les promastigotes, les amastigotes, mais est cytotoxique (Torrès Guerrin, 1986).

Il faut attendre les résultats des essais sur les amastigotes ou les essais *in vivo* sur les souris Balb/c pour savoir dans quelle catégorie se rangeront les quinoléines isolées à partir de *Galipea longiflora* Kr.

Alcaloïdes	Souches de <i>L. amazonensis</i>	Concentration en alcaloïdes $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Viabilité cellulaire des macrophages. % vivants	% amastigotes survivants (Indice de Survie)
I 2-phénylquinoléine	PH 8	100	100	59
		50	100	79
II 2- <i>n</i> -pentylquinoléine	PH 8	100	16	82
		50	31	
III 2- <i>n</i> -propylquinoléine	PH 8	100	38	
		50	65	
IV 4-méthoxy-2-phénylquinoléine	PH 8	100	86	100
		50	100	100
V 2-(3,4-méthylène dioxypényléthyl) quinoléine	PH 8	100	92	61
		50	93	100
VI 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	PH 8	100	58	85
		50	81	100
		10	90	100
VII Chimanine A	PH 8	100	32	81
		50	54	100
VIII Cusparine	PH 8	100	83	
		50	89	
X Skimmianine	PH 8	100	72	40
		50	100	55
		10	100	100
Glucantime <sup>R</sup>	PH 8	100	65	0
		10	85	11
		1	100	

Tableau N° 3.3

Activité biologique *in vitro* et cytotoxicité de quelques alcaloïdes isolés du *Galipea longiflora* Kr. sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c



### 3.4.2. Activité biologiques *in vitro* de quelques quinoléines sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c.

Les résultats obtenus sur l'activité biologique *in vitro* de quelques quinoléines sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c sont décevants, non significatifs et incomplets.

Plusieurs raisons peuvent expliquer la faillite de ce modèle à La Paz à l'IBBA. La raison majeure est le manque apparent de fiabilité de ce modèle lorsqu'il est réalisé à 3500 m d'altitude où la pression atmosphérique est de 520 mm de mercure, sans que nous ayons réellement prouvé les effets négatifs de l'altitude sur la viabilité et la croissance des cellules. Pendant deux ans, plusieurs personnes de l'IBBA, certes manquant d'expérience de la culture cellulaire, ou extérieures à cet institut, possédant l'expérience de ces expérimentations sur les cultures de cellules, ont essayé de mettre au point cette technique dans notre laboratoire, sans jamais y parvenir réellement. Tous les facteurs pouvant nuire à la survie des cellules et des parasites ont été modifiés, mélanges gazeux spécialement dosés en oxygène et en azote, recherche du pourcentage idéal de gaz carbonique, adaptation de plusieurs milieux de culture, etc...

Une autre raison, inhérente au modèle lui-même, c'est son manque de reproductibilité et de fiabilité dû aux nombreuses manipulations, notamment un comptage au microscope d'un grand nombre de lames qui engendre une fatigue visuelle source d'erreurs humaines considérables.

Il a été tenté de remplacer les macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c par des lignées de macrophages humains U 937. Cette technique a été mise au point par S. Martinez et J.J. Marr (Martinez et al., 1988) aux Etats-Unis et est utilisée en routine dans de nombreux laboratoires. Jamais nous n'avons pu obtenir une croissance régulière des cellules.

Des résultats obtenus (Tableau N°3.3), il est impossible de tirer un enseignement sur l'activité des quinoléines isolés de *Galipea longiflora* Kr. sur *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant les macrophages de souris Balb/c. Très peu de quinoléines paraissent cytotoxiques pour les macrophages sauf peut-être, la 2-*n*-propylquinoléine et la chimanine A. La 2-*n*-pentylquinoléine inhibe plus de 50 % de parasites à une concentration inférieure à 50 µg ml<sup>-1</sup> et la skimmianine à 100 µg.ml<sup>-1</sup>; ce sont les seules informations que nous puissions tirer de ces essais. Il est dommage que les alcaloïdes III, XI et XII n'aient pu être expérimentés sur ce modèle car ils se sont révélés les plus actifs

Nombre de souris par lot expérimental	6
Mode d'inoculation	Par voie intrapéritonéale
Conc. max.	400 mg
Conc. min	12,5 mg
Raison de la progression	2

Temps d'observation des souris	Calcul de la DL50
2 h	>400 mg.kg <sup>-1</sup>
24 h	>400 mg.kg <sup>-1</sup>
48 h	>400 mg.kg <sup>-1</sup>
72 h	>400 mg.kg <sup>-1</sup>

Tableau N° 3.4

Conditions opératoires pour évaluer la toxicité aiguë (DL<sub>50</sub>) sur des souris Balb/c des quinoléines isolées de *Galipea longiflora* Kr.

sur les leishmanies au stade promastigote.

Ces échecs répétés nous ont amenés à focaliser les essais biologiques sur le modèle animal souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8 ou H-142) et sur *L. venezuelensis* (H-3) au stade amastigote.

### 3.4.3. Mesure de la toxicité (DL<sub>50</sub>) des alcaloïdes I à XII

Les douze quinoléines isolées du *Galipea longiflora* Kr. ont toutes la même toxicité sur les souris Balb/c. Cette toxicité est exprimée par la DL<sub>50</sub> mesurée dans les conditions mentionnées dans le tableau N° 3.4.

Les alcaloïdes quinoléiques isolés de *Galipea longiflora* Kr. sont très peu toxiques sur les souris Balb/c et laissent une marge thérapeutique importante pour effectuer les traitements. Nous n'avons pas essayé d'inoculer 800 mg.kg<sup>-1</sup> ou 1600 mg.kg<sup>-1</sup> par crainte de ne pouvoir disposer des quantités nécessaires à la réalisation de tous les essais biologiques *in vivo* et *in vitro* envisagés.

#### 3.4.4. Essais biologiques *in vivo* des quinoléines isolées de *Galipea longiflora* sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142 ou PH8) ou de *L. venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

Les quantités de produit obtenues à l'issue de chaque séparation des alcaloïdes du *Galipea longiflora* Kr. sont variables. Pour les alcaloïdes majoritaires, plusieurs protocoles ont pu être effectués en modifiant les conditions opératoires, telles que:

- l'emploi de souches différentes de *L. amazonensis* (PH8 et H-142) et de l'espèce *L. venezuelensis* (H-3),
- modification de la voie d'inoculation du médicament, par voie générale en sous cutanée ou localement au niveau de la patte infectée,
- variation de la durée du traitement, 14 jours consécutifs en sous cutanée par voie générale, ou en dose unique 14 jours après l'infection parasitaire pour les traitements locaux.

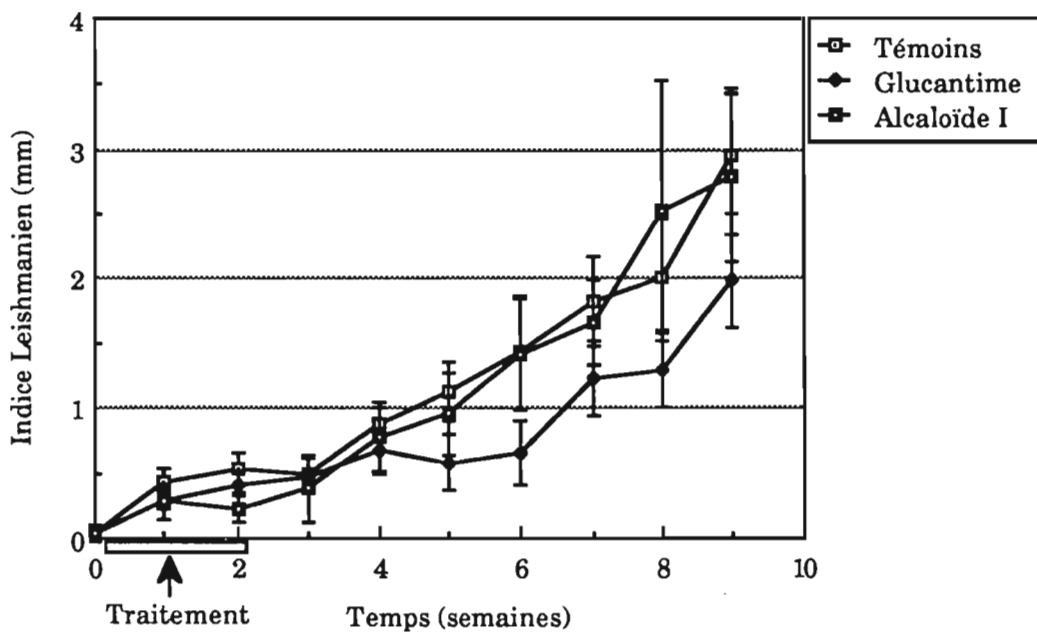
Avec les produits minoritaires, la réalisation de plusieurs protocoles a été plus difficile.

A chaque inoculation de médicament, le volume d'injection est de 200 µl.

Pour tous les essais sur le modèle animal, sont employées des souris Balb/c provenant de chez Charles Rivers, USA, puis élevées à l'IBBA à La Paz. Cette race de souris répond particulièrement bien aux infections par des protozoaires tels que les *Leishmania ssp* et *Trypanosoma cruzi*.

Le diamètre de la lésion provoquée par les leishmanies au stade amastigote, est calculé en effectuant la différence des mesures en mm, de l'épaisseur de la patte arrière infectée avec celle de la patte arrière non-infectée. Le résultat de cette soustraction donne l'Indice Leishmanien (IL).

Pour chaque protocole la moyenne arithmétique des IL est calculée, ainsi que l'intervalle de confiance de la moyenne observée.



Courbe N°3.1

Activité de la 2-phénylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.1 Alcaloïde I : la 2-phénylquinoléine

C'est le produit majoritaire que nous retrouvons dans tous les organes de *Galipea longiflora* Kr.. Plusieurs protocoles ont pu être réalisés avec la 2-phénylquinoléine.

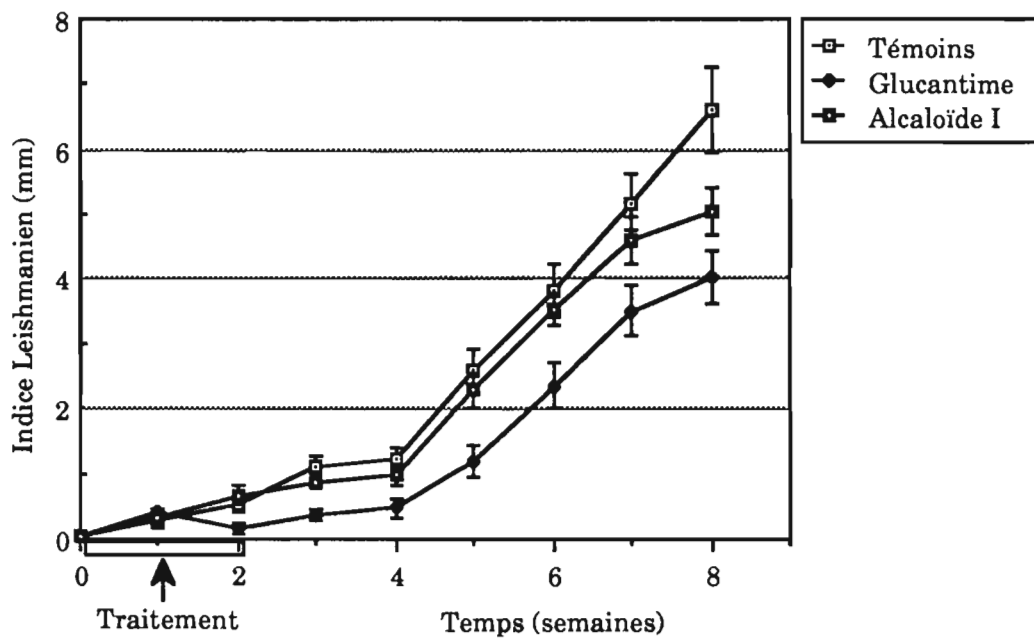
#### 3.4.4.1.1. Activité biologique *in vivo* de la 2-phénylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N°3.1)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	24 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$2,5 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Le protocole avec infection des souris Balb/c par *L. amazonensis* (H-142) a dû être prolongé d'une semaine (voir courbe N°3.1). Les écarts entre les Indices Leishmaniens des lots expérimentaux, témoins, Glucantime<sup>R</sup> et 2-phénylquinoléine n'étaient pas assez importants pour pouvoir tirer des enseignements. L'écart en fin de protocole entre la moyenne de l'Indice Leishmanien du lot expérimental Glucantime<sup>R</sup> et du lot "témoin" est à peine d'un millimètre, ce qui est peu en comparaison des écarts obtenus lors des expérimentations avec une infection des souris par *L. amazonensis* (PH8) et *L. venezuelensis* (H-3). Les souris ont été infectées par  $2,5 \times 10^6$  amastigotes c'est à dire 2,5 fois plus de parasites que lors d'une infection avec la souche PH8 de *L. amazonensis*.

Au cours de cette expérimentation, les souris traitées par la 2-phénylquinoléine ont accusé une perte de poids visible à la 5<sup>ème</sup> semaine. A la 7<sup>ème</sup> semaine, ces souris avaient récupéré le poids perdu et présentaient un



Courbe N° 3.2

Activité de la 2-phénylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

aspect normal. Pendant le traitement avec la 2-phénylquinoléine il est apparu un effet nécrosant du produit à l'endroit de l'injection. Cette nécrose disparaissait à l'arrêt du traitement. Cette réaction inflammatoire est probablement provoquée par la forte concentration de produit qui donne un aspect de "mayonnaise" à la préparation, pas toujours facile à administrer. La 2-phénylquinoléine se présente sous la forme de cristaux difficile à incorporer dans l'excipient, le Tween 80.

Le prolongement de l'expérimentation à 9 semaines *post*-infection parasitaire a permis d'obtenir des diamètres de lésion de l'ordre de 3 mm environ chez les souris des lots "témoins" parasites et traitées par la 2-phénylquinoléine.

En conclusion la 2-phénylquinoléine ne ralentit pas après 9 semaines de protocole, la croissance des lésions provoquées par l'infection de *L. amazonensis* (H-142) au stade amastigote chez des souris Balb/c. Ce résultat n'est pas significatif, et les écarts de mesure entre les lots de souris témoins et celui des souris traitées avec le médicament de référence sont trop faibles pour pouvoir être interprétés d'un point de vue statistique.

#### 3.4.4.1.2. Activité biologique *in vivo* de la 2-phénylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N°3.2)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	22 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures <i>post</i> infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La croissance des lésions chez les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine est pratiquement la même que celles des souris du lot



"témoin", avec un léger ralentissement de cette croissance à la 8<sup>ème</sup> semaine chez les souris traitées avec cette quinoléine.

En général, les Indices Leishmaniens (IL) observés chez toutes les souris infectées par la souche PH8 sont plus importants à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine que ceux mesurés dans les mêmes conditions chez les souris infectées par la souche H-142 de *L. amazonensis* à la 9<sup>ème</sup> semaine (fin du protocole précédent). Cela indique une plus grande virulence de la souche PH8, qui permet d'observer des écarts plus importants entre les divers lots expérimentaux, et par conséquent de détecter une activité leishmanicide d'un produit.

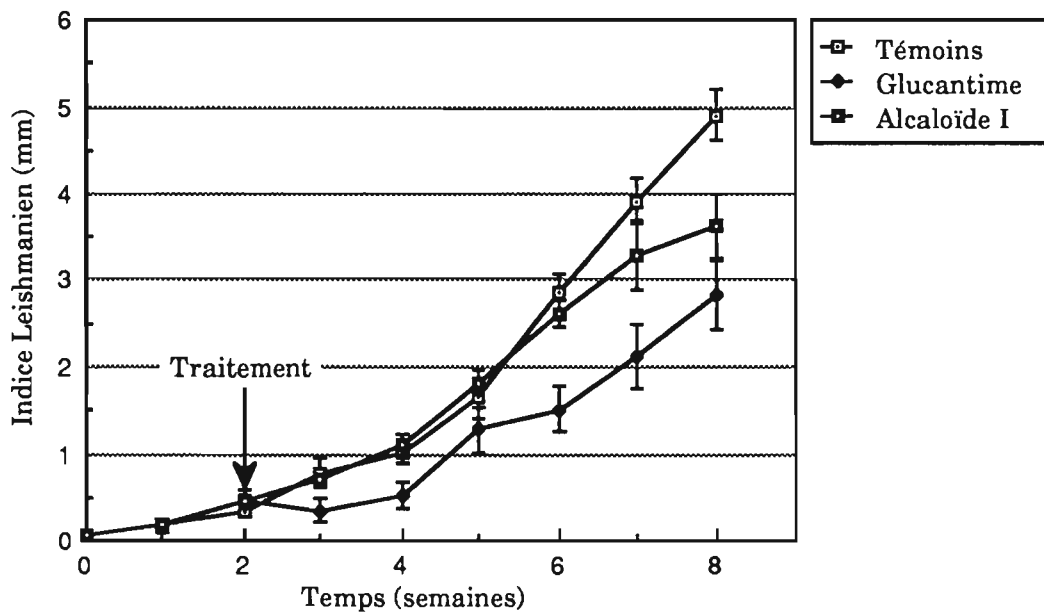
La croissance des granulomes est très rapide chez toutes les souris à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, de l'ordre d'un millimètre en une semaine. Au cours de ce protocole, les mêmes effets secondaires que lors du protocole précédent ont été observés chez les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine, nécroses aux points d'injection du produit, amaigrissement et récupération du poids perdu en fin d'expérimentation.

Bien qu'en fin de protocole, les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine se retrouvent avec un IL inférieur d'un millimètre à celui mesuré chez les souris du lot témoin, il est difficile de conclure que la 2-phénylquinoléine ralentisse de *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote.

#### 3.4.4.1.3. Activité biologique *in vivo* de la 2-phénylquinoléine administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N°3.3)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	18-20 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$400 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$



Courbe N° 3.3

Activité de la 2-phénylquinoléine ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

En réalisant cette expérimentation avec injection des médicaments au niveau de l'infection parasitaire, nous avons voulu nous mettre dans des conditions expérimentales ressemblant à celles employées en médecine traditionnelle par les Indiens Chimanes, c'est à dire l'application locale de la plante sur la lésion. La 2-phénylquinoléine est de loin l'alcaloïde majoritaire, à tel point que nous pouvons observer sur les écorces sèches de racines et de tronc de *Galipea longiflora* Kr. des cristaux de ce composé. Il n'est pas déraisonnable de penser qu'il doit jouer un rôle important lors de l'application des écorces fraîches sur les lésions. Il semble être responsable de la sensation de chaleur lors du traitement local.

Pour ces essais, les concentrations de médicament sont doublées, 400 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour le Glucantime<sup>R</sup> et 200 mg kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour la 2-phénylquinoléine. Le traitement s'effectue 14 jours après l'infection parasitaire.

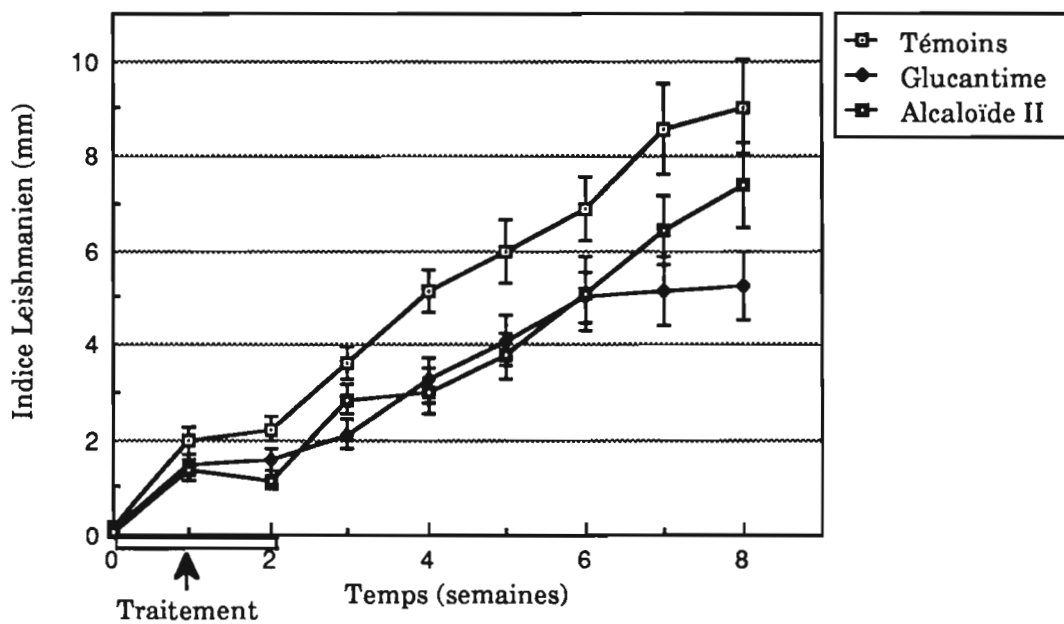
Deux semaines après le traitement (4<sup>ème</sup> semaine), la croissance des lésions est très faible chez toutes les souris, de l'ordre d'un millimètre chez les souris témoins infection et chez les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine, et de 0,5 mm en moyenne chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (voir courbe N°3.3).

A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, il se produit un fort accroissement hebdomadaire de l'Indice Leishmanien (IL) chez les souris témoins et les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine (1 mm par semaine). Dans le même temps, cette augmentation est deux fois moins importante chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris témoins est supérieur d'un millimètre environ (4,9 mm) à l'IL des souris traitées avec l'alcaloïde I (3,7 mm). L'IL des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> est inférieur d'un millimètre (2,7 mm) à celui des souris traitées avec la 2-phénylquinoléine. Les écarts type de ces deux dernières mesures se chevauchent légèrement en fin de protocole.

Deux explications possibles à cet infléchissement de la courbe des IL des souris traitées avec la 2-phénylquinoléine; un début d'ulcération des lésions ou bien un possible effet retard de cette dernière provoquée par une lente résorption de la 2-phénylquinoléine.

A la lumière de deux derniers essais (courbes N° 3.2 et 3.3), l'activité de la 2-phénylquinoléine sur les leishmanies au stade amastigote est notable mais assez faible par rapport au médicament de référence. La forte teneur en 2-phénylquinoléine (20 g.kg<sup>-1</sup>) dans les écorces de tronc doit être un facteur non négligeable d'activité des écorces de *Galipea longiflora* Kr., lorsqu'elles sont appliquées directement sur les lésions d'espundia.



Courbe N° 3.4

Activité de la 2-*n*-pentylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.2. Alcaloïde II: la 2-*n*-pentylquinoléine

#### 3.4.4.2.1. Activité biologique *in vivo* de la 2-*n*-pentylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N°3.4)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	20 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Au cours de cette expérimentation les moyennes des Indices Leishamniens (IL) étaient dans l'ensemble supérieures à celles observées lors des autres protocoles, 9 mm pour les souris témoins. La forte croissance des lésions serait due à l'infection des souris par un culot d'amastigotes souillé de débris cellulaires accompagnant les parasites lors de la séparation par centrifugation. En effet lorsque le culot d'amastigotes est très propre, le développement des lésions est moins rapide et moins important. Ce phénomène se rencontre chez les malades lorsque les plaies sont surinfectées, la taille de la lésion augmente très rapidement.

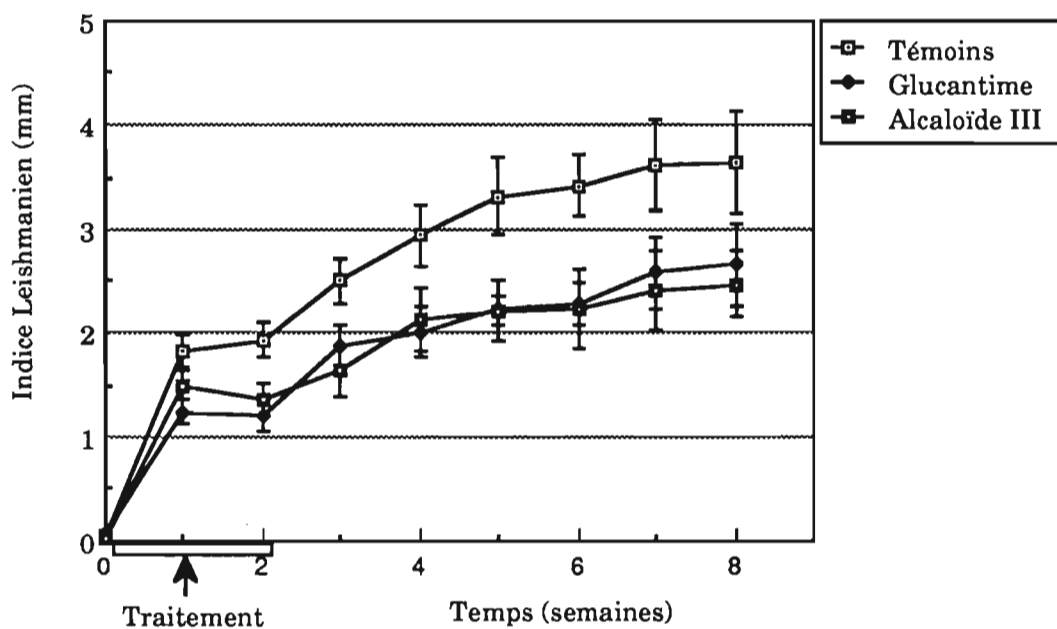
Les souris traitées avec la 2-*n*-pentylquinoléine ne présentaient aucun effet secondaire apparent, sinon une inflammation locale pendant le traitement. Cet effet indésirable disparaît dans un délai d'une semaine après l'arrêt du traitement.

Pendant les six premières semaines, l'IL des souris traitées avec l'alcaloïde II est pratiquement le même que celui mesuré chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Entre la 3<sup>ème</sup> semaine et la 6<sup>ème</sup> semaine, l'écart entre l'IL des souris traitées et l'IL des souris témoins infection se maintient à 2 mm (voir courbe N°3.4).

L'activité leishmanicide de la 2-*n*-pentylquinoléine tend à s'estomper au cours des deux dernières semaines de l'expérimentation. L'IL à la 8<sup>ème</sup> semaine des souris traitées avec la 2-*n*-pentylquinoléine est inférieur de 1,6 mm à celui des souris témoins et supérieur de 2 mm à celui des souris traitées avec le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>.

Finally, the 2-*n*-pentylquinoline appears active on the amastigotes during the six first weeks of the experimentation. This result would confirm the activity observed during the biological assays *in vitro* on *Leishmania amazonensis*, (PH8) at the amastigote stage. During these assays, 16 % and 31 % of the amastigotes survived at concentrations of 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  of 2-*n*-pentylquinoline. It is a pity that the activity of this quinoline decreased very strongly during the last two weeks of the experimentation. It would be without doubt possible to improve the therapeutic action of the 2-*n*-pentylquinoline by slightly increasing the concentration of this product during the treatments to 125 or 150  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

Due to a insufficient quantity of 2-*n*-pentylquinoline, it was impossible to perform other experimental protocols which could have confirmed the activity of this product on other species of leishmanias or strains of *L. amazonensis* and in other experimental conditions.



Courbe N° 3.5

Activité de la 2-*n*-propylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée *Galipea longiflora* Kr., et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.3. Alcaloïde III: la 2 -*n*-propylquinoléine

#### 3.4.4.3.1. Activité biologique *in vivo* de la 2-*n*-propylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par les souches H-142 et PH8 de *Leishmania amazonensis* au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbes N°3.5.et 3.6.)

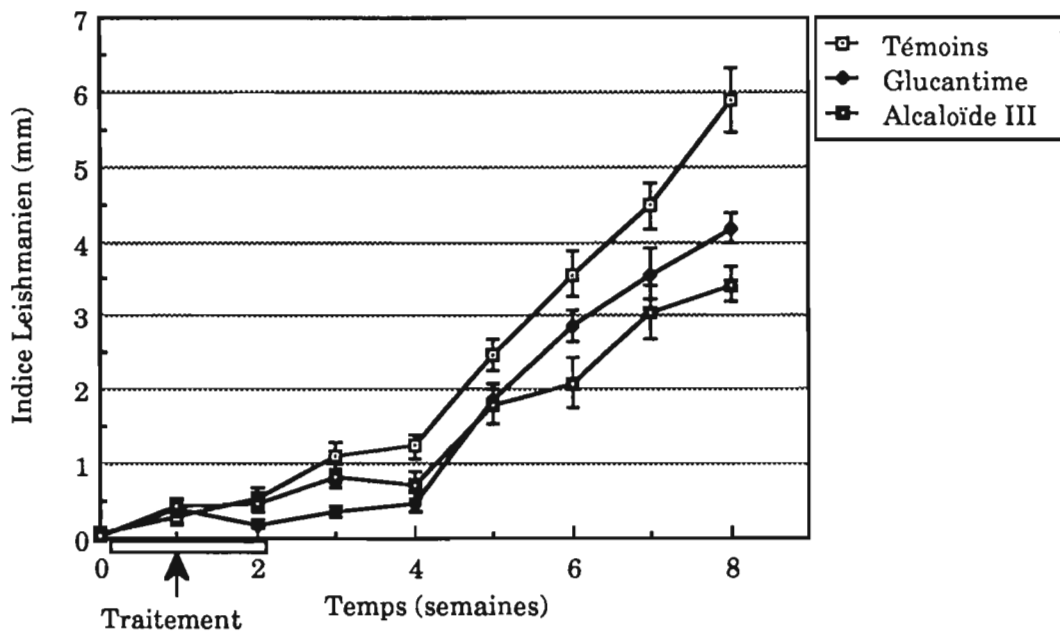
	Courbe N°3.5.	Courbe N°3.6
Sexe des souris	Mâles	Mâles
Poids moyen	24 g	20 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142	PH8
Nombre de souris par lot	10	10
Quantité d'amastigotes inoculée	3 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Les lésions provoquées par la souche H-142 de *L. amazonensis* sont nettement moins importantes (Courbe N°3.5) en fin de protocole (environ 3,5 mm en moyenne pour le lot de souris témoins parasites) que celles mesurées au même stade de l'expérimentation chez les souris infectées par la souche PH8 (6 mm) de la même espèce.

La première semaine de l'expérimentation, l'infection par *Leishmania amazonensis* (H-142) au stade amastigote provoque une forte croissance de tous les Indices Leishmaniens (IL), de 1,2 à 1,8 mm. Cette inflammation des pattes infectées est probablement provoquée par l'administration d'un inoculum de parasites trop important (3 x 10<sup>6</sup> dans 200 µl). Cet effet inflammatoire s'estompe dès la deuxième semaine.

A partir de la deuxième semaine, l' IL moyen du lot témoin infection croît de 0,5 mm par semaine jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine, puis tend à se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérimentation. Chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> ou la 2-*n*-propylquinoléine, les IL augmentent de 0,5 mm jusqu'à la 4<sup>ème</sup> semaine, puis





Courbe N°3.6

Activité de la 2-*n*-propylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

se stabilisent jusqu'à la fin du protocole. A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris témoins (3,7 mm) est supérieur d'un millimètre de manière significative à ceux mesurés chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (2,7 mm) ou avec la 2-*n*-propylquinoléine (2,4 mm).

Les courbes des moyennes de l'IL de ces deux produits se superposent pendant les huit semaines de l'expérimentation. Ces résultats nous permettent de conclure que la 2-*n*-propylquinoléine est aussi active que le Glucantime<sup>R</sup> pour inhiber la croissance des lésions provoquées par une infection avec *Leishmania amazonensis* (H-142) au stade amastigote.

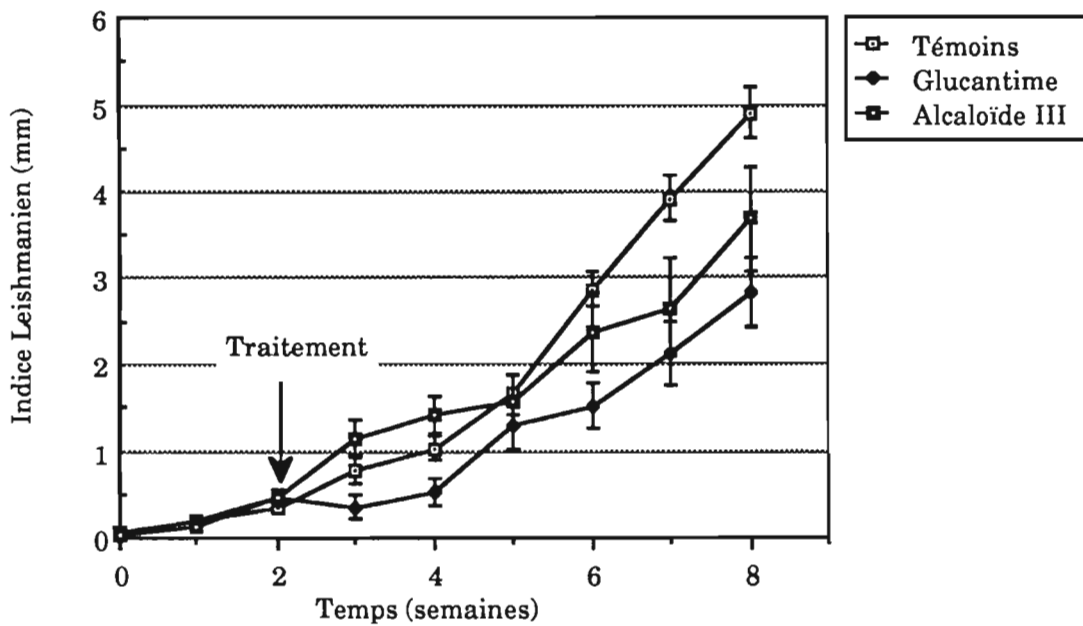
L'expérimentation avec l'infection des souris par la souche PH8 de *L. amazonensis* est encore plus concluante.

Les quatre premières semaines du protocole expérimental, les lésions ne s'accroissent que d'un millimètre (voir courbe N° 3.6) chez toutes les souris. Dès la 5<sup>ème</sup> semaine, il se produit une brusque croissance hebdomadaire des lésions chez toutes les souris (1 à 1,5 mm). Cette croissance est moindre chez les deux lots de souris traitées avec les médicaments. A la 6<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine est inférieur d'un millimètre à celui des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. L'écart des mesures entre ces deux lots de souris traitées est de 0,8 mm à la 8<sup>ème</sup> semaine en faveur du lot de souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine (3,4 mm) et 4,2 mm pour le lot Glucantime<sup>R</sup>. Cet écart est statistiquement significatif.

Ce protocole expérimental confirme que la 2-*n*-propylquinoléine est aussi active que le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>, sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142 ou PH8) au stade amastigote.

Aucun effet secondaire est à noter pendant l'expérimentation chez les souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine. L'injection de ce produit est facilitée par sa nature huileuse qui pourrait peut-être expliquer son activité durable dans le temps, en diffusant lentement dans l'organisme des souris.

Il est curieux de constater que la 2-*n*-propylquinoléine est présente en abondance dans les feuilles (12,5 % des alcaloïdes totaux, soit environ 900 mg kg<sup>-1</sup> de feuilles). Celles ci, à notre connaissance, ne sont pas employées traditionnellement par les Indiens Chimanes pour traiter les leishmaniose cutanées.



Courbe N° 3.7

Activité de la 2-n-propylquinoléine ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

3.4.4.3.2. Activité biologique *in vivo* de la 2-*n*-propylquinoléine administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

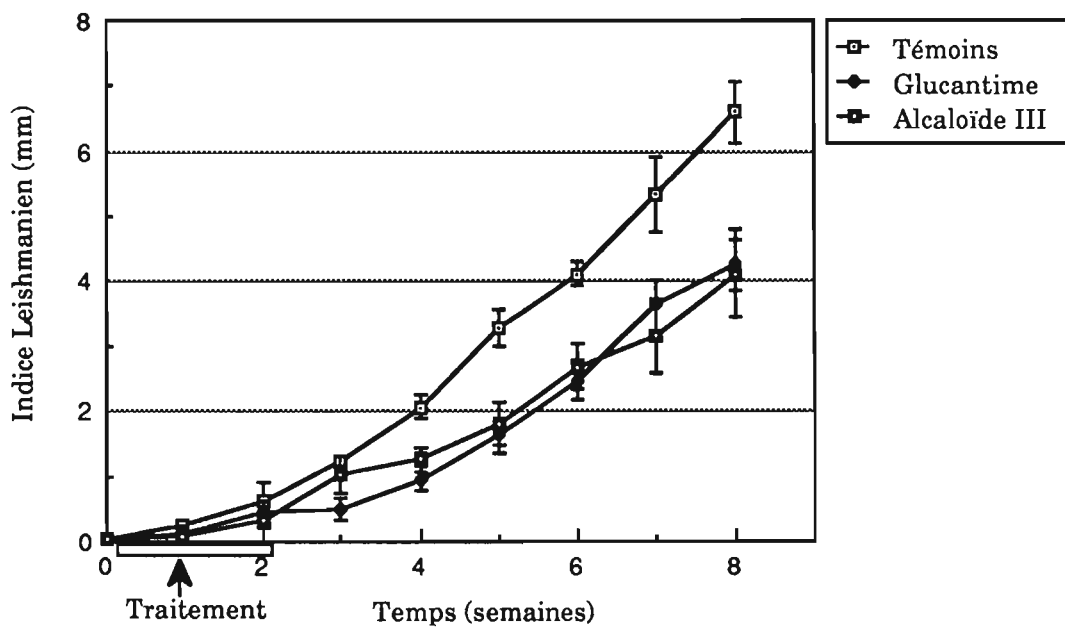
Conditions expérimentales (courbe N°3.7)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	18-20 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 µl)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Le traitement 14 jours après l'infection parasitaire produit une inflammation générale des pattes traitées. Ce phénomène inflammatoire se résorbe trois semaines après le traitement des souris avec la 2-*n*-propylquinoléine.

Entre la 4<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> semaine les IL des souris augmentent de la manière suivante; de 1,5 mm chez les souris témoins, de 1 mm chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup> et de 1,3 mm chez les souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine (voir courbe N° 3.7). Cette croissance des granulomes s'accroît lors des deux semaines suivantes, de la 6<sup>ème</sup> à la 8<sup>ème</sup> semaine, en moyenne un millimètre par semaine chez les souris témoins et de l'ordre de 0,6-0,7 mm chez les souris traitées par les médicaments. A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris traitées avec le médicament de référence est inférieur de 0,8 mm (2,8 mm) à celui mesuré chez les souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine (3,6 mm). Cet écart n'est pas statistiquement significatif, +/- 0,59 mm chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup> et +/- 0,41 mm chez les souris traitées avec la 2-*n*-propylquinoléine.

Ces résultats confirment l'activité leishmanicide de la 2-*n*-propylquinoléine, déjà observée lors des deux précédentes expérimentations, infection des souris par les souches H-142 et PH8 de *L. amazonensis* avec un traitement par voie générale pendant 14 jours consécutifs.



Courbe N° 3.8

Activité de la 2-*n*-propylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3), début du traitement 24 h *post*-infection

3.4.4.3.3. Activité biologique *in vivo* de la 2-*n*-propylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N°3.8)

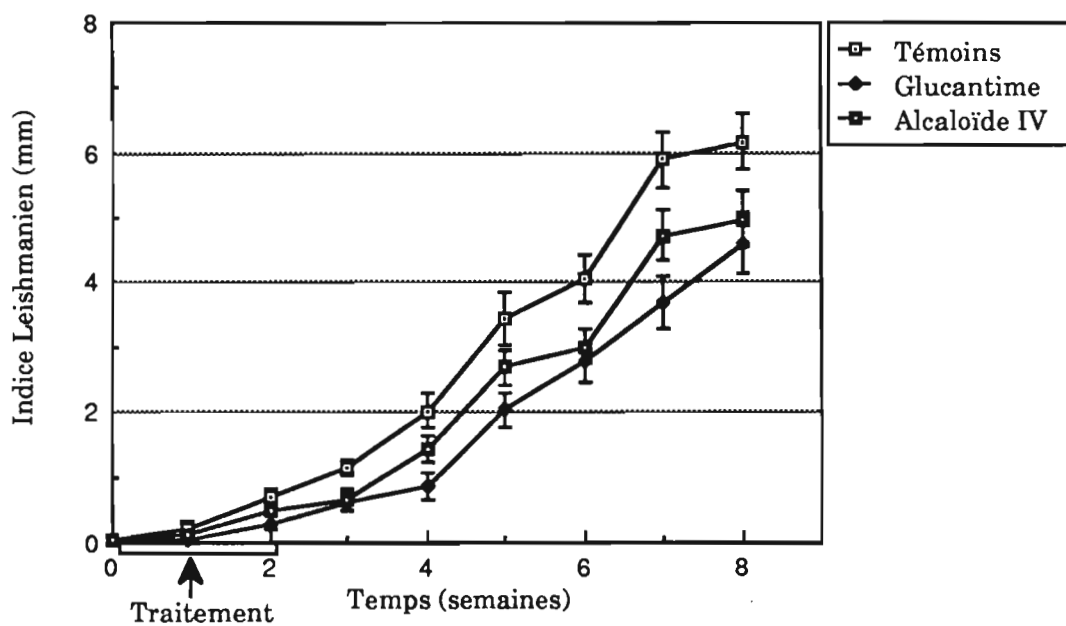
Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L.v.</i>	H-3
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Nous avons vu que la 2-*n*-propylquinoléine était aussi active *in vivo* que le médicament de référence sur les souches de *L. amazonensis* (PH8 et H-142) au stade amastigote. Cet alcaloïde a été testé sur une espèce de leishmanies venant du Venezuela, *L. venezuelensis* (H-3). Cette espèce est très virulente, elle provoque en 10-15 jours des granulomes importants et fréquemment des lésions faciales sur les souris Balb/c ou les hamsters infectés par ce parasite.

Pendant les huit semaines de l'expérimentation, les développements des lésions chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et la 2-*n*-propylquinoléine sont quasiment identiques (voir courbe N° 3.8), 4,2 mm pour les premières et 4,1 mm pour les secondes. L'écart final entre l'IL des souris témoins (6,6 mm) et ceux des souris traitées est de 2,4 mm.

Ce protocole montre que la 2-*n*-propylquinoléine est aussi active que le médicament de référence pour traiter les souris Balb/c infectées par *L. venezuelensis* au stade amastigote.

En conclusion, la 2-*n*-propylquinoléine est un produit actif sur les leishmanioses cutanées du complexe *mexicana*, complexe auquel appartiennent les espèces *L. amazonensis* et *L. venezuelensis*, et probablement aussi sur celles du complexe *braziliensis*. Son activité a été prouvée sur quatre modèles biologiques différents. Suite à ces résultats encourageants, il serait intéressant de tester cette quinoléine sur d'autres souches de leishmanies, notamment sur *Leishmania donovani*, le parasite de la leishmaniose viscérale.



Courbe N° 3.9

Activité de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. (écorces de racines) et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.4. Alcaloïde IV: la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine

#### 3.4.4.4.1. Activité biologique *in vivo* de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 3.9 et N° 3.10)

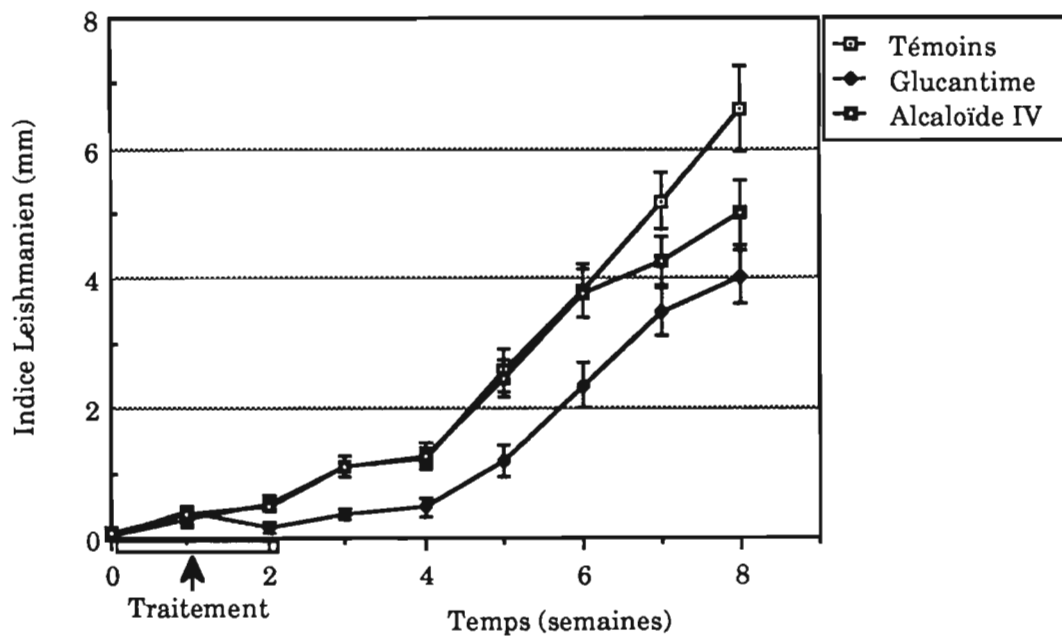
Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	20 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1,2 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Au cours des deux protocoles, aucun incident n'est à signaler, à part la formation de nécroses à l'endroit d'injection du produit. Ces nécroses disparaissent rapidement à la suspension du traitement. L'alcaloïde IV est huileux ce qui facilite sa préparation avec le Tween 80 et ensuite son administration.

Les deux expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires, la première avec la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine provenant des écorces de racines et la deuxième avec le même produit isolé des écorces du tronc, sans que nous le sachions. La croissance générale des granulomes est plus rapide lors du deuxième protocole (Voir courbe N° 3.10). La cause de cette croissance rapide de l'infection parasitaire peut être imputée à l'inoculation de 200  $\mu$ l de parasites contenant des impuretés qui provoque une inflammation de la patte infectée et favorise ainsi le développement des amastigotes. L'Indice Leishmanien du lot expérimental témoin (infection parasitaire) à la 8<sup>ème</sup> semaine, est de 6,2 mm pour le premier protocole (Courbe N° 3.9) et de 9 mm pour le deuxième protocole.

A partir de la 3<sup>ème</sup> semaine (Courbe N° 3.10) ou de la 4<sup>ème</sup> semaine (courbe





Courbe N° 3.10

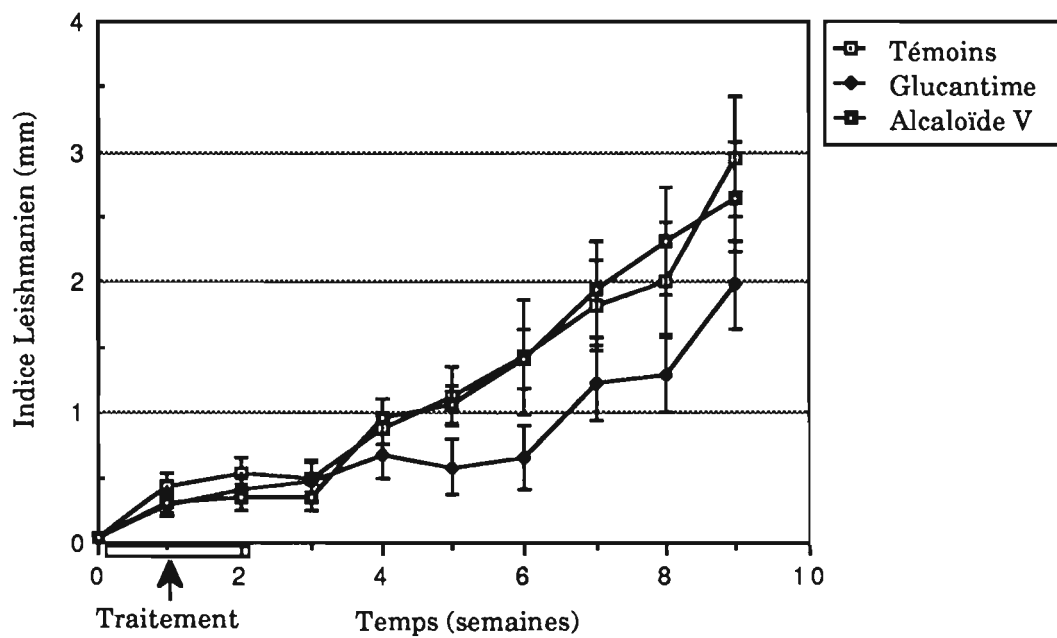
Activité de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. (écorces de tronc) et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

N° 3.9), la croissance de l'IL est très rapide (1-1,5 mm par semaine). Cette forte croissance des lésions à la 4<sup>ème</sup> semaine est une caractéristique de la souche PH8 de *L. amazonensis*.

Au cours du premier protocole, l'IL des souris traitées avec la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine a toujours une valeur comprise entre l'IL des souris témoins et l'IL de souris traitées avec le dérivé antimonié (voir courbe N° 3.9). En revanche pendant la deuxième expérimentation (voir courbe N° 3.10), les souris traitées avec la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine produisent des granulomes en moyenne de même importance que ceux mesurés chez les souris témoins pendant les six premières semaines du protocole. Les deux dernières semaines, la croissance des lésions chez les souris traitées avec la quinoléine est ralentie.

Finaleme nt à la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris traitées avec la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (5,1 mm) est supérieur d'un millimètre environ à celui mesuré chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup> (4 mm) et inférieur de 1,6 mm à celui des souris témoins (6,7 mm).

En conclusion, la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine possède une activité leishmanicide modérée sur les souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote. Cette activité est légèrement plus importante que celle de la 2-phénylquinoléine.



Courbe N° 3.11

Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.5. Alcaloïde V: la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl) quinoléine

#### 3.4.4.5.1. Activité biologique *in vivo* de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl) quinoléine sur des souris Balb/c infectées par les souches H-142 et PH8 de *Leishmania amazonensis* au stade amastigote

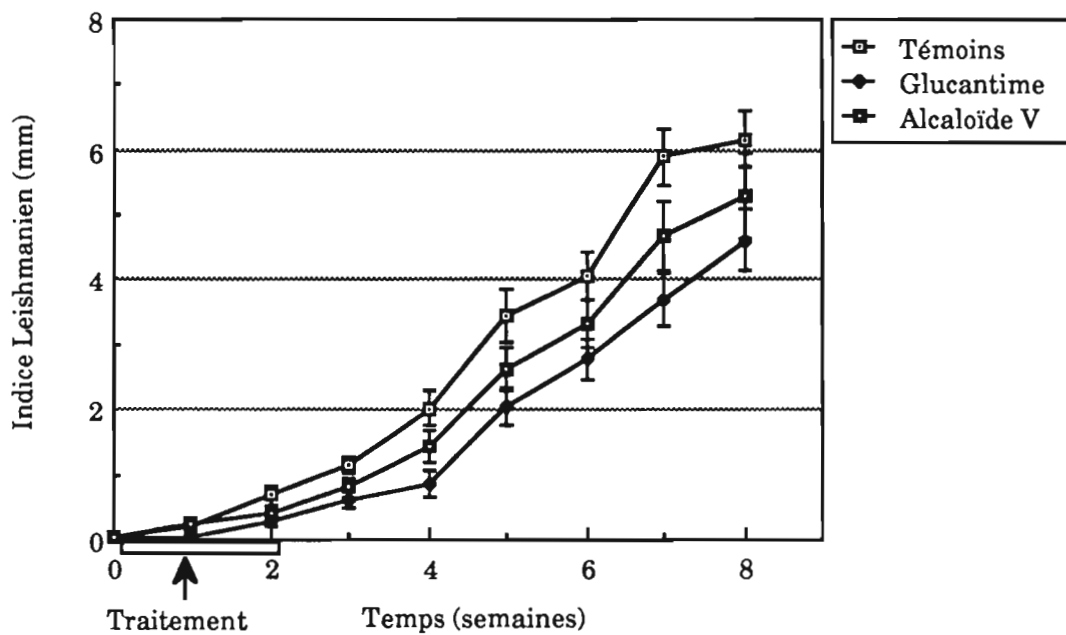
#### Conditions expérimentales

	Courbe N°3.11.	Courbe N°3.12
Sexe des souris	Mâles	Mâles
Poids moyen	22 g	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142	PH8
Nombre de souris par lot	10	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$2,5 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

L'alcaloïde V a été isolé des écorces de tronc (7,8 % des alcaloïdes totaux) et des écorces de racines (environ 5 % des alcaloïdes totaux). Il est huileux ce qui facilite sa mise en solution dans le Tween 80 et son administration.

L'expérimentation avec infection des souris Balb/c par la souche H-142 de *L. amazonensis* au stade amastigote a dû être prolongée d'une semaine (voir courbe N° 3.11). Les Indices Leishmaniens étaient inférieurs chez toutes les souris à 3 mm à la 8<sup>ème</sup> semaine. Les différences entre les lots expérimentaux n'étaient pas significatives et par conséquent ininterprétables.

La 2-(3,4-méthylènedioxyphényl)quinoléine est inactive sur la souche H-142 de *L. amazonensis*. En effet, les IL des souris traitées par cette quinoléine sont sensiblement les mêmes que ceux mesurés chez les souris témoins pendant les neuf semaines de l'expérimentation. Il est difficile de tirer des enseignements après ce protocole. Les différences des IL entre les groupes expérimentaux ne sont pas statistiquement significatives.

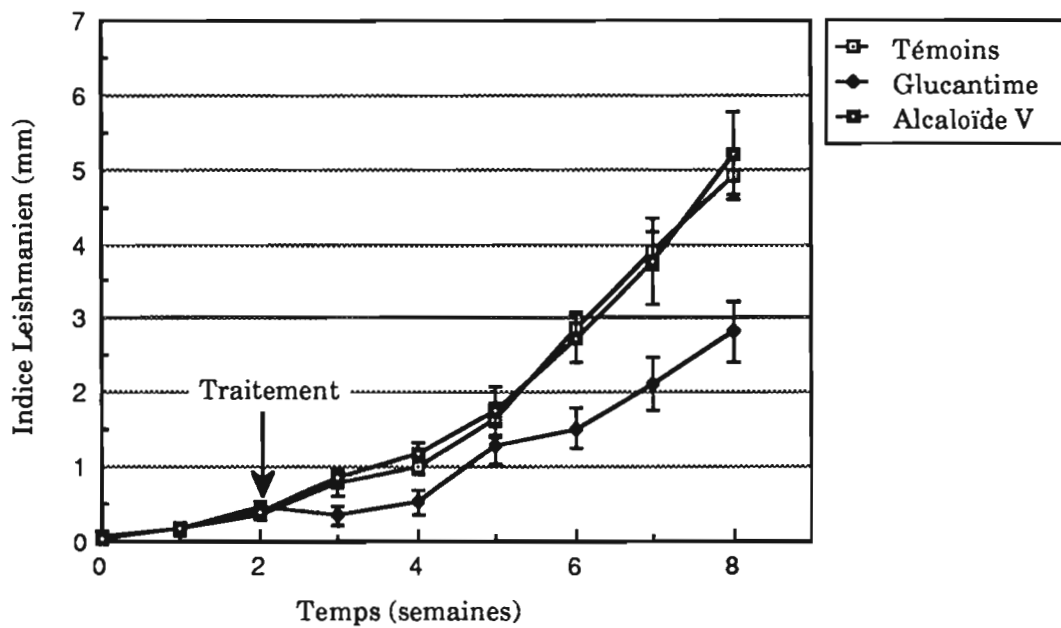


Courbe N° 3.12

Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

Les essais *in vivo* avec l'infection des souris par la souche PH8 de *L. amazonensis* (courbe N° 3.12) au stade amastigote apportent plus d'informations sur une éventuelle activité leishmanicide de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléines. Les souris traitées avec l'alcaloïde V développent des lésions d'une taille intermédiaire entre celles mesurées chez les souris du lot témoin et celles des souris traitées au Glucantime<sup>R</sup>. A la 5<sup>ème</sup> semaine nous notons un épaissement important des lésions, de l'ordre d'un millimètre environ chez toutes les souris. Cette croissance des lésions est observée au cours des deux semaines suivantes (les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> semaines), puis ralentie à la dernière semaine. Finalement les IL mesurés à la 8<sup>ème</sup> semaine sont les suivants; 6,6 mm chez les souris témoins, 5,5 mm chez les souris traitées avec la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine, 4,2 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

En définitive, la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine semble posséder des propriétés leishmanicides sensiblement moins importantes que le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>, mais néanmoins intéressantes à analyser du point de vue statistique.



Courbe N° 3.13

Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

3.4.4.5.2. Activité biologique *in vivo* de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

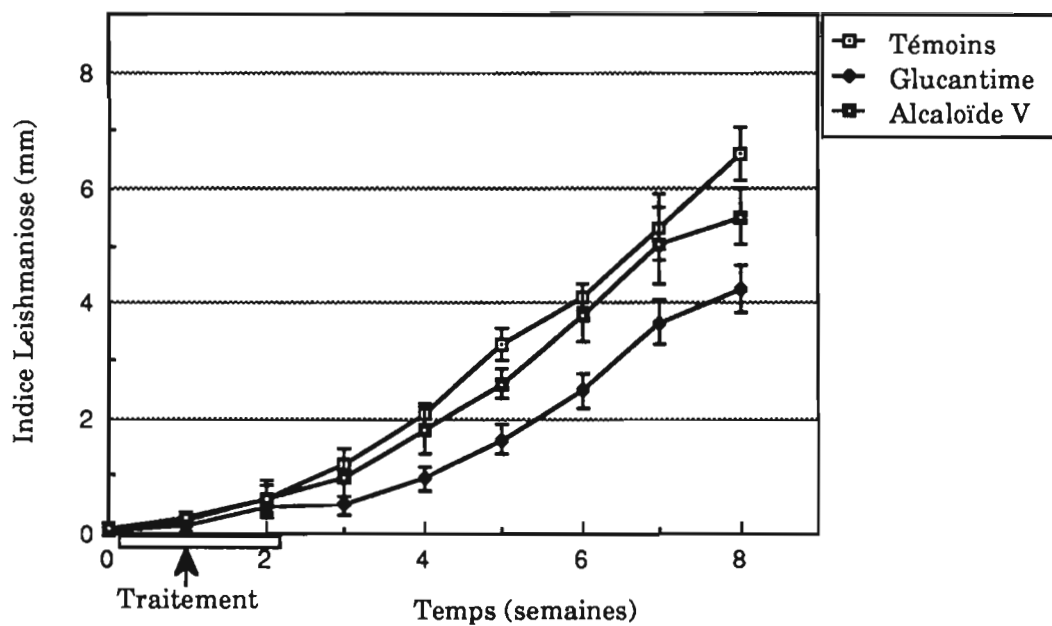
Conditions expérimentales (courbe N°3.13)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$400 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

L'injection d'une dose unique de l'alcaloïde V au niveau de la patte arrière infectée n'a en rien ralenti la croissance de la lésion provoquée par l'infection de *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote (voir courbe N° 3.13). Cette croissance est limitée chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Les souris traitées avec la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine développent des lésions de la même taille que celles mesurées chez les souris infectées non traitées. Les deux courbes des Indices Leishmaniens se superposent pendant les huit semaines de l'expérimentation.

En conclusion, cette quinoléine inoculée localement à l'endroit de l'infection parasitaire sur des souris Balb/c n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance de *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote. Ces résultats vont dans le même sens que ceux précédemment obtenus lors de l'infection des souris par *L. amazonensis* H-142 (voir courbe N° 3.11) et le traitement de celles-ci par la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine.





Courbe N° 3.14

Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3), début du traitement 24 h *post*-infection

3.4.4.5.3. Activité biologique *in vivo* de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

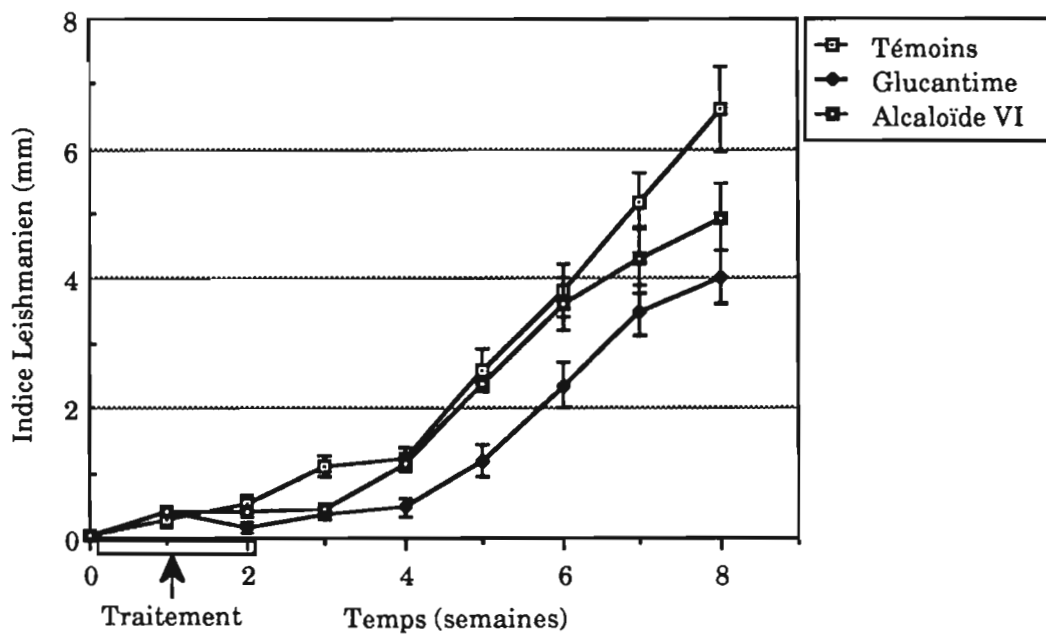
Conditions expérimentales (courbe N°3.14)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18-16 g
Réf. de la souche de <i>L. v.</i>	H-3
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Disposant des quantités suffisantes, un essai a pu être réalisé avec des souris infectées par l'espèce *L. venezuelensis* (H-3).

L'expérimentation d'un traitement avec la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine pendant 14 jours consécutifs par voie sous cutanée (courbe N°3.14) a donné des résultats semblables à ceux déjà obtenus lors de l'infection des souris par *L. amazonensis* (PH8). Les Indices Leishmaniens des souris traitées avec l'alkaloïde V sont inférieurs d'un millimètre à ceux mesurés chez les souris témoins pendant toute la durée de l'expérimentation et supérieurs d'un millimètre à ceux mesurés chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

Ce nouveau protocole montre que la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine est peu active *in vivo* sur *L. venezuelensis* (H-3) au stade amastigote. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus lors des précédentes expérimentations de traitement avec cette quinoléine (courbes N° 3.11 et 3.13).



Courbe N° 3.15

Activité de la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/*c* infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.6. Alcaloïde VI: la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine

#### 3.4.4.6.1. Activité biologique *in vivo* de la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 3.15)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine a été isolée à partir des écorces de tronc; elle est très minoritaire. Cet alcaloïde ne diffère de l'alcaloïde II que par la présence d'un groupement méthoxyle en position 4 du noyau quinoléique. Il n'a pu être testé que sur un seul modèle expérimental *in vivo*, l'infection des souris Balb/c par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote.

Au cours de ce protocole aucun incident est à noter, sauf l'apparition de nécroses à l'endroit de l'injection du médicament. Ces nécroses disparaissent lorsque le traitement est arrêté. Jusqu'à la 3<sup>ème</sup> semaine, la croissance des Indices Leishmaniens des souris traitées avec l'alcaloïde VI est quasiment nulle (0,4 mm), tout comme chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (0,4 mm).

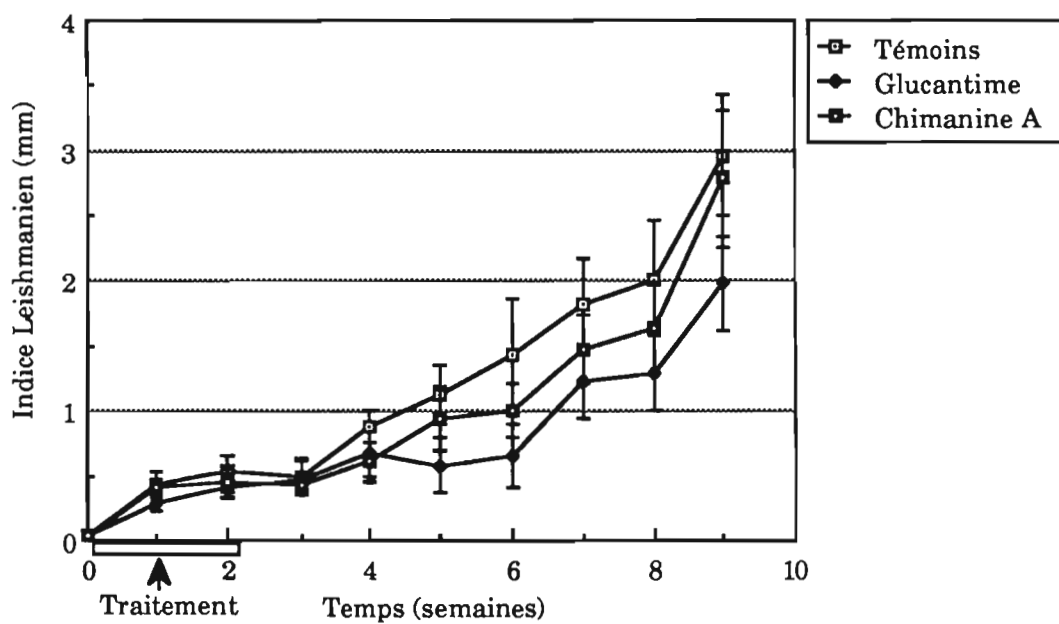
A la 4<sup>ème</sup> semaine, il se produit une augmentation sensible des IL des souris traitées avec l'alcaloïde VI (0,7 mm). Cette croissance des lésions s'accroît les deux semaines suivantes, 1,2 mm. A la 6<sup>ème</sup> semaine, les IL des souris traitées avec l'alcaloïde VI et ceux des souris témoins sont pratiquement identiques (3,8 et 3,7 mm). A la 7<sup>ème</sup> semaine il se produit un ralentissement de la croissance des lésions (0,7 mm) chez les souris traitées avec la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine. Dans le même temps les IL des souris témoins continuent de

croître de 1,4 mm.

Au terme de l'expérimentation, à la 8<sup>ème</sup> semaine, les IL des souris traitées avec la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine (4,9 mm) sont inférieurs de 1,7 mm à ceux mesurés chez les souris témoins (6,6 mm). L'intervalle de confiance de l'ensemble des mesures des IL des souris traitées avec l'alkaloïde VI chevauche l'intervalle de confiance des IL des souris traitées avec le médicament de référence.

Malgré ces résultats en fin de protocole, il est difficile de conclure que la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine est active *in vivo* sur les souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8). Le dérivé déméthoxylé de l'alkaloïde VI, la 2-*n*-pentylquinoléine (alkaloïde II) semble moins actif *in vivo* que celui-ci sur *L. amazonensis* (PH8). Il serait intéressant de refaire de nouveaux essais biologiques avec *Leishmania* ssp. sur le modèle animal avec ces deux quinoléines substituées en 2 par une chaîne pentyle pour pouvoir porter un jugement sur l'efficacité de ces deux produits.

Dans la discussion (Paragraphe 3.4.5.) l'activité leishmanicide de ces deux quinoléines est comparée en fonction de leur poids moléculaire.



Courbe N° 3.16

Activité de la chimanine A ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.7. Alcaloïde VII: la 4-méthoxy-2-n-propylquinoléine ou Chimanine A

#### 3.4.4.7.1. Activité biologique *in vivo* de la 4-méthoxy-2-n-propylquinoléine ou chimanine A sur des souris Balb/c infectées par les souches H-142 et PH8 de *Leishmania amazonensis* au stade amastigote

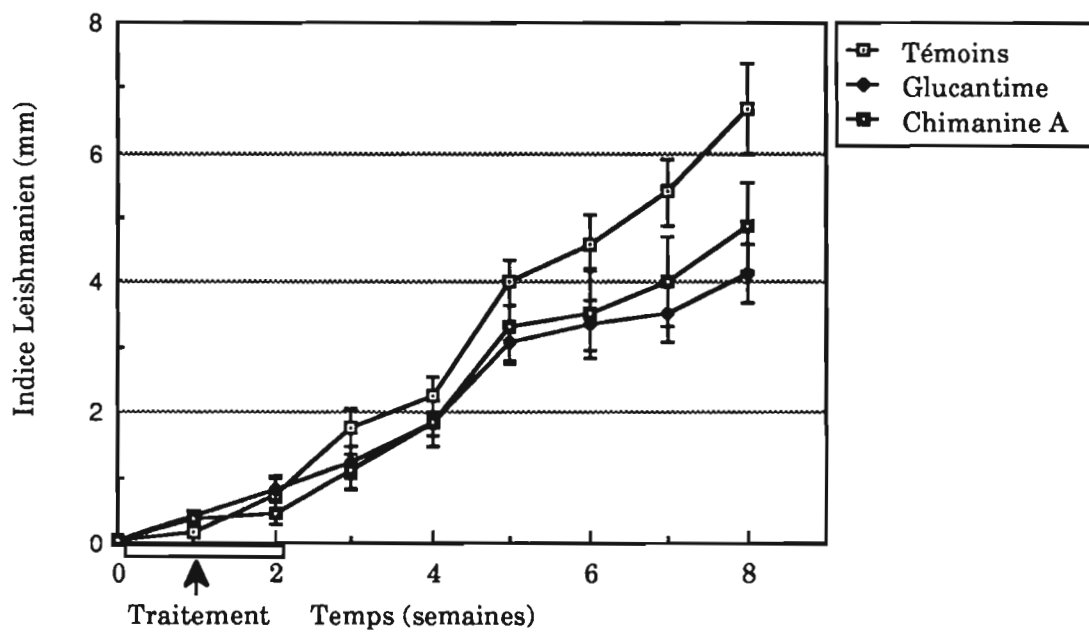
##### Conditions expérimentales

	Courbe N°3.16.	Courbe N°3.17.
Sexe des souris	Femelles	Femelles
Poids moyen	18 g	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142	PH8
Nombre de souris par lot	10	10
Quantité d'amastigotes inoculée	2,5 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La chimanine A est le dérivé méthoxylé en 4 de l'alcaloïde III. Ce dernier s'est montré particulièrement actif *in vivo* sur plusieurs espèces et souches de leishmanies. Avec la chimanine A, deux protocoles expérimentaux ont pu être effectués avec des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (H-142) et par la souche (PH8) de la même espèce au stade amastigote.

Les souris Balb/c, infectées par les amastigotes de la souche H-142 et traitées par la chimanine A, développaient des lésions de même taille que celles mesurées chez les souris traitées par le Glucantime<sup>R</sup> jusqu'à la 4<sup>ème</sup> semaine (voir courbe N°3.16); 0,6 mm (chimanine A) et 0,7 mm (Glucantime<sup>R</sup>). Les trois semaines suivantes, les Indices Leishmaniens augmentaient lentement chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> 0,8 mm. En fin d'expérimentation, malgré une semaine supplémentaire d'observation, les IL des trois groupes expérimentaux étaient assez proches, 2 mm +/- 0,4 (Glucantime<sup>R</sup>), 2,8 mm +/- 0,5 (Chimanine A) et 3 mm +/- 0,5 (Témoins).

Il est difficile de tirer des enseignements de cette expérimentation, en raison des faibles Indices Leishmaniens obtenus et des différences modérées entre les IL à la 8<sup>ème</sup> semaine. Nous observons que les souris traitées avec la



Courbe N° 3.17

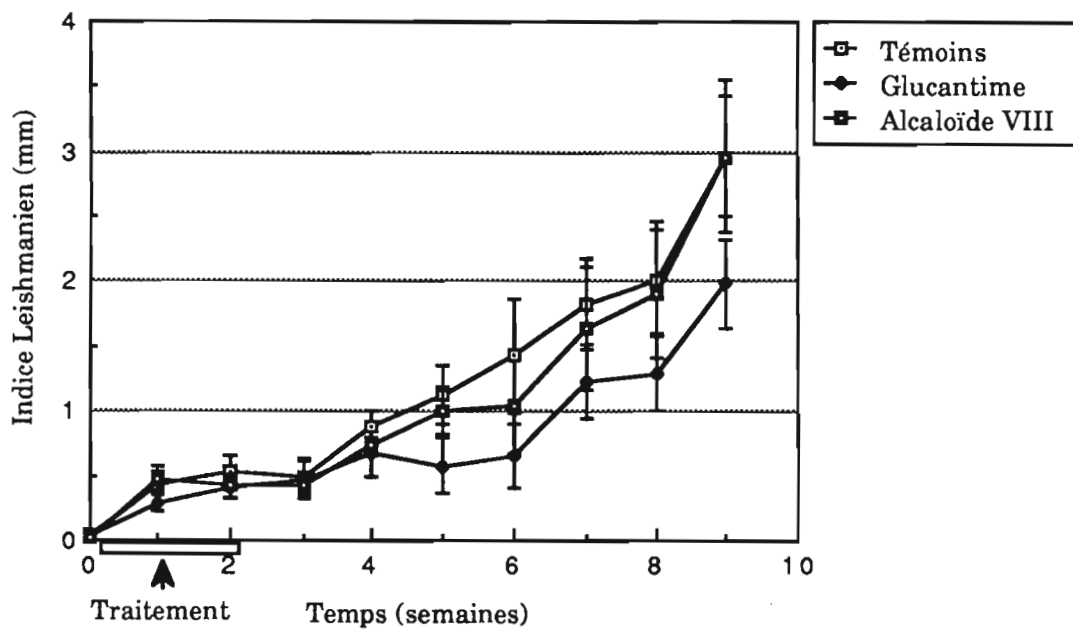
Activité de la chimanine A ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection



chimanine A développent des lésions moins rapidement que les souris témoins mais de taille légèrement supérieure à celles mesurées chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. L'interprétation statistique de ces résultats n'est pas très aisée, car les intervalles de confiance des moyennes observées de tous les Indices Leishmaniens ont tendance à se chevaucher. Ce protocole montre l'intérêt d'infecter les souris avec une souche de leishmanies virulente qui permet d'obtenir des lésions importantes, dans un court laps de temps, et surtout des différences entre les souris témoins et celles recevant un traitement. Pour cette raison, l'utilisation de la souche PH8 de *L. amazonensis* pour infecter les souris Balb/est un meilleur choix que la souche H-142.

L'expérimentation avec des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote permet d'observer un effet thérapeutique de la chimanine A. Les six premières semaines de l'expérimentation, les souris traitées avec la chimanine A développent des lésions de la même importance que celles mesurées chez les souris soumises au traitement antimonié, respectivement de 3,5 et 3,6 mm (voir courbe N°3.17). Les deux dernières semaines, les Indices Leishmaniens mesurés chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> augmentent légèrement moins rapidement que ceux relevés chez les souris ayant reçu la chimanine A, de 0,8 mm chez les premières et de 1,3 mm chez ces dernières. En fin d'expérimentation, la différence des IL n'est que de 0,8 mm en faveur du lot expérimental traité avec le Glucantime<sup>R</sup> (4 mm). Les différences entre les IL du lot expérimental témoin et du lot expérimental traité avec la chimanine A a permis de montrer une activité thérapeutique de la chimanine A. En fin de protocole, l'IL du lot expérimental chimanine A est inférieur de 1,7 mm à celui du lot expérimental témoin parasite, alors qu'il était négligeable lors de l'essai *in vivo* précédent, infection des souris par *L. amazonensis* (H-142).

En conclusion, la chimanine A montre une activité leishmanicide *in vivo* sur *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote, légèrement inférieure à celle du médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>. Ce résultat est à mettre en relation avec ceux déjà obtenus lors des essais biologiques *in vivo* avec la 2-*n*-propylquinoléine. Il semble se dessiner une relation entre la structure chimique des quinoléines substituées en 2 par une chaîne propyle et leur activité biologique *in vivo* sur *L. amazonensis* au stade amastigotes. Cette hypothèse de relation structure-activité biologique doit être confirmée par des essais avec d'autres dérivés quinoléiques substitués en 2 par une chaîne propyle, tels que les chimanines B, et D.



Courbe N° 3.18

Activité de la cusparine ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

### 3.4.4.8. Alcaloïde VIII: la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine

#### 3.4.4.8.1. Activité biologique *in vivo* de la cusparine sur des souris Balb/c infectées par les souches H-142 et PH8 de *Leishmania amazonensis* au stade amastigote

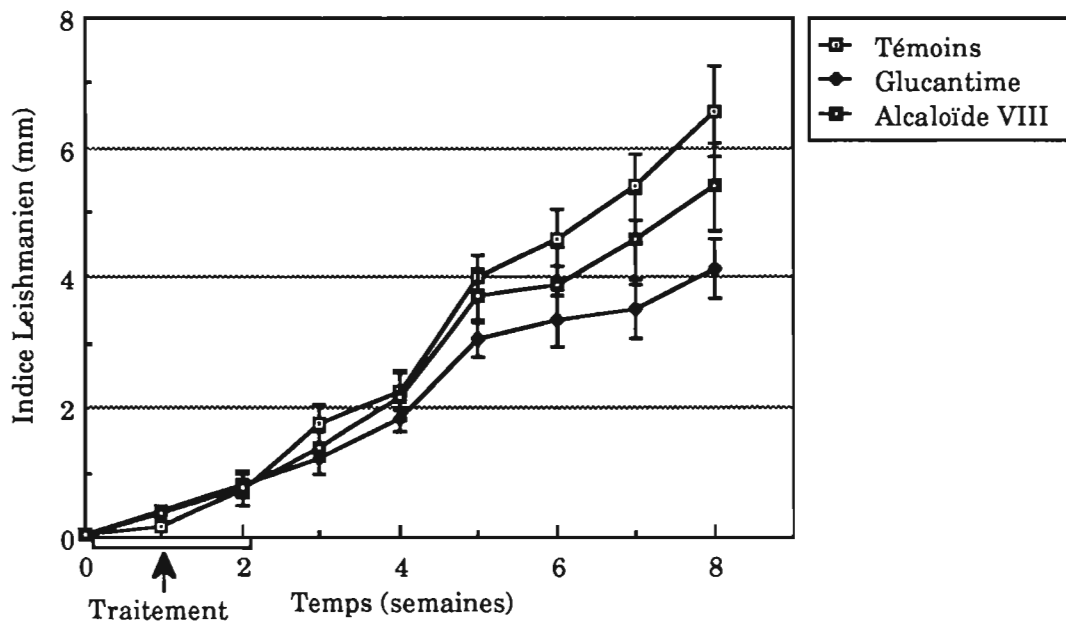
#### Conditions expérimentales

	Courbe N°3.18.	Courbe N°3.19.
Sexe des souris	Mâles	Femelles
Poids moyen	20 g	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142	PH8
Nombre de souris par lot	10	10
Quantité d'amastigotes inoculée	2,5 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

L'alcaloïde VIII est le dérivé méthoxylé en 4 de l'alcaloïde V. Deux protocoles expérimentaux ont pu être réalisés avec deux souches de *L. amazonensis*, H-142 et PH8, au stade amastigote.

L'expérimentation avec des souris infectées par *L. amazonensis* (H-142) au stade amastigote, n'a pas été très concluante (voir courbe N° 3.18). En effet les souris traitées avec la cusparine développent des granulomes quasiment de la même taille que ceux mesurés chez les souris témoins pendant les neuf semaines (3 mm environ) d'expérimentation. Nous avons été obligé de prolonger le protocole d'une semaine pour obtenir des résultats interprétables (une différence de 1 mm entre le lot Glucantime<sup>R</sup> et les deux autres lots expérimentaux). Cette semaine supplémentaire a permis d'observer une forte augmentation des IL chez les souris témoins et celles traitées avec la cusparine (1 mm).

En conclusion, la cusparine ne possède aucune activité leishmanicide sur *L. amazonensis* (H-142) au stade amastigote chez les souris Balb/c.



Courbe N° 3.19

Activité de la cusparine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

L'expérimentation avec des souris infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote, a apporté plus de renseignements sur une possible activité leishmanicide de la cusparine.

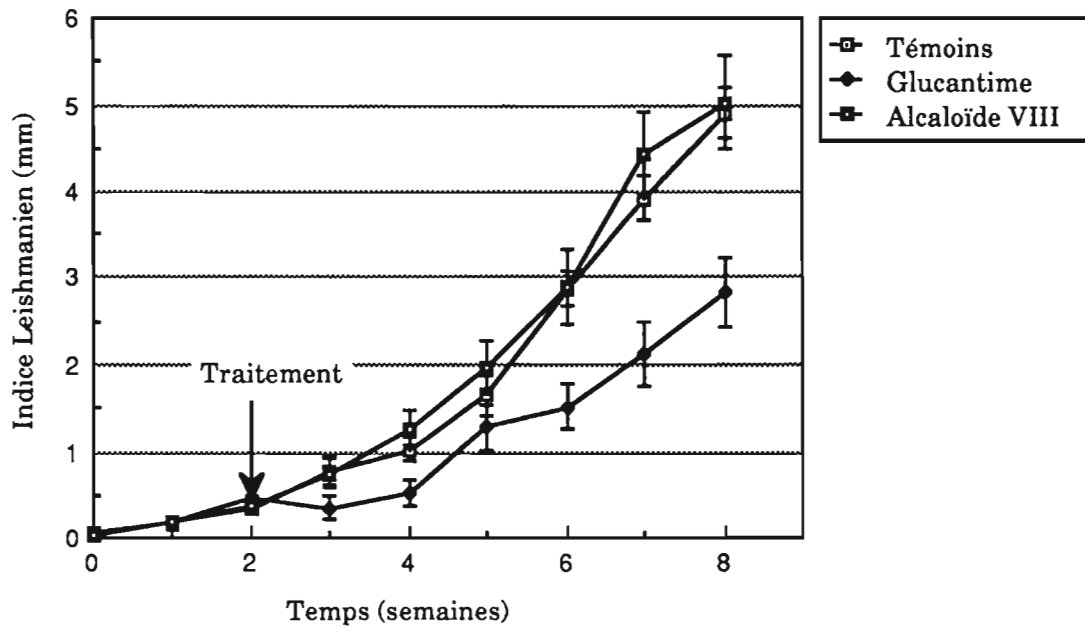
Pendant les quatre premières semaines, nous constatons une petite différence entre les Indices Leishmaniens mesurés chez les trois lots expérimentaux de souris Balb/c. Les IL sont compris entre 1,8 mm (Glucantime<sup>R</sup> et cusparine) et 2 mm (témoin).

A la 5<sup>ème</sup> semaine, il se produit une forte progression des IL (voir courbe N° 3.19), de 1,4 mm chez les souris témoins, de 1,2 mm chez les souris traitées avec la cusparine et de 1,2 mm chez les souris ayant reçu le traitement au Glucantime<sup>R</sup>.

Les trois dernières semaines de l'expérimentation, l'IL du groupe témoin augmente de 2,6 mm. Dans le même temps il croît de 1,6 mm chez les souris traitées avec la cusparine et de 1,1 mm chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup>. A la fin de l'expérimentation, les IL des trois lots expérimentaux sont les suivants; 6,7 mm chez les souris témoins, 4,2 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et 5,4 mm chez les souris traitées avec la cusparine.

Enfin, la cusparine administrée à 100 mg.kg<sup>-1</sup> pendant 14 jours consécutifs à des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote ralentit sensiblement la multiplication des parasites. Cette activité leishmanicide est moindre que celle du médicament de référence.

Une fois de plus nous constatons que le choix de la souche est un élément essentielle. En effet avec la souche H-142 de *L. amazonensis* nous n'avons pas observé une quelconque activité de la cusparine, ce qui n'est pas le cas avec la souche plus virulente PH8.



Courbe N° 3.20

Activité de la cusparine ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

3.4.4.8.2. Activité biologique *in vivo* de la cusparine administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

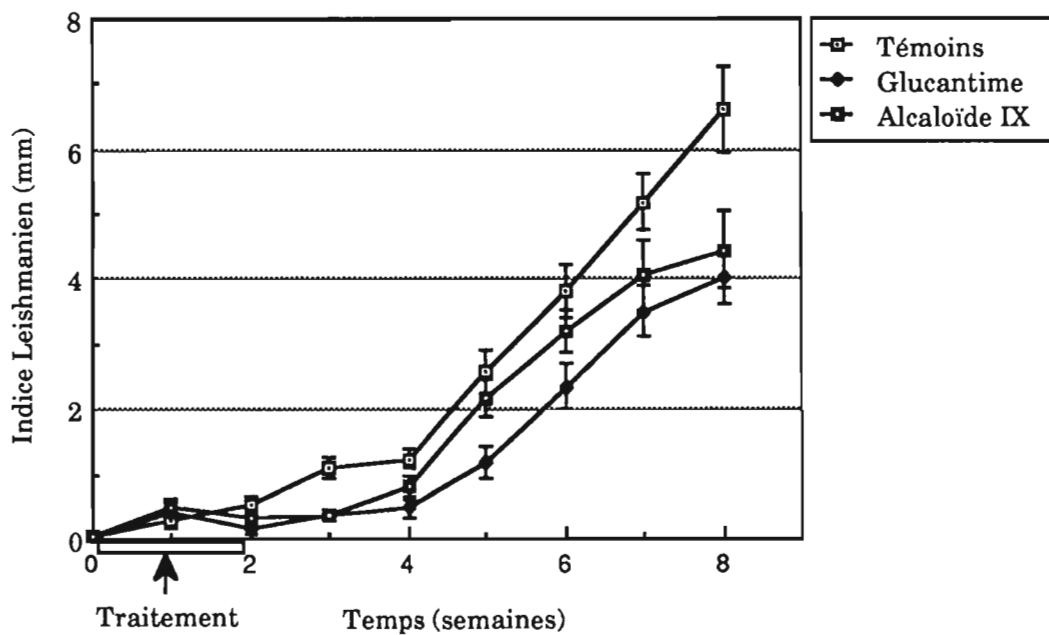
Conditions expérimentales (courbe N°3.20.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

L'expérimentation de traitement local en dose unique à l'endroit de l'infection parasitaire n'a pas donné les résultats escomptés (voir courbe N° 3.20).

Les souris traitées avec la cusparine développent des lésions comparables à celles mesurées chez les souris témoins au cours des huit semaines d'expérimentation. A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, les IL augmentent chaque semaine d'un millimètre environ chez les souris non-traitées au Glucantime<sup>R</sup> alors qu'il n'est que de 0,3-0,4 mm chez les souris traitées avec le dérivé antimonie.

En conclusion, la cusparine administrée localement en dose unique sur la patte infectée n'a aucune influence sur le développement des lésions provoquées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote chez les souris Balb/c.



Courbe N° 3.21

Activité de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h post-infection



### 3.4.4.9. Alcaloïde IX: la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine:

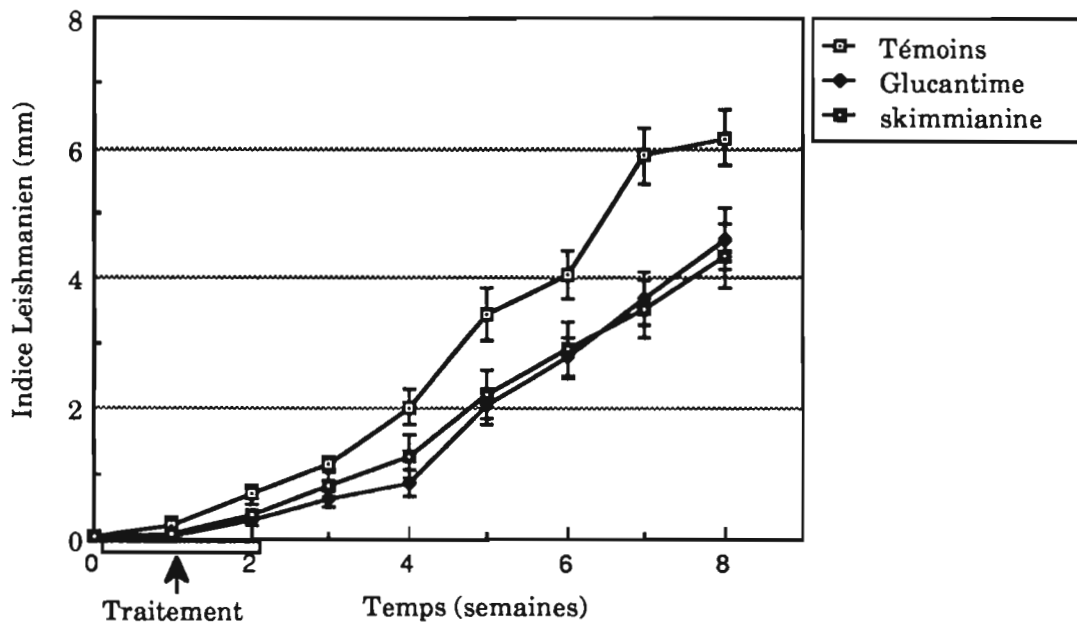
#### 3.4.4.9.1. Activité biologique *in vivo* de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N°3.21)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

L'alcaloïde IX est une quinoléine substituée en 2 par une chaîne phényléthyle comme les alcaloïdes V et VIII. Avec la faible quantité obtenue, un seul protocole expérimental a pu être réalisé sur souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote.

Les quatre premières semaines de l'expérimentation, les indices leishmaniens augmentent très lentement, de 1,4 mm chez les souris témoins, de 0,8 mm chez les souris ayant reçu le traitement avec l'alcaloïde IX et de 0,5 mm chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup> ( voir courbe N° 3.21). A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine, il se produit une forte croissance des IL; 0,7 mm (Glucantime<sup>R</sup>) 1,2 mm (alcaloïde IX) et 1,7 mm (témoins). Cette augmentation des IL à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine d'expérimentation est caractéristique de *L. amazonensis* (PH8). A la 8<sup>ème</sup> semaine, les mesures sont les suivantes: chez les souris témoins (IL = 6,6 mm), chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (I.L = 4 mm) et chez les souris traitées avec l'alcaloïde IX (IL = 4,4 mm). Finalement, l'écart entre les IL des souris traitées avec l'alcaloïde IX et ceux des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> est faible, 0,4 mm, et en faveur de ce dernier.



Courbe N° 3.22

Activité de la skimmianine ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. (feuilles) et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

Il est dommage que les quantités isolées d'alcaloïde IX soient si faibles car cette quinoléine peut être considérée comme aussi active que le médicament de référence. Ceci mériterait une confirmation de l'activité au cours d'une autre expérimentation, dans les mêmes conditions opératoires avec une autre souche de *L. amazonensis* ou avec une autre espèce de leishmanie au stade amastigote.

### 3.4.4.10. Alcaloïde X: la skimmianine

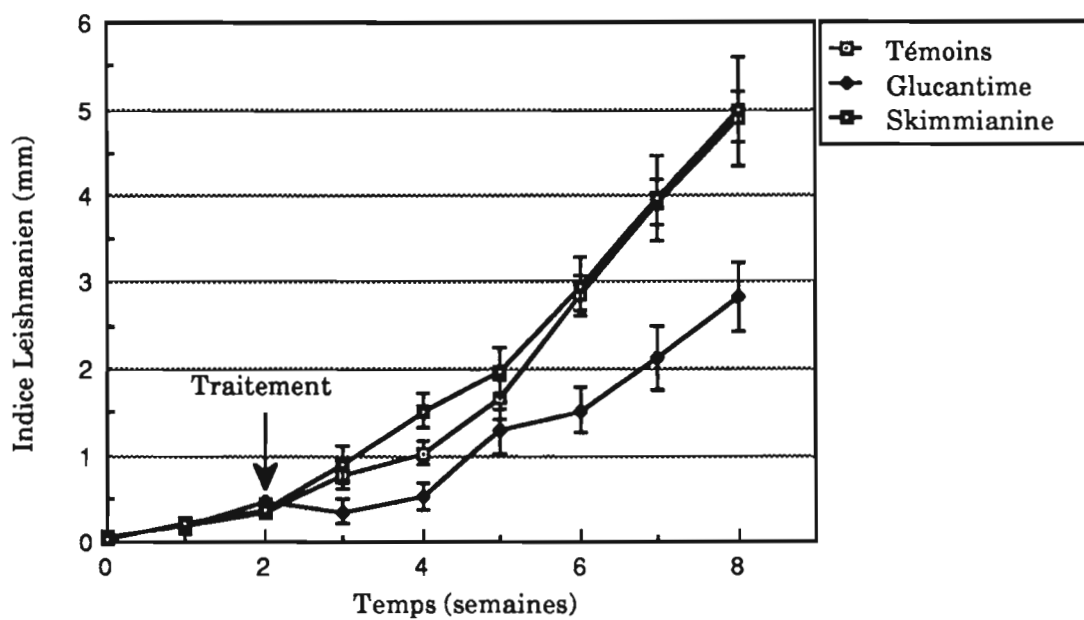
#### 3.4.4.10.1. Activité biologique *in vivo* de la skimmianine sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (Courbe N° 3.22)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	19 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	1,2x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Les quatre premières semaines de l'expérimentation, les IL des deux lots de souris traitées augmentent d'un millimètre environ et le lot des souris témoins de deux millimètres. Les deux semaines suivantes, les lésions augmentent de 0,8 mm en moyenne chaque semaine chez les souris ayant reçu un traitement et de plus d'un millimètre chez les souris témoins. Les deux dernières semaines, il se produit un ralentissement de la croissance des IL chez les souris ayant reçu un traitement, alors qu'il est spectaculaire (de 2 mm environ) à l'avant-dernière semaine chez les souris témoins (voir courbe N° 3.22).

A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris témoins ne progressent plus beaucoup (0,4 mm) peut être à cause d'un début d'ulcération de la patte infectée. Cette



Courbe N° 3.23

Activité de la skimmianine ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

dernière observation montre une des difficultés à surmonter lors des tests biologiques *in vivo* sur les leishmanies, éviter la cicatrisation de la lésion tout en produisant artificiellement des lésions notables.

Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation sur l'animal montrent que la skimmianine est aussi active que le Glucantime<sup>R</sup> sur *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote inoculé à des souris Balb/c. La skimmianine est la seule furo (2,3-*b*) quinoléine testée sur le modèle animal. Il serait intéressant d'essayer d'autres dérivés de ce type, tels que l'évolitrine isolée à partir d'un lot de *Galipea longiflora* Kr. (Fournet et al., 1989).

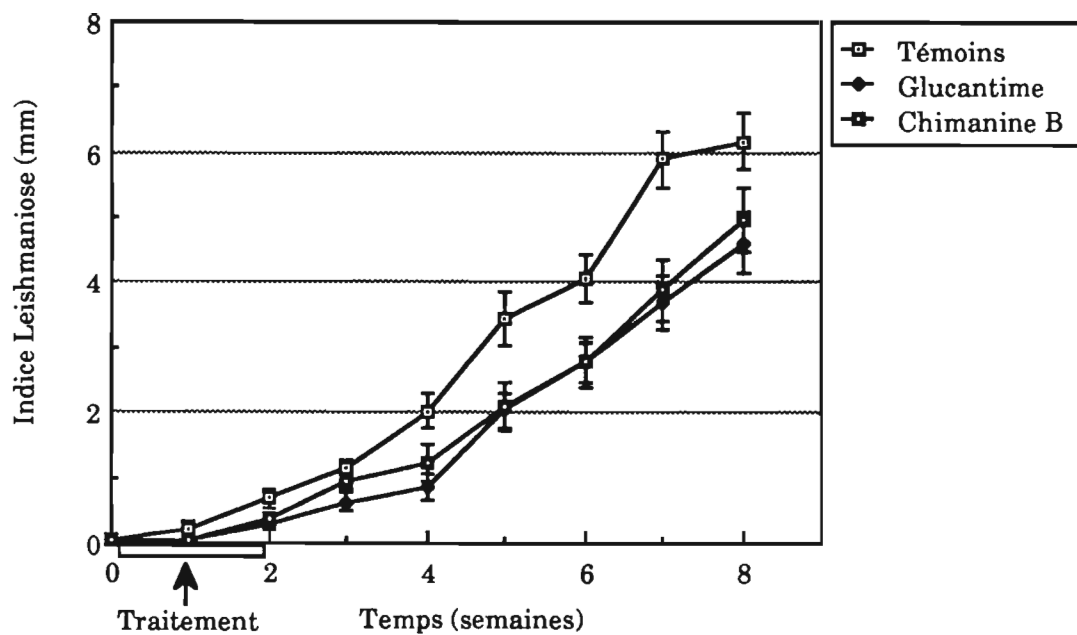
3.4.4.10.2. Activité biologique *in vivo* de la skimmianine administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (Courbe N°3.23)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	16 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 µl)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Au cours des deux premières semaines du protocole, la croissance des lésions est très faible (0,5 mm) chez toutes les souris en expérimentation. Après le traitement, les deux semaines suivantes, il se produit un arrêt de la croissance des lésions chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Dans le même temps les lésions des souris traitées avec la skimmianine et les souris témoins augmentent respectivement de 1,2 et 0,8 mm.

A la 5<sup>ème</sup> semaine, nous mesurons un accroissement des IL d'un millimètre chez toutes les souris traitées avec la skimmianine et les souris



Courbe N° 3.24

Activité de la chimanine B ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

témoins. Cette croissance est continue et constante jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine (voir courbe N°3.23); de 3,3 mm chez les souris témoins et de 3 mm chez les souris traitées avec la skimmianine. Les souris traitées avec la skimmianine développent les mêmes lésions que les souris témoins pendant toute la durée de l'expérimentation.

Ce protocole expérimental ne confirme pas l'activité trouvée lors de l'expérimentation précédente, lorsque la skimmianine est inoculée par voie sous cutanée pendant 14 jours consécutifs.

#### 3.4.4.11. Alcaloïde XI: la 2-(E)-prop-1'-énylquinoléine ou chimanine B

##### 3.4.4.11.1. Activité biologique *in vivo* de la chimanine B sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (Courbe N°3.24)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	1,2x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La chimanine B se présente sous la forme d'une huile relativement facile à administrer. Pendant le traitement, nous avons rencontré le traditionnel problème inflammatoire qui disparaît à son arrêt. A la 4<sup>ème</sup> semaine, les souris traitées avec la chimanine B étaient immobiles et prostrées. Ce trouble du comportement avait disparu la semaine suivante.

Les trois premières semaines de l'expérimentation, les indices leishmaniens n'augmentent pratiquement pas (0,5 mm en moyenne) chez toutes les souris.

A la 4<sup>ème</sup> semaine, l'IL moyen des souris témoins augmente brusquement d'un millimètre, alors qu'il ne croît que de 0,2-0,3 mm chez les souris ayant reçu une thérapie.

A la 5<sup>ème</sup> semaine, il se produit une forte croissance des IL; 1,4 mm chez les souris témoins, 1,2 mm chez les souris ayant reçu un traitement antimonié, et 1,3 mm chez les souris traitées avec la chimanine B. Il est curieux de constater qu'à cette période de l'expérimentation, les traitements médicamenteux ne ralentissent pas la croissance des lésions, c'est à dire la multiplication des parasites à l'endroit de l'infection.

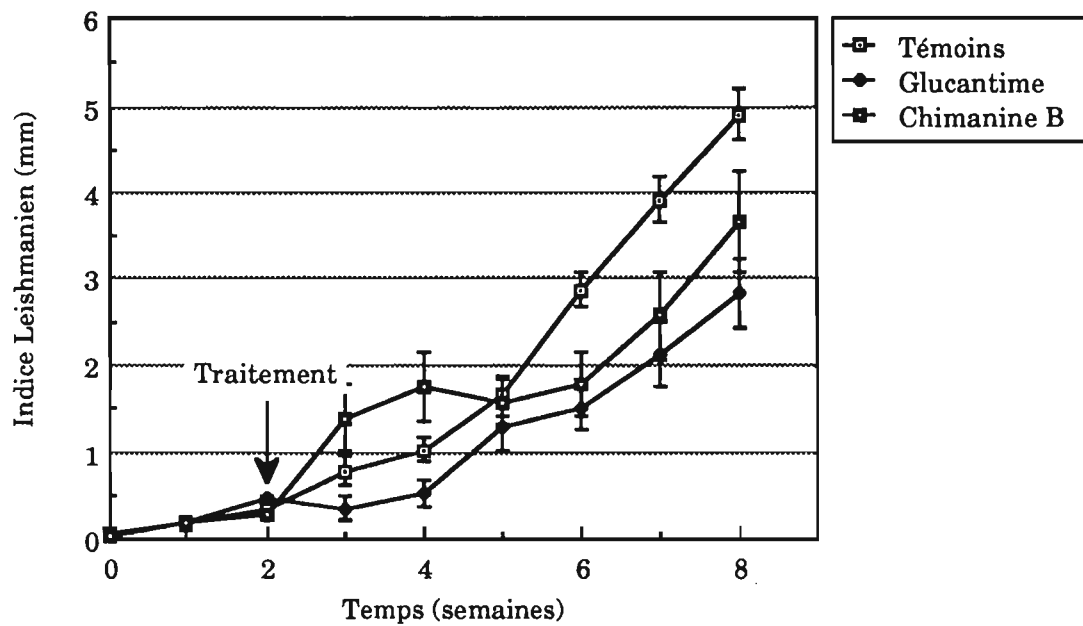
Les trois dernières semaines, il se produit un ralentissement de la croissance des lésions chez les souris traitées; 2,5 mm chez les souris traitées au Glucantime<sup>R</sup>, 2,5 mm chez les souris traitées avec la chimanine B, et 3 mm pour les souris témoins, soit en moyenne 0,8 à 1 mm par semaine.

A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (4,6 mm) est inférieur de 1,6 mm à celui des souris témoins (6,2 mm). L'IL moyen des souris traitées avec la chimanine B est calculé à 5 mm. Ces différences entre les IL du lot témoin et ceux des lots traités étaient plus importantes à la 7<sup>ème</sup> semaine; inférieurs de 2,2 mm pour le lot expérimental Glucantime<sup>R</sup> et de 2,0 mm pour le lot expérimental chimanine B. Cette diminution de l'écart des IL à la 8<sup>ème</sup> semaine semble due à un début d'ulcération des lésions chez les souris témoins.

Les courbes de croissance des IL des souris ayant reçu un traitement (voir courbe N°3.24) sont quasiment superposables tout au long de l'expérimentation. Ces résultats indiquent que la chimanine B, administrée 14 jours consécutifs par voie sous cutanée à des souris Balb/c, est aussi active que le Glucantime<sup>R</sup> pour inhiber la croissance des lésions provoquées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote.

Ce résultat montre une nouvelle fois que les quinoléines substituées en 2 par une chaîne propyle sont efficaces pour inhiber la croissance de *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote sur des souris Balb/c. Néanmoins il serait intéressant d'étendre les essais concernant cette activité leishmanicide à d'autres espèces de leishmanies dans les mêmes conditions expérimentales, telles que *L. donovani* et *L. venezuelensis*.





Courbe N° 3.25

Activité de la chimanine B ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

3.4.4.11.2. Activité biologique *in vivo* de la chimanine B administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (Courbe N°3.25)

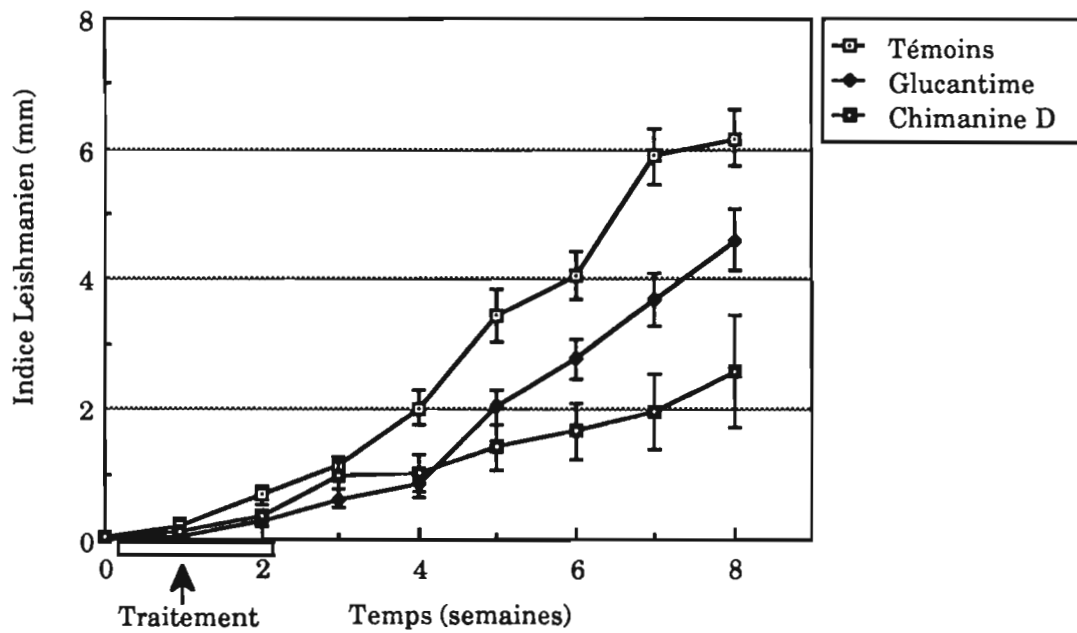
Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$400 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Au cours de cette expérimentation avec l'inoculation locale en dose unique de la chimanine B au niveau de l'infection 14 jours *post*-infection, il se produit trois phases de développement des lésions (voir courbe N° 3.25).

La première, correspondant aux deux premières semaines de l'expérimentation, les IL n'augmentent pratiquement pas chez toutes les souris, 0,3-0,4 mm.

La deuxième phase, les deux semaines suivantes (la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaines), il se produit une inflammation de la patte infectée chez les souris traitées avec la chimanine B (1,5 mm); dans le même temps les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> ne développent aucune lésion (0,1 mm) et l'IL des souris témoins croît de 0,7 mm. La 5<sup>ème</sup> semaine, l'IL des souris traitées avec la chimanine B diminue de 0,2 mm pour être sensiblement égal à celui mesuré chez les souris témoins (1,6 mm) et supérieur de 0,3 mm à celui des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> (1,3 mm).

La troisième phase, de la 5<sup>ème</sup> semaine à la 8<sup>ème</sup> semaine, il y a une forte croissance des lésions, de l'ordre de 1-1,2 mm chaque semaine des souris témoins (3,3 mm en trois semaines). Par contre chez les souris ayant reçu un traitement, il n'est que de 0,6 mm environ chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et celles traitées avec la chimanine B. A la 8<sup>ème</sup> semaine, l'IL les



Courbe N° 3.26

Activité de la chimanine D ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

souris témoins mesure 4,9 mm, celui des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> 2,8 mm et celui des souris traitées avec la chimanine B de 3,7 mm.

En conclusion, cette expérimentation nous a permis de confirmer l'activité de la chimanine B sur *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des souris Balb/c.

#### 3.4.4.12. Alcaloïde XII: la 2-(1',2'-*trans*-époxypropyl) quinoléine ou Chimanine D

##### 3.4.4.12.1. Activité biologique *in vivo* de la chimanine D sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (Courbe N° 3.26)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	1,2x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La chimanine D est une quinoléine substituée en 2 par une chaîne propyle avec une fonction époxy sur les carbones 1' et 2' de la chaîne. Elle se présente sous la forme d'une huile ce qui facilite sa préparation dans le Tween 80 et son injection. Une inflammation de l'épiderme apparaît au cours du traitement à l'endroit des piqûres. Cet effet indésirable se résorbe lorsque le traitement est arrêté.

Lors de ce protocole expérimental (voir courbe N° 3.26), à la 4<sup>ème</sup> semaine, les souris traitées avec la chimanine D semblaient inquiètes, immobiles, prostrées. Ce comportement anormal avait déjà été observé chez les souris

traitées avec la chimanine B ou la skimmianine. Ce problème s'estompe à la 5<sup>ème</sup> semaine.

Les quatre premières semaines de l'expérimentation, les indices leishmaniens sont identiques chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et avec la chimanine D, 1 mm environ. Dans la même période, les IL mesurés chez les souris témoins s'élèvent à 2 mm.

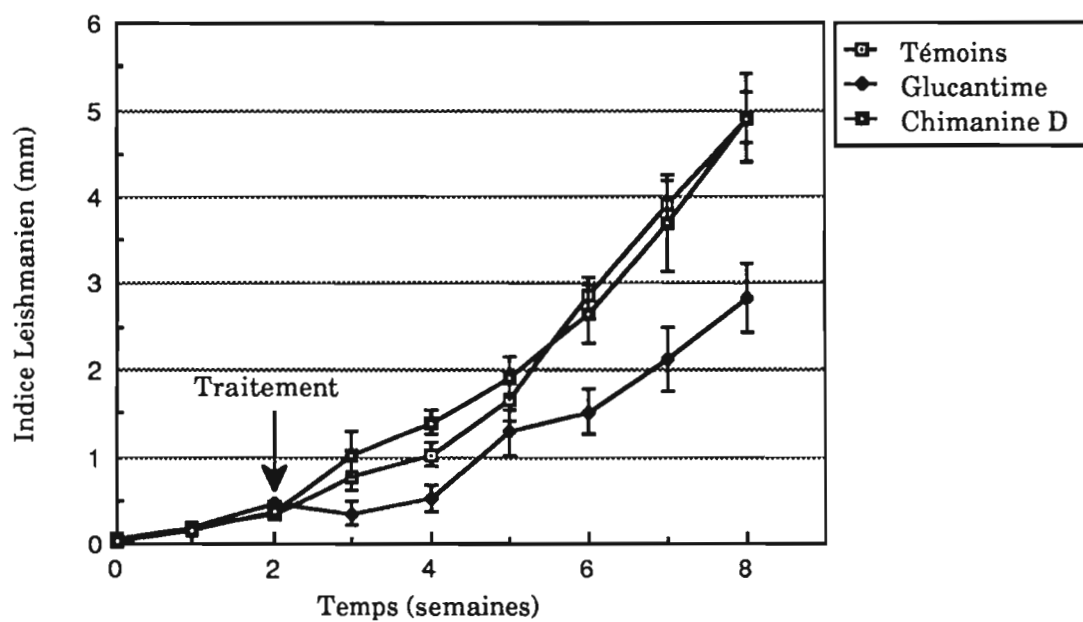
Les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaines, l'écart se creuse entre les IL des souris traitées avec le dérivé antimonié (2,8 mm) et celui des souris traitées avec la chimanine D (1,7 mm).

Les deux dernières semaines d'expérimentation (la 7<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup>), cette différence s'accroît. A la 8<sup>ème</sup> semaine, les IL mesurés sont les suivants; chez les souris témoins, 6,2 mm, chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>, 4,6 mm et chez les souris traitées avec la chimanine D, 2,6 mm.

De tous les essais biologiques *in vivo* réalisés à l'IBBA sur des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote, la chimanine D est la quinoléine de loin la plus active. L'IL mesuré chez les souris traitées avec ce produit est inférieur de 43 % à celui mesuré sur les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

Ces résultats sont très intéressants, mais ils méritent une confirmation sur des modèles impliquant d'autres espèces de leishmanies infectant des souris Balb/c, notamment *L. donovani*, ou avec des souches différentes de *L. amazonensis* au stade amastigote.

Cette expérimentation positive renforce notre impression de relation structure-activité envisagée lors des précédents protocoles, mettant en expérimentation des quinoléines substituées en 2 par une chaîne propyle.



Courbe N° 3.27

Activité de la chimanine D ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Galipea longiflora* Kr. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

3.4.4.12.2. Activité biologique *in vivo* de la chimanine D administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (Courbe N° 3.27)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Suite aux très bons résultats obtenus lors de l'expérimentation précédente avec un traitement par voie générale, il nous est apparu intéressant de vérifier l'efficacité de la chimanine D administrée localement à l'endroit de l'infection.

Les deux premières semaines d'expérimentation, les indices leishmaniens sont très faibles, 0,4-0,5 mm en moyenne. A l'administration du traitement, il apparaît une inflammation de la patte traitée. Ce phénomène disparaît deux semaines après.

A la 4<sup>ème</sup> semaine, les IL des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> est quasiment le même que celui relevé à la deuxième semaine (0,5 mm); par contre ceux des deux autres lots expérimentaux augmentent sensiblement; 1 mm chez les souris témoins et 1,4 mm chez les souris traitées avec la chimanine D. Les quatre dernières semaines, les IL de ces deux dernières augmentent d'un millimètre par semaine. La 8<sup>ème</sup> semaine, ils mesurent, 4,9 mm chez les souris témoins et les souris traitées avec la chimanine D, soit 2,1 mm de plus que l'I.L. mesuré chez les souris traitées avec le dérivé antimonie (2,8 mm).

Cet essai ne confirme pas les bons résultats obtenus lorsque la chimanine D est administrée par voie générale pendant 14 jours consécutifs pour traiter des souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote. Ceci prouve que nous pouvons obtenir des résultats très différents en changeant le mode d'administration du produit et la durée du traitement.

### 3.4.5. Discussion des résultats obtenus lors des essais *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par des leishmanies et traitées avec les douze quinoléines isolées de *Galipea longiflora* Kr.

Douze quinoléines substituées en 2 ont été isolées des écorces de tronc, des écorces de racines et de feuilles de *Galipea longiflora* Kr par guidage biologique (Fournet et al., 1992a). L'activité leishmanicide de ces alcaloïdes devait être confirmée sur les animaux de laboratoire (souris Balb/c) infectées par des leishmanies du complexe *mexicana* au stade amastigote, *L. amazonensis* et *L. venezuelensis*.

Ces essais biologiques sur le modèle animal apportent des enseignements, notamment sur le plan méthodologique. Il n'existe aucun modèle biologique *in vivo* type pour tester des produits sur les leishmanioses cutanées du Nouveau Monde. Pour notre part, nous voulions savoir si les alcaloïdes actifs *in vitro* sur les leishmanies au stade promastigote étaient efficaces sur des animaux de laboratoire infectés par des parasites virulents de leishmaniose cutanée.

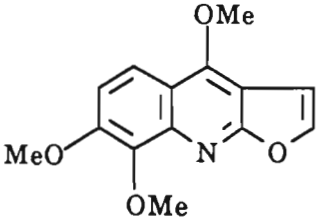
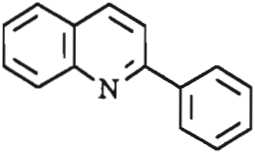
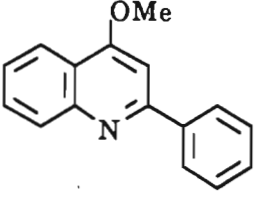
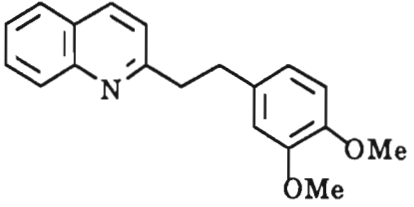
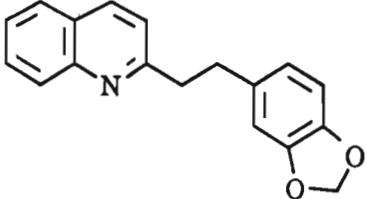
Au départ, le choix des souches de *L. amazonensis* n'a pas été facile. L'inconvénient majeur pour reproduire des leishmanioses cutanées sur le modèle animal est d'éviter une autocicatrisation trop rapide des lésions tout en essayant d'obtenir des lésions de taille suffisante pour observer l'effet d'un médicament.

La première souche utilisée fut *L. amazonensis* (H-142) qui produit chez les souris témoins des granulomes de 3 à 4 mm en huit à dix semaines environ. Ensuite ces lésions stagnent une ou deux semaines puis régressent et cicatrisent. Avec ce modèle, certes les souris traitées avec le médicament de référence développent des lésions de taille inférieure à celles observées chez les souris témoins, mais pas suffisamment pour pouvoir être interprétées statistiquement. Nous nous sommes tournés vers la souche de *L. amazonensis* PH8 qui provoque chez les souris témoins des lésions de 6 à 9 mm en moyenne et qui se différencie au minimum de 2 mm et au maximum de 4 mm avec les souris traitées avec le dérivé antimonié de référence.

L'espèce *L. venezuelensis* (H-3) a été employée plusieurs fois car elle est encore plus virulente que la souche PH8 de *L. amazonensis*, les lésions peuvent dépasser chez quelques individus les 10 mm voire 12 mm en huit semaines et provoquer parfois des lésions faciales.

En ce qui concerne le choix du médicament de référence, le Glucantime<sup>®</sup>, c'est le seul médicament antileishmanien à notre disposition dépourvu d'effets



Formules et noms des alcaloïdes	*Estimation de l'activité des alcaloïdes <i>in vivo</i> sur les différentes souches de leishmanies			
	<i>L. a.</i> (H-142)	<i>L. a.</i> (PH 8)	<i>L. a.</i> (PH 8) voie locale	<i>L. v.</i> (H-3)
 skimmianine		++	0	
 2-phénylquinoléine	0	+ (E.T.) ++ (E.R.)	+	
 4-méthoxy-2-phénylquinoléine		+		
 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine		++		
 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine	0	+++	0	+

\* +++ Moyenne Indice Leishmanien (IL) (mm) de la quinoléine à la 8<sup>ème</sup> semaine < de plus de 10% à l'IL du Glucantime<sup>R</sup>

++ Moyenne IL (mm) de la quinoléine à la 8<sup>ème</sup> semaine = +/- 10% à l'IL du Glucantime<sup>R</sup>

+ Moyenne IL (mm) de la quinoléine à la 8<sup>ème</sup> semaine >10-30% à l'IL du Glucantime<sup>R</sup>

0 Moyenne IL (mm) de la quinoléine à la 8<sup>ème</sup> semaine >30% à l'IL du Glucantime<sup>R</sup>

(+)=Analyse statistique de l'ensemble des mesures permet d'attribuer une activité plus importante

*L. a.* = *Leishmania amazonensis*, *L. v.* = *Leishmania venezuelensis*

Tableau N° 3.5

Synthèse des résultats obtenus avec cinq quinoléines isolées du *Galipea longiflora* Kr. lors des essais *in vivo* sur souris Balb/c infectées par des leishmanies

indésirables ou toxiques. Les autres traitements possibles, la pentamidine ou l'amphotéricine B, n'ont pas la souplesse d'utilisation du Glucantime<sup>R</sup>, et laissent une marge thérapeutique assez faible pour l'expérimentateur.

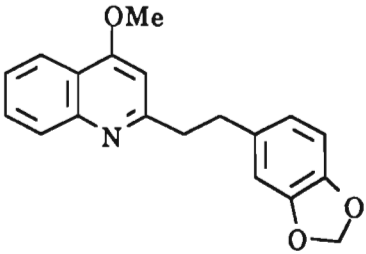
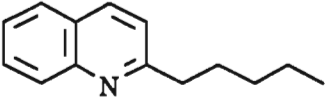
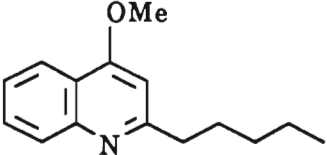
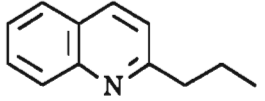
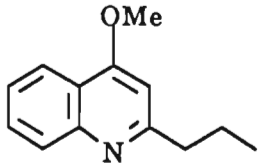
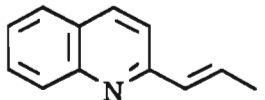
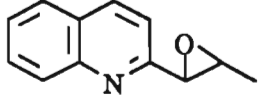
Toutes les quinoléines testées sont apparemment dépourvues de toxicité. Toutes les DL 50 sont supérieures à 400 mg par kg par voie intrapéritonéale et 72 heures après l'administration du produit. Cette faible toxicité a permis d'effectuer des traitements assez longs, de 14 jours consécutifs. Des essais de traitements de 7 jours consécutifs ont été au préalable réalisés avec les quinoléines et le Glucantime<sup>R</sup>. Les écarts de mesure obtenus avec les différents lots expérimentaux étaient trop faibles pour observer un effet thérapeutique d'un produit, même de référence.

Pendant les expérimentations, quelques effets indésirables ont été notés, la formation de nécroses et des inflammations à l'endroit des piqûres pour l'ensemble des composés. Avec quelques quinoléines, il s'est produit, généralement entre la 4<sup>ème</sup> semaine et la 5<sup>ème</sup> semaine, une modification du comportement des souris; signes d'immobilité, de prostration, notamment avec la chimanine B, la chimanine D, la 2-*n*-propylquinoléine et la skimminanine. Tout redevenait normal une semaine après avoir observé ces troubles nerveux.

Après tous ces essais, il apparaît que les produits ayant un aspect huileux sont plus faciles à administrer (les dérivés substitués par des chaînes propyle et pentyle). Ces produits diffusent plus lentement pour donner un effet retard.

L'administration des médicaments localement sur la patte infectée ne reproduit que partiellement l'utilisation en médecine traditionnelle. En effet, l'idéal serait d'appliquer sur la lésion une pommade en incorporant les principes actifs. Dans ce cas, la patte n'est plus le bon endroit pour l'infection parasitaire. Il faudrait trouver un autre endroit d'infection, par exemple la base du dos ou bien les oreilles, cette dernière technique est utilisée avec de bons résultats par une équipe brésilienne (Mortatti et Henriques, 1990).

Dans les tableaux N° 3.5 et 3.6, nous récapitulons les résultats en comparant l'activité des quinoléines au médicament de référence le Glucantime<sup>R</sup>. Nous nous apercevons que les dérivés avec des chaînes propyles sont les plus actifs suivis de près par la furoquinoléine, la skimmianine et ensuite de deux dérivés avec des chaînes phényléthyles, la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine et la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine. Les quinoléines substituées en 2 par une chaîne pentyle ou phényle sont nettement moins actives.

Formules et noms des alcaloïdes	*Estimation de l'activité des alcaloïdes <i>in vivo</i> sur les différentes souches de <i>Leishmania</i>			
	<i>L. a.</i> (H-142)	<i>L. a.</i> PH 8	<i>L. a.</i> (PH 8) voie locale	<i>L. v.</i> H-3
 <p>Cusparine</p>	0	0	0	
 <p>2-<i>n</i>-pentylquinoléine</p>		0		
 <p>4-méthoxy-2-<i>n</i>-pentylquinoléine</p>		+		
 <p>2-<i>n</i>-propylquinoléine</p>	++	+++	+	++
 <p>Chimanine A</p>	0	+		
 <p>Chimanine B</p>		++	+	
 <p>Chimanine D</p>		+++	0	

\*voir légende Tableau N° 3.5

Tableau N°3.6

Synthèse des résultats obtenus avec sept quinoléines isolées du *Galipea longiflora* Kr. lors des essais *in vivo* sur souris Balb/c infectées par des leishmanies

Six quinoléines font parties des produits aussi actifs ou plus actifs que le Glucantime<sup>R</sup>, par ordre décroissant d'activité; la 2-*n*-propylquinoléine, la chimanine D, la 2-(3,4-méthylènedixoyphényléthyl) quinoléine, la chimanine B, la skimmianine et la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine. Trois de ces six produits sont des quinoléines substituées en position 2 par une chaîne propyle, deux sont des dérivés substitués en 2 par une chaîne phényléthyle, et le dernier, la skimmianine est une furoquinoléine (2,3-b).

Parmi ces quinoléines, la 2-*n*-propylquinoléine est le seul produit testé aussi actif que le Glucantime<sup>R</sup> sur *L. venezuelensis* (H-3).

De ces six composés, deux seulement ont été testés sur la souche H-142 de *L. amazonensis*, la 2-*n*-propylquinoléine et la 2-(3,4-méthylènedixoyphényléthyl)quinoléine, un seul s'est révélé aussi actif que le Glucantime<sup>R</sup>, la 2-*n*-propylquinoléine.

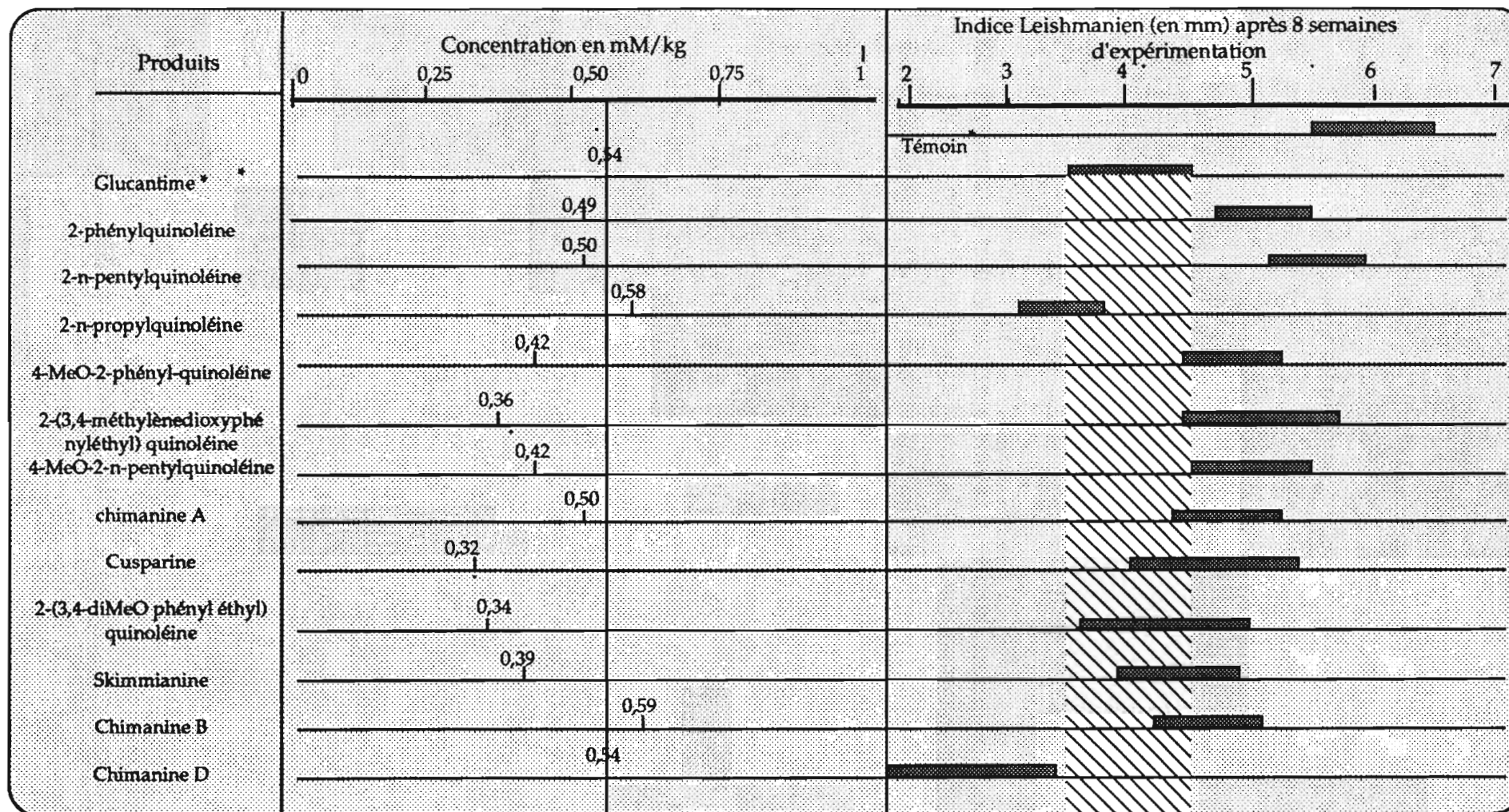
Cinq de ces produits ont été administrés localement à l'endroit de l'infection parasitaire. Seules la 2-*n*-propylquinoléine et la chimanine B possèdent une activité thérapeutique lorsqu'elles sont administrées par cette voie. Cette activité est légèrement inférieure à celle du médicament de référence.

Quatre alcaloïdes sont légèrement moins actifs que le Glucantime<sup>R</sup> sur *L. amazonensis* (PH8), c'est à dire avec des IL supérieurs à la 8<sup>ème</sup> semaine de 10 à 30 % à ceux mesurés chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>; la 2-phénylquinoléine, la 4-méthoxy-2-quinoléine, la chimanine A et la 4-méthoxy-2-*n*-pentylquinoléine.

Deux produits sont inactifs, la cusparine et la 2-*n*-pentylquinoléine. Il est intéressant de noter que la cusparine fait partie des produits actifs lorsque sont pris en compte les essais dans leur ensemble et la concentration molaire de produit administré à chaque souris.

Cette analyse brute des résultats peut être interprétée différemment. En effet, si nous comparons la quantité de produit administré en concentration molaire par rapport au Glucantime<sup>R</sup> nous voyons que certains produits, possédant une activité modérée, deviennent intéressants.

Nous avons pris la moyenne arithmétique des IL à la 8<sup>ème</sup> semaine des protocoles d'infection avec *L. amazonensis* (PH8) de toutes les souris témoins (6,8 mm +/- 0,6) et de toutes les souris ayant reçu un traitement avec du



**Légende:**

■ Indice Leishmanien +/- Intervalle de confiance au risque  $\alpha$  5 %

//// Zone d'activité du Glucantime

\* Moyenne sur 70 souris Balb/c

Schéma N° 3.1.

Activité comparative du Glucantime et de douze produits isolés de *Galipea longiflora* Kr. administrés par voie sous cutanée pendant 14 jours sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH 8)

Glucantime<sup>R</sup> (4,2 mm +/- 0,6) pendant 14 jours consécutifs. Dans ces conditions opératoires, toutes les quinoléines ont été testées, alors que pour les essais d'infection avec *L. amazonensis* (H-142), *L. venezuelensis* (H-3) ainsi que les traitements locaux, seules quelques quinoléines ont pu être expérimentées.

L'efficacité des douze quinoléines sur *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des souris Balb/c peut être classée en quatre groupes (voir schéma N° 3.1).

Le premier groupe comprend les produits plus actifs que le Glucantime<sup>R</sup>, tels que la cusparine, la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine, la skimmianine et la chimanine D. Les trois premières quinoléines ont été testées à une concentration inférieure à 0,40 mM.kg<sup>-1</sup>. A cette concentration, elles sont presque aussi actives que le Glucantime<sup>R</sup>. La chimanine D, testée exactement à la même concentration molaire que le produit de référence (0,54 mM.kg<sup>-1</sup>), donne des IL très nettement inférieurs (2,8 mm au lieu de 4,2 mm pour le Glucantime<sup>R</sup>).

Parmi les quinoléines plus actives que le produit de référence, nous trouvons deux quinoléines substituées en 2 par une chaîne phényléthyle, une quinoléine substituée en 2 par une chaîne propyle, la chimanine D et la seule furoquinoléine testée, la skimmianine.

Dans le deuxième groupe, nous incluons les produits aussi actifs que le Glucantime<sup>R</sup>. Une seule quinoléine fait partie de cette catégorie, la 2-*n*-propylquinoléine, bien qu'elle paraisse plus active que le Glucantime<sup>R</sup> dans le tableau N° 3.6. Ce composé a été testé à 0,58 mM.kg<sup>-1</sup>, soit à une concentration molaire légèrement supérieure à celle du Glucantime<sup>R</sup> (0,54 mM.kg<sup>-1</sup>). C'est la deuxième quinoléine substituée en 2 par une chaîne propyle qui possède une activité égale ou supérieure au Glucantime<sup>R</sup>.

Le troisième groupe comprend les quinoléines moins actives que le Glucantime<sup>R</sup> mais produisant un effet thérapeutique sensible sur les leishmanies. Nous classons dans cette catégorie; la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine, la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine, la 4-méthoxy-2-*n*-pentyl quinoléine, la chimanine A et la chimanine B. Cette dernière figure dans les produits aussi actifs que le Glucantime<sup>R</sup> dans notre première analyse des résultats. En effet, au cours de l'expérimentation impliquant ce produit, les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> produisaient des IL supérieurs (4,6 mm) à ceux pris en compte dans le schéma récapitulatif

l'intégralité des lots expérimentaux (4,2 mm). Un autre élément nous a poussé à classer la chimanine B dans la catégorie des produits un peu moins actifs; elle a été testée à 0,58 mM.kg<sup>-1</sup> soit à une concentration molaire légèrement supérieure à celle du Glucantime<sup>R</sup>.

Le quatrième groupe est composé des quinoléines peu actives, la 2-phénylquinoléine et la 2-*n*-pentylquinoléine. Ces deux produits étaient déjà classés comme peu actifs ou inactifs dans les tableaux 3.5 et 3.6

L'activité leishmanicide des quinoléines isolées de *Galipea longiflora* Kr., une plante employée par les Indiens Chimanes pour traiter la leishmaniose cutanée provoquée par *L. braziliensis*, n'est pas étonnante.

Les quinoléines sont des composés connus pour leurs nombreuses activités biologiques (Farghaly et al., 1990) et leurs applications thérapeutiques; antimalariques (Wommarck et Pearson, 1970), antiprotozoaires (Queener et al., 1991), anti-inflammatoires (Musser et al., 1990), antiallergiques (Youssefyeh et al., 1990), antimicrobiennes (Takada et al., 1990), ou antivirales (Althaus et al., 1990).

Rarement les quinoléines d'origine naturelle substituées en 2 ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité biologique, probablement parce qu'elles sont moins courantes que les dérivés quinoléiques substitués en 4 et en 8. C'est la première fois que ces quinoléines-2 d'origine naturelle sont décrites comme leishmanicides.

A court terme, il est essentiel que l'activité de ces composés soit évaluée sur les autres formes de leishmanioses, en particulier les leishmanioses viscérales (*L. donovani* ou *L. infantum*). La recherche de nouveaux produits actifs sur la leishmaniose viscérale devient une nécessité et une priorité depuis les annonces de plus en plus nombreuses de cas de résistance aux antimonies, en particulier chez des patients touchés par le SIDA (Datry et al., 1990; Lorthoraly et al., 1990).

Contrairement aux leishmanioses cutanées, la leishmaniose viscérale lorsqu'elle n'est pas traitée entraîne la mort du patient touché par cette maladie. Il est probable que les cas de résistance aux traitements classiques de toutes les leishmanioses (cutanées et viscérales) se développeront, et que le besoin de nouvelles molécules actives pour les remplacer devienne une urgence.

Numéros et noms des alcaloïdes	Souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade d'épimastigotes				
	C8 CL1 IC <sub>90</sub> en µg.ml <sup>-1</sup>	Te CL2 IC <sub>90</sub> µg.ml <sup>-1</sup>	Tula. IC <sub>90</sub> µg.ml <sup>-1</sup>	1979 CL7 IC <sub>90</sub> µg.ml <sup>-1</sup>	SC43 CL1 IC <sub>90</sub> µg.ml <sup>-1</sup>
Alcaloïde I 2-phénylquinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde II 2- <i>n</i> -pentylquinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde III 2- <i>n</i> -propylquinoléine	50	50	50	50	50
Alcaloïde IV 4-méthoxy-2-phénylquinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde V 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde VI 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde VIII Cusparine	100	100	100	100	100
Alcaloïde IX 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine	100	100	100	100	100
Alcaloïde X Skimmianine	100	100	100	100	100
Alcaloïde XI Chimanine B	25	25	25	25	25
Alcaloïde XII Chimanine D	50	50	50	50	50
Benznidazol	100	25	50	25	50
Nifurtimox	25	25	25	50	50

Tableau N°3.7

Activité *in vitro* des quinoléines isolées de *Galipea longiflora* Kr., du nifurtimox et du benznidazol sur cinq souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote



### 3.4.6. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote

En même temps que les essais biologiques *in vitro* de criblage sur *Leishmania* ssp., des essais *in vitro* ont été réalisés sur *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote, un protozoaire voisin des leishmanies responsable de la maladie de Chagas. Ces essais sont qualitatifs et donnent une idée de l'activité des produits testés sur les trypanosomes. Toutes les quinoléines isolées de *Galipea longiflora* sont actives *in vitro* sur les cinq souches de *T. cruzi* à la concentration de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Tableau N° 3.7).

Le benznidazol et le nifurtimox, les deux seuls médicaments commercialisés pour traiter la maladie de Chagas en phase aiguë, sont pris comme médicaments de référence. Aucune différence n'a été observée entre le comportement des différents zymodèmes de *T. cruzi* vis à vis des médicaments, sauf pour le benznidazol et à un degré moindre pour le nifurtimox.

Un seul produit est particulièrement actif à 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , la chimanine B.

Deux quinoléines lysent complètement les épimastigotes à 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , la 2-*n*-propylquinoléine et la chimanine D. Il est à noter que les composés les plus actifs sont encore trois quinoléines substituées en 2 par une chaîne propyle. Cela démontre que la relation structure-activité soupçonnée lors des essais biologiques *in vivo* avec les leishmanies se renforce. Avec les autres quinoléines, les parasites sont lysés à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Tous ces résultats doivent être confirmés au minimum sur les formes circulantes du parasites *in vitro*, les trypomastigotes et surtout sur les amastigotes de *T. cruzi* *in vitro* et *in vivo* en culture cellulaire ou sur le modèle animal (souris Balb/c).

Noms des alcaloïdes	Concentration initiale en parasites par ml	Concentration de parasites après 24 h de contact avec les produits à 200 µg.ml <sup>-1</sup>
Alcaloïdes totaux des écorces de tronc	3,2 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>
Alcaloïdes totaux des écorces de racines	3,2 x 10 <sup>6</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>
2-phénylquinoléine	4,4 x 10 <sup>6</sup>	5,3 x 10 <sup>5</sup>
2- <i>n</i> -pentylquinoléine	4,4 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>
2- <i>n</i> -propylquinoléine	1 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
4-méthoxy-2-phénylquinoléine	4,2 x 10 <sup>6</sup>	1,6 x 10 <sup>5</sup>
2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)quinoléine	4,2 x 10 <sup>6</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>
4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	4,4 x 10 <sup>6</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>
Cusparine	4,4 x 10 <sup>6</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>
2-(3,4-diméthoxyphényléthyl)quinoléine	4,4 x 10 <sup>6</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup>
Skimmianine	4,2 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>
Chimarine B	1 x 10 <sup>7</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>
Chimarine D	1 x 10 <sup>7</sup>	9 x 10 <sup>4</sup>
Violet de gentiane	1 x 10 <sup>7</sup>	0

Tableau N° 3.8.

Activité *in vitro* des quinoléines isolées de *Galipea longiflora* et du violet de gentiane (médicament de référence) à 4° C pendant 24 h sur *Trypanosoma cruzi* (Y) au stade trypomastigote

### 3.4.7. Essais biologiques *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* (souche Y) au stade trypomastigote

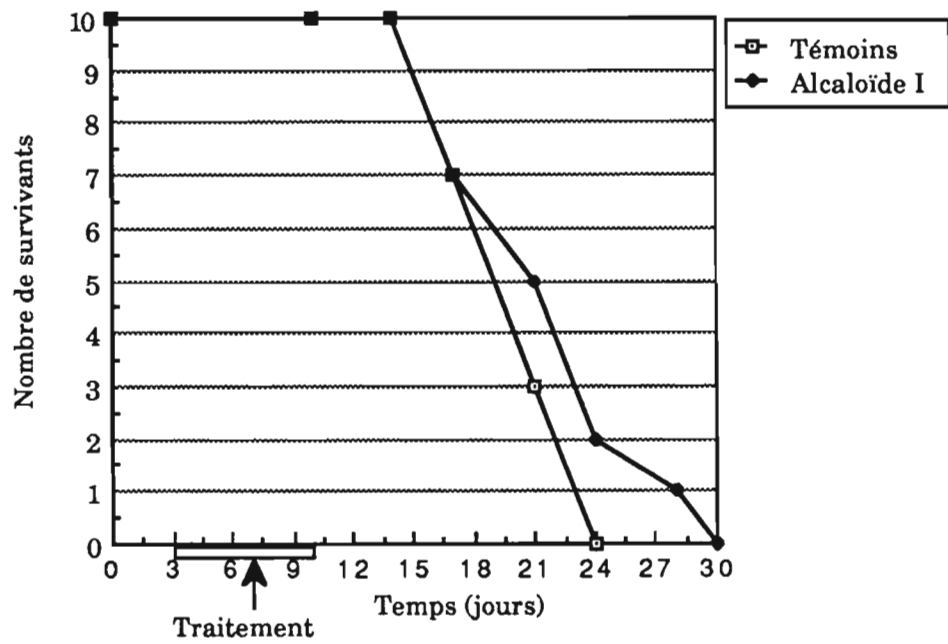
Après les essais *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote (3.4.6), il était intéressant de savoir si les quinoléines isolées de *Galipea longiflora* confirmaient leur activité sur les formes libres dans le sang, les trypomastigotes.

Aucune quinoléine n'est active sur *T. cruzi* au stade trypomastigote; dans le meilleur des cas, il se produit une inhibition de 30 % des parasites (voir Tableau N° 3.7) , ce qui est peu pour un test où tous les parasites doivent disparaître. Ce test est destiné à rechercher un nouvel additif inhibant tous les parasites susceptibles de contaminer les lots de sang conservés à 4° C dans les banques de sang, afin d'éviter de transmettre la maladie de Chagas aux personnes non contaminées par *T. cruzi*. Ce mode de transmission de la maladie de Chagas toucherait 10 % des personnes transfusées dans les zones d'endémies de la maladie de Chagas en Amérique latine.

Le seul produit employé et efficace est le violet de gentiane qui est dépourvu de toxicité, mais qui a l'inconvénient d'être violet.

En conclusion, les quinoléines isolées de *Galipea longiflora* ne présentent pas le profil de produits susceptibles de remplacer le violet de gentiane, car elles sont sans efficacité sur *Trypanosoma cruzi* au stade trypomastigote.

Tous ces essais ont été réalisés à Asunción au Paraguay à l'Instituto de Investigaciones de las Ciencias de la Salud (I.I.C.S.) au laboratoire de parasitologie sous la direction de la Dra. A. ROJAS DE ARIAS.



Courbe N°3.28

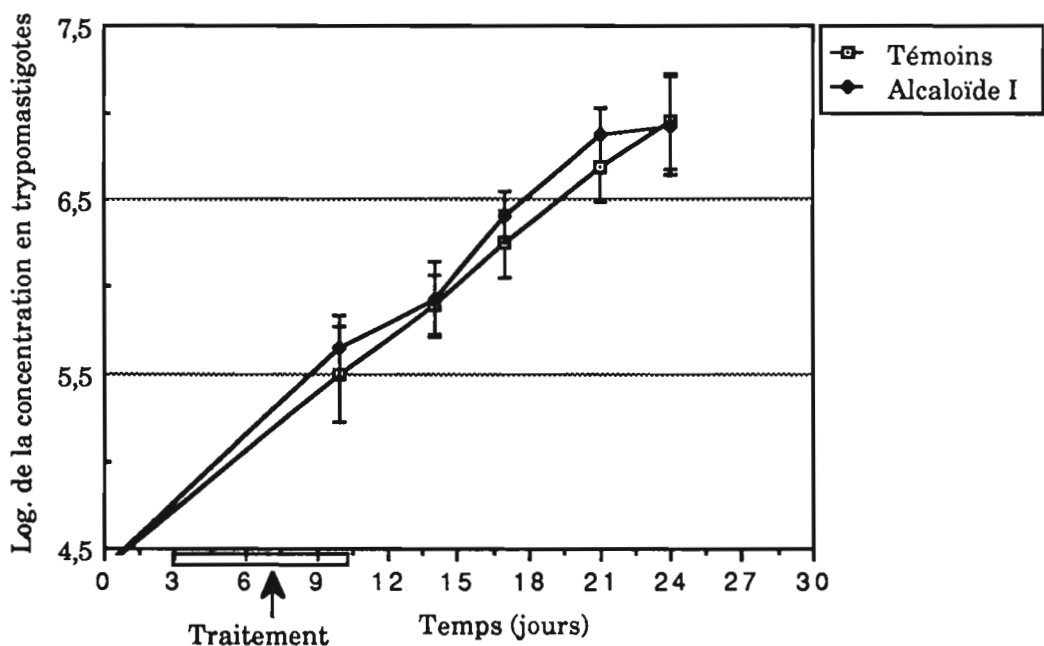
Courbe de la mortalité des souris Balb/c infectées par 25.000 trypomastigotes de *T. cruzi* (Tehuentepec) et traitées avec la 2-phénylquinoléine

### 3.4.8. Essai biologique *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par *Trypanosoma cruzi* (Tehuentepec) au stade trypomastigote

Une seule quinoléine a pu être testée sur le modèle souris Balb/c infectées par une dose létale de trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la souche Tehuentepec (25.000 trypomastigotes), l'alcaloïde majoritaire du *Galipea longiflora*, la 2-phénylquinoléine.

Le traitement avec la 2-phénylquinoléine par voie sous cutanée trois jours après l'infection parasitaire à raison de 100 mg.kg<sup>-1</sup> pendant une semaine n'a pas empêché le développement de la parasitémie, ni la mortalité de 100 % de souris au 24<sup>ème</sup> jour (voir courbes N° 3.28 et 3.29). Le traitement avec la 2-phénylquinoléine ne protège donc pas les souris de l'infection par des trypanosomes de *T. cruzi*. Les souris traitées avec la 2-phénylquinoléine ne diffèrent pas des souris infectées non traitées.

En conclusion, la 2-phénylquinoléine ne présente aucun effet thérapeutique *in vivo* suite à une infection de souris Balb/c par *Trypanosoma cruzi* au stade trypomastigote.



Courbe N° 3.29

Courbe de la parasitémie des souris Balb/c infectées par 25.000 trypanomastigotes de *T. cruzi* (Tehuentepec) et traitées avec la 2-phénylquinoléine

**QUATRIEME PARTIE**

**ETUDES CHIMIQUE  
ET BIOLOGIQUE DE  
*PERA BENENSIS* Rusby  
(EUPHORBIACEAE)**

## 4.1. ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMA- COLOGIQUE DE *PERA BENENSIS* RUSBY (EUPHORBIACEAE)

### 4.1.1. Etude botanique du genre *Pera* et de *Pera benensis* Rusby

Le genre *Pera* appartient à la famille des Euphorbiacées. Ce genre se rencontre dans les régions tropicales du Nouveau Monde, l'Amérique Centrale (Croizat, 1942) et l'Amérique du Sud notamment dans les Guyanes, le Brésil et la Bolivie (Rusby, 1927).

A notre connaissance, ce genre n'a pas fait l'objet d'une révision systématique récente par les spécialistes de la famille des Euphorbiacées. Ce manque de repère taxonomique pour identifier les espèces du genre *Pera* ne nous a pas permis de déterminer notre échantillon d'herbier rapidement, ni de nous donner des repères chimiotaxonomiques lors des études biologique et chimique.

Les *Pera* sont des arbres de 15 à 20 m de haut, poussant généralement dans les forêts de régénération des régions tropicales humides près des rivières.

*Pera benensis* Rusby a été décrit pour la première fois par Rusby (Rusby, 1927). C'est un arbre d'environ 20 m de haut, de 30-40 cm de diamètre, à l'écorce jaune. Les feuilles sont légèrement hirsutes, minces, cannelées au dessus du limbe. Celui-ci mesure 6 à 12 cm de long sur 4 à 7 cm de large, il est ovale, arrondi à la base, très légèrement obtus au sommet, entier, d'un vert profond, glabre sur sa partie supérieure. Les nervures sont légèrement saillantes sur les deux faces du limbe. Les nervures secondaires sont nombreuses. Les pétioles des feuilles mesurent 1 à 2 cm de long.

Les inflorescences se présentent en cymes, petites, subsessiles à la base des rameaux. Les fruits, rouges à maturité, mesurent 5 à 8 mm de diamètre. Ils contiennent trois graines de 5 à 6 mm de long, ovoïdes, légèrement comprimées, noires, très brillantes. Au contact de la peau, les fruits provoquent une irritation de l'épiderme.

*Pera benensis* a été décrit pour la première fois à partir d'un échantillon collecté au confluent des fleuves Beni et Madre de Dios près de Riberalta (Beni) au Nord de la Bolivie par Rusby en Août 1886.

Les échantillons ramassés par nos soins seraient les deuxièmes récoltes de *Pera benensis* (A.F. 781, A.F. 846 et A.F. 890) répertoriées pour cette espèce en Bolivie; il est vrai que cet arbre se rencontre rarement d'après nos informateurs Chimanes.

#### 4.1.2. Ethnopharmacologie de *Pera benensis* Rusby

Les Chimanes connaissent bien cet arbre quoique très rare. Ils l'appellent "apañiki". Ils l'utilisent exclusivement pour le traitement des lésions provoquées par les leishmanioses cutanées ou espundia (*Leishmania braziliensis*). Son écorce très jaune dégage une amertume très particulière, elle noircit la peau lorsqu'on la touche. Elle est appliquée généralement fraîche sur la lésion après avoir été préalablement grattée sur le tronc de l'arbre avec un instrument comme une machette pour la réduire en poudre. Les applications des écorces d'"apañiki" provoquent une sensation de chaleur. Le traitement est renouvelé deux fois par jour jusqu'à cicatrisation complète de la lésion. Nos informateurs Chimanes nous ont indiqué que seules les écorces de tronc étaient employées pour traiter les leishmanioses cutanées. Ces mêmes informateurs nous ont signalé que les écorces de tronc et les fruits de cet arbre étaient très toxiques et qu'il ne fallait en aucun cas les consommer. A notre grande surprise, nous avons remarqué que les enfants Chimanes connaissaient la toxicité de ces graines noires très brillantes avec lesquelles ils jouent et confectionnent parfois des colliers.

#### 4.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS PAR GUIDAGE BIOLOGIQUE

Les échantillons étudiés proviennent de Fatima de Chimanes (Beni et ont été récoltés en septembre 1987 (A.F. 781) et en Août 1988 (A.F. 846). L'échantillon A.F. 781 a été employé pour effectuer les tests biologiques préliminaires de criblage et le lot A.F. 846 aux études chimiques et biologiques approfondies de *Pera benensis*. Les graines et les feuilles ont été récoltées en octobre 1989 et appartiennent au lot A.F. 890. Tous ces échantillons d'herbiers ont été déterminés par le Dr. S. BECK, responsable de l'Herbier National de Bolivie à La Paz.

Chaque partie de la plante a fait l'objet de tests biologiques de criblage *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* au stade promastigote et sur plusieurs souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote. Seuls les extraits préparés à partir des écorces de racines et des écorces de tronc sont actifs *in vitro* à 100 µg.ml<sup>-1</sup> sur les parasites.

Suite à des tests chimiques préliminaires sur les écorces de tronc et de



**Légendes:**

Act. Biol. = Activité biologique

*Leish.* = *Leishmania* ssp.

*T. c.* = *Trypanosoma cruzi*

+++++ = lyse des parasites à 5 µg.ml-1

++++ = lyse des parasites à 10 µg.ml-1

+++ = lyse des parasites à 25 µg.ml-1

++ = lyse des parasites à 50 µg.ml-1

+ = lyse des parasites à 100 µg.ml-1

0 = Aucune activité à 100 µg .ml-1

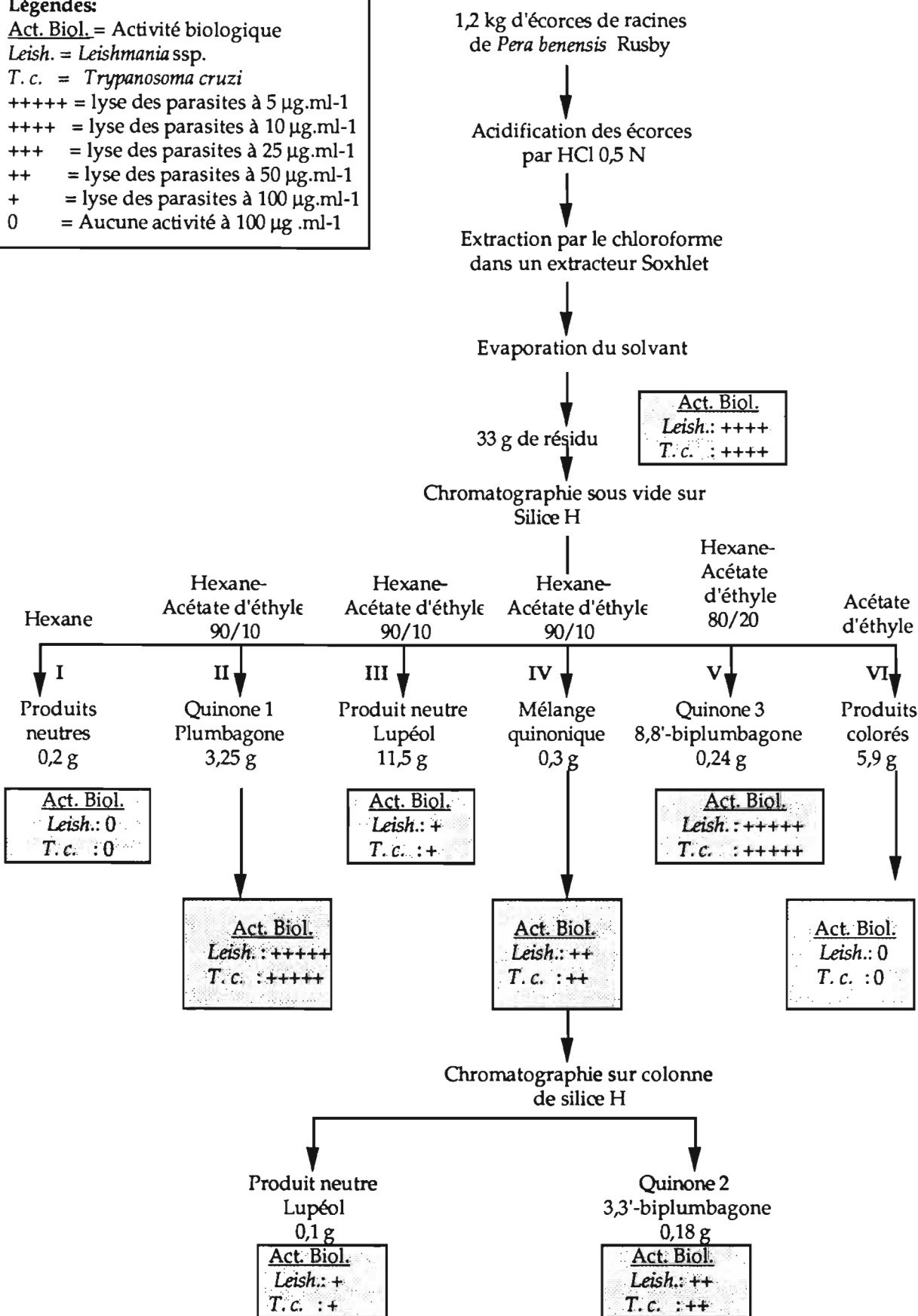


Figure N° 53 Extraction et isolement des principes actifs  
des écorces de racines de *Pera benensis* Rusby

racines, la présence de quinones a été détectée par extraction organique (chloroforme) de ces organes préalablement acidifiés par de l'acide chlorhydrique 0,5 N. L'extrait organique obtenu, très coloré, est ensuite épuisé dans une ampoule à décanter par de l'hydroxyde de sodium 0,5 N. La présence de quinones donne à cette phase aqueuse une coloration rouge violacée. Elle est acidifiée par HCl 0,5 N, puis extraite par le chloroforme. L'extrait organique obtenu est évaporé, chromatographié sur couche mince de silice (CCM) (DC Alufolien 60 F 254, MERCK 5554) avec comme solvant de migration le mélange hexane-acétate d'éthyle 90/10. La plaque de silice est révélée par la potasse alcoolique à 5 %. Il apparaît trois taches de coloration variant du mauve au violet.

Les essais préliminaires biologiques (voir chapitre II) ont montré que l'activité antiparasitaire se trouvait dans ces extraits quinoniques.

L'isolement des différents composés actifs a fait largement appel aux techniques chromatographiques, notamment la chromatographie sous pression réduite sur Büchner, sur Kieselgel 60 H (MERCK 7736), permettant d'effectuer une première séparation grossière sur une quantité très importante de matière première (plus de 100 g).

Dans un deuxième temps, les fractions obtenues sont chromatographiées sur des colonnes de silice 60 H (MERCK 7736) avec une pression de 0,35 bar. Les solvants employés sont les suivants: hexane-acétate d'éthyle 90/10 et 80/20 pour les CCM, et les mêmes mélanges de polarité croissante jusqu'à l'acétate d'éthyle pur au stade préparatif.

#### **4.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines de *Pera benensis* Rusby (voir figure N° 53)**

1,2 kg d'écorces de racines sont acidifiées par l'acide chlorhydrique 0,5 N puis extraites dans un extracteur de type Soxhlet par le chloroforme jusqu'à obtention dans l'extracteur d'un jus incolore. L'extrait est concentré sous pression réduite, séché, pesé (33 g) et testé *in vitro* sur les parasites en milieu de culture. Il se produit une lyse totale des parasites à 10 µg.ml<sup>-1</sup>. La totalité de l'extrait est chromatographié sous pression réduite sur un filtre en verre fritté Büchner avec de la silice 60 H, l'élution débutant à l'hexane.

Les fractions identiques sur CCM sont réunies puis testées *in vitro* sur les parasites. Les six fractions se composent comme suit:

- La fraction I (0,2 g), huileuse, ne contient aucun produit se révélant à la potasse alcoolique à 5 %, mais uniquement des dérivés terpéniques révélés

par le réactif à la vanilline sulfurique. Cette fraction est inactive *in vitro* sur les parasites à la concentration de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

- La fraction II (3,25 g) renferme un produit majoritaire rouge-orange qui cristallise dans le solvant de colonne (hexane-acétate d'éthyle 90/10) et se révèle en mauve à la potasse alcoolique à 5 %. Après évaporation du solvant sous pression réduite, nous obtenons 3,25 g de quinone 1 identifiée à la plumbagone. Sa teneur dans les écorces de racines est estimée à 2,7  $\text{g.kg}^{-1}$ . Cette fraction est active *in vitro* sur les parasites à 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

- La fraction III (11,5 g), élue au mélange hexane-acétate d'éthyle 90/10, renferme essentiellement un produit blanc d'aspect cartonneux, non quinonique, qui se révèle à la vanilline sulfurique. Ce produit, qui s'est avéré être le lupéol, est actif *in vitro* à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les parasites.

- La fraction IV (0,3 g) contient un produit de nature quinonique. Cette fraction est composée du terpène isolé dans la fraction III et d'une quinone différente de la quinone 1 se révélant sous la forme d'une tache violette avec la potasse alcoolique à 5 % sur CCM. Cette fraction est active *in vitro* à 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  sur les parasites. Elle fait l'objet d'une séparation sur une colonne de silice 60 H sous une pression de 0,35 bar. Le terpène est élué le premier (0,1 g) puis la quinone 2 (0,18 g) identifiée à la 3,3'-biplumbagone. Cette quinone lyse totalement les parasites à la concentration de 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Le rendement en quinone 2 est évalué à 150 mg par kilogramme d'écorces de racines.

- La fraction V (0,24 g) élue au mélange hexane-acétate d'éthyle 80-20 contient exclusivement une autre quinone qui se révèle en rose sur CCM avec la potasse alcoolique à 5 %. Cette quinone 3, identifiée à la 8,8'-biplumbagone, est active *in vitro* sur les parasites à 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Sa teneur est estimée à 200 mg par kilogramme d'écorces de racines.

- La fraction VI (5,9 g), élue à l'acétate d'éthyle, est composée de plusieurs produits de couleur brune, polaires, qui ne se révèlent pas avec la potasse alcoolique à 5 %. L'activité biologique *in vitro* de cet extrait est négative à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les parasites en culture.

Finalement, trois quinones actives et un produit terpénique très majoritaire ont été isolés des écorces de racines de *Pera benensis* Rusby.

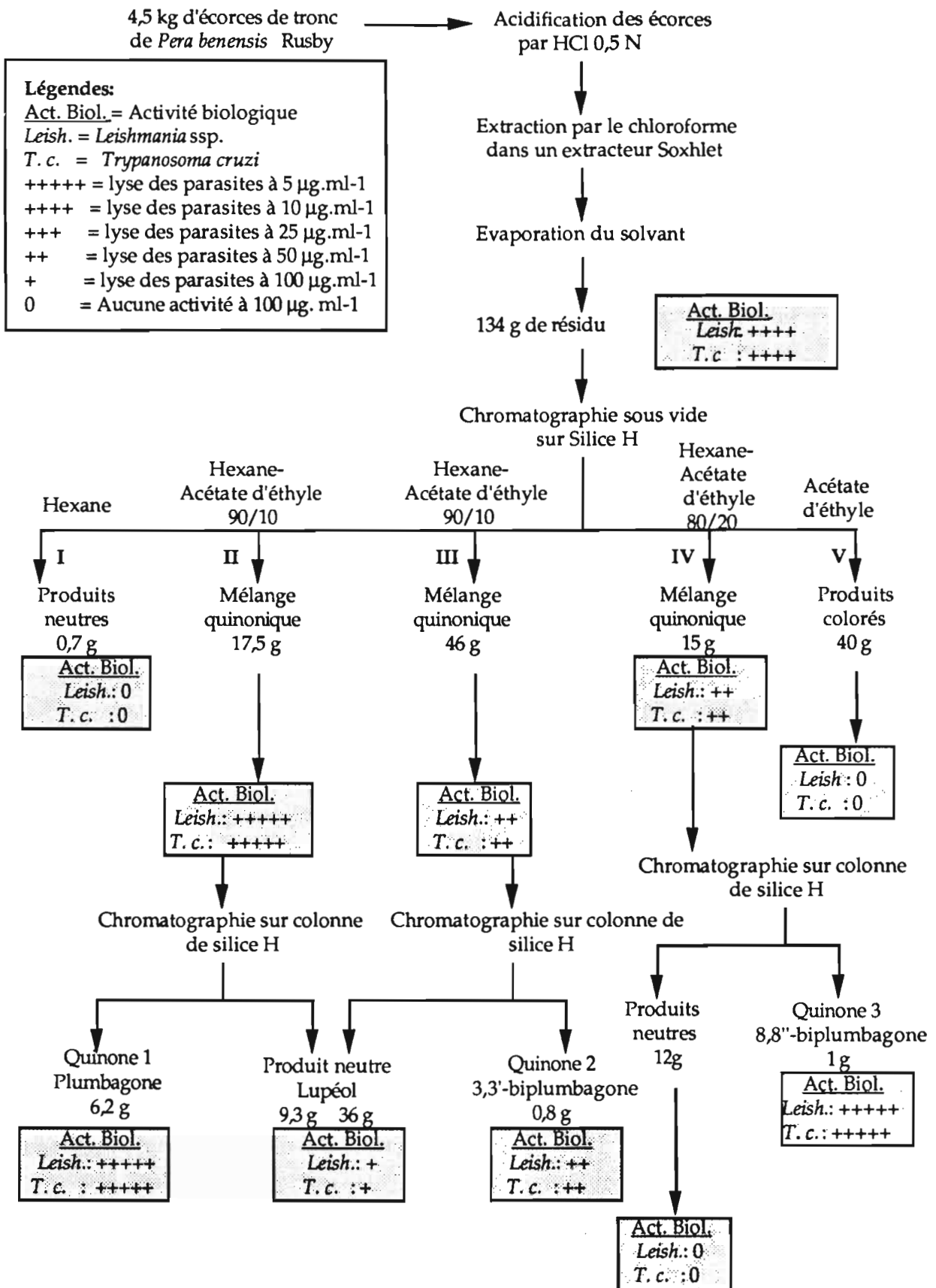


Figure N°54  
Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de *Pera benensis* Rusby

#### 4.2.2. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de *Pera benensis* Rusby (voir figure N° 54)

4,5 kg d'écorces de tronc sont acidifiées par l'acide chlorhydrique 0,5 N, puis extraits dans un extracteur de type Soxhlet par le chloroforme pendant une dizaine d'heures. Après évaporation du solvant, séchage sous pression réduite de l'extrait, il reste un résidu quinonique de 134 g de couleur brune. Ce résidu est actif *in vitro* sur les leishmanies et les trypanosomes à  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

L'analyse de l'extrait sur plaque chromatographique de silice (CCM), avec comme solvants de migration les mélanges hexane-acétate d'éthyle 90/10 ou 80/20, montre une grande ressemblance entre la composition quinonique des extraits obtenus soit à partir des écorces de tronc, soit des écorces de racines. Nous observons la présence des trois quinones communes ainsi que le terpène majoritaire et les produits polaires de couleur brune.

Les 134 g d'extrait sont chromatographiés sous pression réduite sur silice 60 H sur un filtre en verre fritté Büchner afin d'effectuer une première séparation grossière des divers constituants. L'élution commence à l'hexane puis continue en augmentant la polarité avec des mélanges hexane-acétate d'éthyle jusqu'à l'acétate d'éthyle pur.

Cinq fractions qualitativement très différentes sont obtenues et feront l'objet par la suite d'une séparation plus fine par chromatographie sur colonne de silice 60 H (MERCK 7736) sous une pression de 0,35 bar.

La fraction I (0,7 g), huileuse, est inactive *in vitro* à  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les parasites en culture. Sur CCM, elle ne contient que des produits neutres se révélant à la vanilline sulfurique. Elle est laissée de côté.

La fraction II (17,5 g) est active *in vitro* à  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les parasites. Elle renferme essentiellement deux produits, une quinone qui se révèle à la potasse alcoolique à 5 % et paraît identique par comparaison des Rf sur CCM à la quinone 1 déjà isolée dans les écorces de racines, et un terpène. Cette fraction est chromatographiée sur une colonne de silice 60 H sous une pression de 0,35 bar et éluee par le mélange hexane-acétate d'éthyle 90-10. Cette chromatographie permet de séparer les deux composants de la fraction II; sont obtenus 6,2 g de la quinone 1 et 9,3 g du produit neutre. L'activité biologique *in vitro* de ces deux composés est la suivante:  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  pour la quinone 1 et  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  pour le produit neutre. Ce terpène semble identique sur CCM au lupéol isolé des écorces de racines. La teneur en quinone 1, la

plumbagone, est estimée à 1,3 g par kilogramme d'écorces de tronc.

La fraction III (46 g) renferme deux produits majoritaires, un produit neutre de même Rf que celui isolé à partir de la fraction II et une quinone se colorant en violet avec la potasse alcoolique à 5 %, et de même Rf que la quinone 2 isolée à partir des écorces de racines.

Le produit neutre paraît identique au lupéol déjà isolé dans la fraction II et obtenu en abondance dans les écorces de racines. La fraction III est active *in vitro* à 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les leishmanies et les trypanosomes. Cette fraction est chromatographiée sur une colonne de silice 60 H sous une pression de 0,35 bar et éluée par le mélange hexane-acétate d'éthyle 90-10. Finalement les deux produits majoritaires sont isolés, 0,8 g de la quinone 2 et 36 g du terpène. Ces deux produits sont actifs *in vitro* sur les parasites aux concentrations suivantes: 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour la quinone 2 et 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour le terpène. La teneur en quinone 2, identifiée à la 3,3'-biplumbagone, est estimée à 180 mg par kilogramme d'écorces de tronc et celle en terpène majoritaire à 10  $\text{g.kg}^{-1}$ .

Par comparaison sur CCM avec la fraction correspondante isolée des écorces de racines, il semble que la fraction IV (15 g) renferme la quinone 3 isolée des écorces de racines accompagnée d'une quantité importante de produits neutres se révélant à la vanilline sulfurique. Cette fraction IV est active *in vitro* à 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les leishmanies et les trypanosomes. Pour isoler la quinone 3, la fraction IV est chromatographiée sur une colonne de silice 60 H sous une pression de 0,35 bar. Les produits neutres (12 g) sont élués par le mélange hexane-acétate d'éthyle 90/10 et la quinone 3 (1 g) par le mélange hexane-acétate d'éthyle 80-20. La quinone 3 présente les mêmes caractéristiques en CCM, même Rf et même coloration à la potasse alcoolique que la quinone 3 déjà isolée à partir des écorces de racines. Les deux produits obtenus sont testés sur les parasites *in vitro*; seule la quinone 3 lyse totalement les parasites, à la concentration de 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  alors que les produits neutres n'ont aucune activité à la concentration de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Le rendement en quinone 3 dans les écorces du tronc est estimé à 220  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

La fraction V (40 g) renferme des produits neutres et des produits de couleur brunâtre. L'activité biologique *in vitro* de cette fraction sur les parasites est négative à la concentration de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Avec les feuilles et les fruits de *Pera benensis* plusieurs extraits ont été préparés dans divers solvants organiques, dans les mêmes conditions que pour les écorces de tronc et les écorces de racines. Tous les tests *in vitro* effectués sur les leishmanies et les trypanosomes avec les différents extraits se sont révélés négatifs à la concentration de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Sur tous les extraits, la réaction de Bornträger est négative, ce qui paraît un peu surprenant pour les fruits qui laissent des traces jaunes sur l'épiderme noircissant à la lumière. Ces fruits dégagent une amertume semblable à celle rencontrée dans les écorces de tronc et les écorces de racines de *Pera benensis*.

### **4.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES QUINONES ACTIVES *IN VITRO* DU *PERA BENENSIS* RUSBY.**

#### **Appareillage**

Les points de fusion sont mesurés en tubes capillaires et ne sont pas corrigés.

Les spectres sont enregistrés sur les appareils suivants:

- Ultraviolet, PHILIPS PU 8725, éthanol ( $\lambda$  max,  $\log \epsilon$ )
- Infrarouge, PERKIN ELMER 257, KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )
- RMN  $^1\text{H}$ , BRUKER AC 200 P,  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7,27$  ppm)
- RMN  $^{13}\text{C}$ , BRUKER AC 200 P à 50 MHz
- Masse, NERMAG R 1010 C en impact électronique (IE) à 70 eV ( $m/z$  (%))

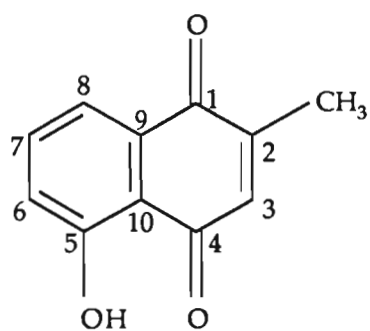


Figure N° 55  
Formule chimique de la plumbagone

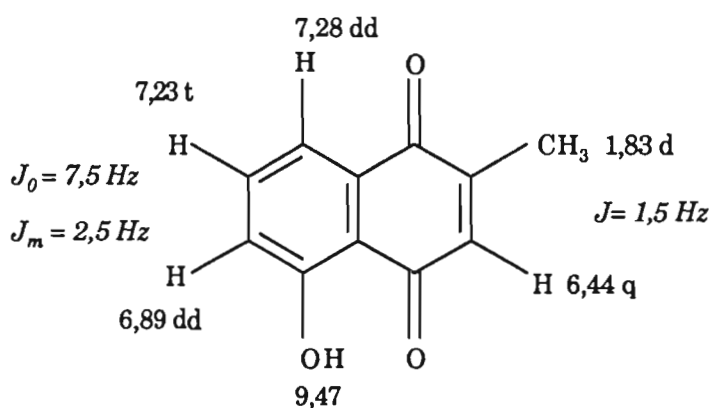


Figure N° 56  
RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la plumbagone

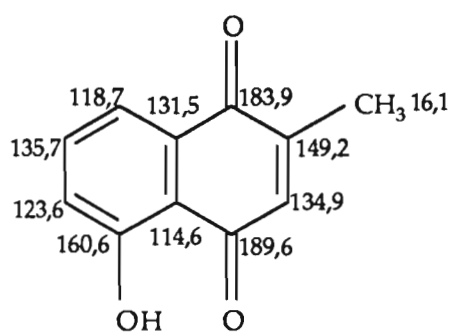


Figure N° 57  
RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la plumbagone



### 4.3.1. Quinone 1: la plumbagone

La quinone 1 est présente dans les écorces de racines et les écorces de tronc à des concentrations élevées . Elle est peu polaire; elle est éluée par le mélange hexane- acétate d'éthyle 90/10 dans lequel elle cristallise.

Elle se présente sous la forme de cristaux rouge-orange, son point de fusion est de 78-79 °C.

La spectrométrie de masse à haute résolution donne pour la quinone 1 une formule brute  $C_{11}H_8O_3$  (masse calculée: 188,04734; masse trouvée: 188,0469). Le spectre montre des fragmentations importantes à  $m/z$  173 (M- $CH_3$ ) et  $m/z$  160 (M-CO).

Le spectre de RMN  $^1H$  (Figure N° 56) indique les signaux correspondant à 3 protons aromatiques adjacents à 7,28, 7,23 et 6,89 ppm, et un proton à 9,47 ppm attribuable à un hydroxyle. On observe en outre un doublet fin de 3 protons ( $J = 1,5 Hz$ ) à 1,83 ppm et un proton résonant à 6,44 ppm sous forme d'un quadruplet ( $J = 1,5 Hz$ ) qui peut être situé sur le carbone adjacent. L'ensemble de ces données permet donc de proposer pour la quinone 1 une structure de naphtoquinone porteuse d'un méthyle en position 2 et d'un hydroxyle qui peut être localisé en 5 ou 8.

La spectrométrie de RMN  $^{13}C$  permet de confirmer cette hypothèse par la présence de deux signaux à 183,9 et 189,6 ppm attribuables aux deux carbonyles, et d'un signal à 16,1 ppm attribué au groupement méthyle.

Toutes ces données physico-chimiques correspondent à une naphtoquinone très connue dans le règne végétal et isolée pour la première fois en 1828, la plumbagone (Sankaram et al., 1986).

Une comparaison avec un échantillon authentique de plumbagone (Sigma Réf: P 7262) nous a permis de vérifier (point de fusion, RMN  $^1H$ ) que la quinone 1 était bien la plumbagone, porteuse de l'hydroxyle en position 5.

La plumbagone est courante dans certaines familles de plantes, par exemple; *Plumbago* (Plumbaginaceae) (Thomson, 1987), *Diospyros* (Ebenaceae) (Herath et al., 1978; Marston et al., 1984; Tezuka et al., 1973), *Drosera* (Dorseraceae) (Nahrstedt, 1980). La présence de plumbagone a été signalée dans *Pera ferruginea* (Euphorbiaceae) originaire du Brésil (Goncalves de Lima et al., 1967).

#### QUINONE I: PLUMBAGONE

*Cristaux orange (Chloroforme), F = 78-79 °C*

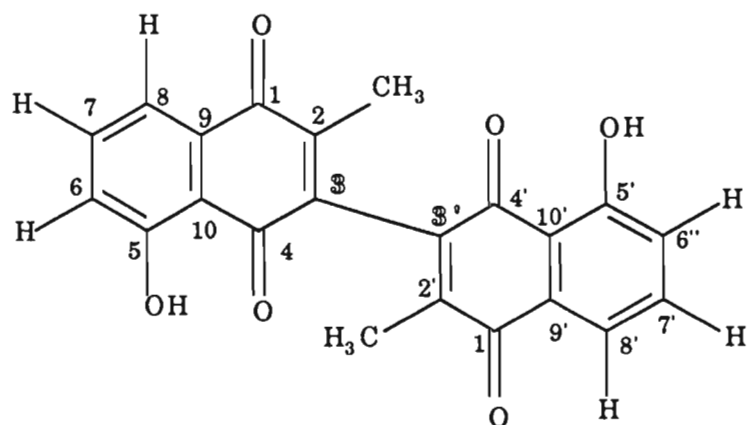


Figure N° 58  
Formule chimique de la 3,3'-biplumbagone

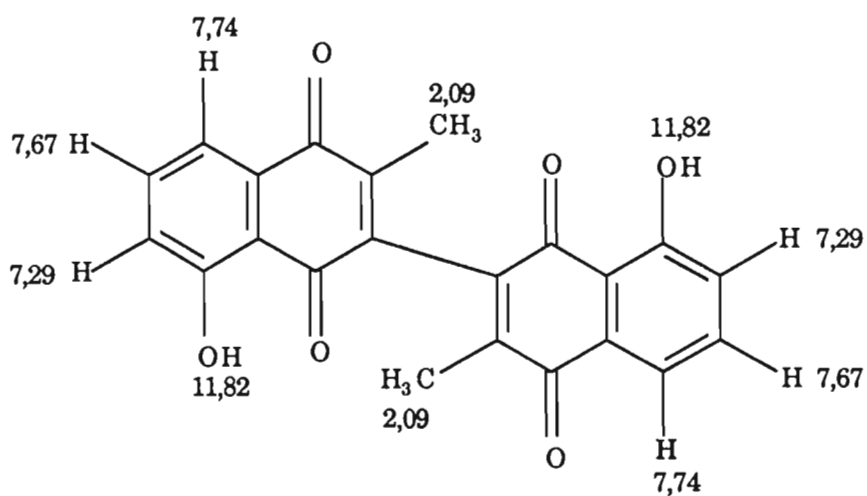


Figure N° 59  
RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la 3,3'-biplumbagone

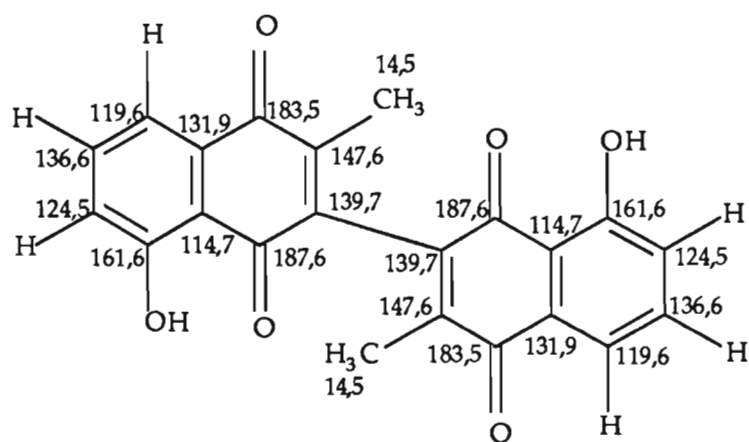


Figure N° 60  
RMN <sup>13</sup>C (50 MMz, CDCl<sub>3</sub>) de la 3,3'-biplumbagone

Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))

210 (4,54), 265 (4,10), 419 (3,61)

Spectre IR: KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )

1665, 1625

Spectre de masse:  $m/z$  (%)

$M^+$ : 188 (47), 173 (30), 160 (19), 131 (17), 28 (100)

Spectre de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) Figure N° 56

Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) Figure N° 57

### 4.3.2. Quinone 2 : la 3,3'-biplumbagone

La quinone 2 est nettement moins abondante que la plumbagone dans les écorces de racines ( $150 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) et les écorces du tronc ( $180 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Elle se présente sous forme de cristaux oranges dont le point de fusion est de 213-214 °C.

La spectrométrie de masse indique pour cette quinone un poids moléculaire de 374 avec des fragments intenses à  $m/z$  359 (M-15), 357 (M-17), 120 et 92 (100 %). Ces données spectrales plaident en faveur d'un dimère de la plumbagone; le poids moléculaire de celle-ci étant de 188 unités de masse, un dimère doit posséder une masse moléculaire de  $188-1 \times 2 = 374$  unités de masse.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure N° 59) de la quinone 2 montre une symétrie de la molécule ainsi qu'un fort déblindage de tous les signaux du fait d'une extension de conjugaison du dimère. Nous observons les 3 protons aromatiques adjacents du cycle benzénique ainsi que le signal de l'hydroxyle à 11,82 ppm. Par contre, nous constatons que le proton en 3 a disparu et que le méthyle en 2 résonne sous forme de singulet à 2,09 ppm. La quinone 2 est donc un dimère symétrique de la plumbagone, la liaison s'effectuant entre les carbones 3 et 3'.

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure N° 60) confirme cette hypothèse de structure par la présence à 139,7 ppm des deux carbones symétriques en 3 et 3'. En comparant le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  de la plumbagone à celui de la quinone 2, on voit que le signal du carbone en 3 s'est déplacé de 5 ppm ( de 134,9 à 139,7 ppm) alors que tous les autres signaux n'ont pratiquement pas bougé.

Toutes ces données spectrales de la quinone 2 sont tout à fait en accord avec celles de la littérature (Kumar et al., 1985; Sankaram et al., 1986; Sidhu et Sankaram, 1971).

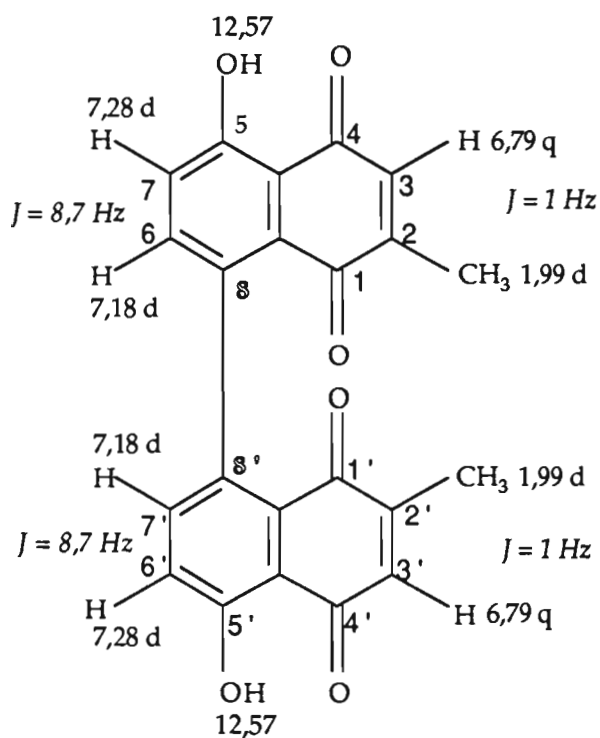


Figure N° 61 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 8,8'-biplumbagone

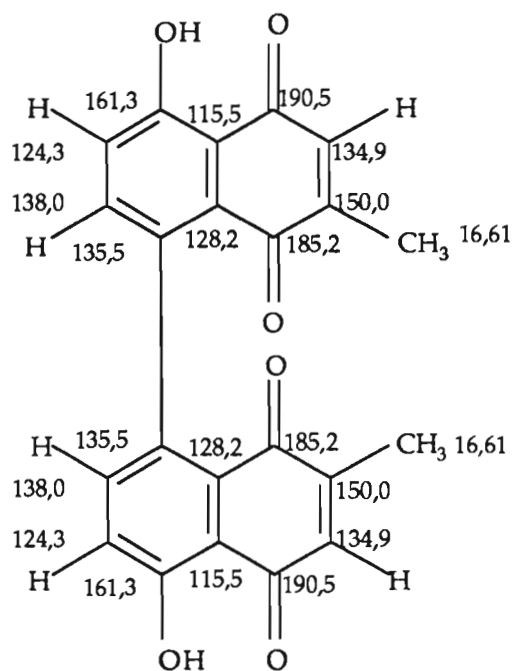


Figure N° 62 RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 8,8'-biplumbagone

La 3,3'-biplumbagone a été isolée précédemment à partir de *Plumbago zeylanica*, une Plumbaginacée de Ceylan ( Sidhu et Sankaram, 1971), et d'une Iridacée de l'Inde, *Aristea ecklonii* (Kumar et al., 1985).

QUINONE II: 3,3'-BIPLUMBAGONE

*Cristaux orange (Chloroforme), F = 213-214° C*

*Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))*

*214 (4,96), 250 (4,52), 270 (4,52), 424 (4,06)*

*Spectre IR: KBr ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ )*

*1665, 1625*

*Spectre de masse: m/z (%)*

*M<sup>+</sup>: 374 (59), 359 (89), 357 (48), 331 (20), 303 (16), 120 (45), 92 (100)*

*Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 59*

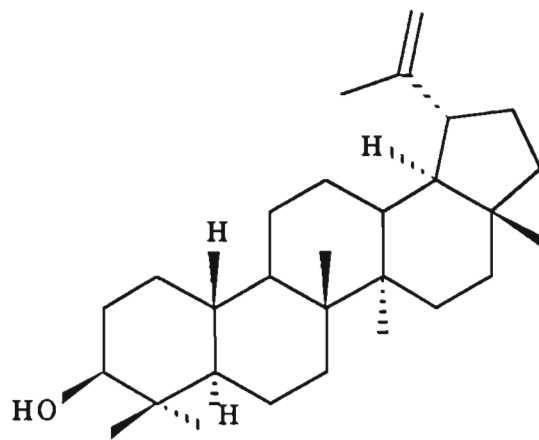
*Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 60*

### 4.3.3. Quinone 3 : la 8,8'-biplumbagone ou marinone

La quinone 3 est un peu plus abondante que la quinone 2; sa teneur est estimée à 200 mg.kg<sup>-1</sup> dans les écorces de racines et à 220 mg.kg<sup>-1</sup> dans les écorces de tronc. Cette quinone se présente sous la forme de cristaux rouges possédant un point de fusion de 190-191 °C.

La spectrométrie de masse de ce composé indique le même poids moléculaire que la quinone 2, (M<sup>+</sup>= 374) et des fragments importants à m/z 331, 303, 278, 250 et 139. La quinone 3 est donc vraisemblablement aussi un dimère de la plumbagone.

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H (Figure N° 61) montre trois protons dans la région des protons aromatique à 7,18, 7,28 et 6,79 ppm, un signal de trois protons à 1,99 ppm attribuable à un groupement méthyle, et un proton à 12,57 ppm attribué au groupement hydroxyle. Ces données spectrales indiquent une symétrie des deux monomères confirmée par le spectre de RMN <sup>13</sup>C (Figure N° 62). Nous observons une constante de couplage de 1 Hz entre le proton à 6,79 ppm et le méthyle qui prouve qu'ils sont situés sur la partie quinonique. Sur la partie benzénique, le déplacement chimique de l'hydroxyle à 12,57 ppm montre qu'il est chélaté au carbonyle. La constante de couplage de 8,7 Hz entre les 2 protons aromatiques montre qu'ils sont situés en ortho l'un de l'autre en position 6 et 7, car un proton en 5 ou 8 résonnerait à champ plus faible du fait de la proximité d'un carbonyle. Par analogie avec les quinones 1 et 2 nous pouvons supposer que l'hydroxyle est situé en position 5 ce qui permet de



Formule N° 63  
Formule chimique du lupéol

proposer pour la quinone 3 une structure de 8,8'-biplumbagone, parfaitement compatible avec les données de RMN  $^{13}\text{C}$ . Cette structure est connue dans la littérature sous le nom de maritinone; le point de fusion et les données spectrales sont en accord avec les résultats publiés (Sankaram et al., 1986).

Cette quinone a été isolée à partir de *Diospyros maritima* (Ebenaceae) (Tezuka et al., 1973), de *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) (Gunarath, 1984) et de *Aristea ecklonii* (Iridaceae) (Kumar et al., 1985).

QUINONE III: 8,8'-BIPLUMBAGONE OU MARITINONE

*Cristaux orange (Chloroforme), F = 190-191° C*

*Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))*

*213 (4,70), 263 (4,56), 434 (4,01)*

*Spectre IR: KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )*

*1656, 1647*

*Spectre de masse: m/z (%)*

*M<sup>+</sup>: 374 (79), 331 (48), 317 (32), 303 (100), 278 (48), 250 (79), 139 (51)*

*Spectre de RMN  $^1\text{H}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) Figure N° 61*

*Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) Figure N° 62*

#### 4.3.4. Produit neutre cristallisé: le lupéol.

Un produit blanc d'aspect cartonneux se trouve en abondance dans les différents extraits ( $10 \text{ g.kg}^{-1}$ ). Il cristallise sous forme de cristaux blanc dans l'acétone; il est identifié par comparaison avec un échantillon authentique en CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse) au lupéol, un triterpène très abondant chez les dicotylédones en particulier dans la famille des Euphorbiacées.

LUPEOL

*APPAREIL (CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE):*

*Hewlett Packard HP 5890 A - Gaz vecteur: azote - Détecteur ionisation de flamme*

*Colonne: HP1 - 25 m - Diamètre intérieur: 0,2 mm - Silice fondue -*

*Épaisseur film: 0,33  $\mu\text{m}$*

*Température injecteur: 300 °C - Température détecteur : 350 °C*

*Programmation de température: 200 °C jusqu'à 330 °C, 4 °C/min et 40 mn à 330 °C*

*Produits silylés (hexaméthylsilylazane) - Témoin interne de lupéol*

*Pureté de la fraction de lupéol de Pera benensis : 96 %*

<sup>1</sup> *Leishmania braziliensis*

<sup>2</sup> *Leishmania amazonensis*

<sup>3</sup> *Leishmania donovani*

Noms des produits	Concentration inhibant 90 % des parasites en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (IC 90)				
	<i>L. b.</i> <sup>1</sup> (2903)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> (PH8)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> (H-142)	<i>L. d.</i> <sup>3</sup> (2682)	<i>L. d.</i> <sup>3</sup> (HS70)
Plumbagone	5	5	5	5	5
3,3'-biplumbagone	50	50	50	50	50
8,8'-biplumbagone	5	5	5	5	5
Lupéol	100	100	100	100	100
Médicaments de référence					
Antimoniote de méglumine ou Glucantime <sup>R</sup>	>100	>100	>100	>100	>100
Pentamidine	1	1	1	1	1

Tableau N° 4.1.

Inhibition de la croissance de plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote, après 48 h de contact avec les quinones et le lupéol isolés de *Pera benensis* Rusby (médicaments de référence, le Glucantime<sup>R</sup> et la pentamidine)



#### **4.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES AVEC LES QUINONES ET LE LUPEOL ISOLES DE *PERA BENENSIS* RUSBY**

##### **4.4.1. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote**

Les trois quinones sont actives sur cinq espèces de leishmanies (voir Tableau N° 4.1.) au stade promastigote à des concentrations différentes.

La plumbagone et la 8,8'-biplumbagone inhibent 90 % des parasites à 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , alors que la 3,3'-biplumbagone est dix fois moins active; elle inhibe 90 % des parasites à 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

L'activité biologique *in vitro* de la plumbagone et des naphtoquinones sur les leishmanies et les protozoaires en général a déjà été signalée par plusieurs auteurs (Croft et al., 1985; Docampo et Moreno, 1984). Un dimère de la 7-méthyl-juglone, la diospyrine, a été décrit comme actif sur *Leishmania donovani* (Hazra et al., 1987) au stade promastigote.

La plumbagone et la diospyrine agirait sur les parasites par libération de radicaux libres en acceptant des électrons générant de l'oxygène actif particulièrement toxique pour les parasites du type *Leishmania* ou *Trypanosoma cruzi* (Wright et Phillipson, 1990).

Le terpène majoritaire, le lupéol, possède une  $\text{IC}_{90}$  de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Produits	Souches de <i>L. amazonensis</i>	Concentration en produit ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Viabilité cellulaire % macrophages vivants	% amastigotes survivants Indice de Survie (I.S.)
Plumbagone	PH 8	50	0	0
		10	100	16,5
		1	100	100
3,3'-biplumbagone	PH 8	100	88	76
		50	100	85
8,8'-biplumbagone	PH 8	50	6	0
		10	100	66
		5	100	82
Lupéol	PH 8	100	100	100
Glucantime <sup>R</sup>	PH 8	100	65	0
		10	85	11

Tableau N° 4.2

Activité biologique *in vitro* et cytotoxicité des quinones et du lupéol extraits de *Pera benensis* sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c.

#### 4.4.2. Activité biologique *in vitro* des quinones sur les amastigotes de *Leishmania amazonensis* (PH8) infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c.

L'activité biologique *in vitro* des quinones sur *Leishmania amazonensis* au stade amastigote infectant des macrophages de souris Balb/c a pu être évaluée malgré les problèmes rencontrés lors de la mise place de ce test biologique à l'IBBA. La plumbagone confirme son activité déjà décrite (Croft et al., 1985). A  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , 16% seulement des amastigotes sont vivants, à  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  la totalité des parasites survivent à cette concentration de plumbagone. Croft et al. ont calculé la dose efficace lysant 50 % des amastigotes à  $1,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les souches de *Leishmania amazonensis* (M 1845 et LV/78). Selon nos calculs, nous trouvons une  $\text{ED}_{50}$  de  $2,4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Cette faible différence avec nos résultats peut s'expliquer par la nature de la souche PH8 particulièrement virulente.

La 3,3'-biplumbagone est nettement moins cytotoxique que la plumbagone. A  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , 76 % des amastigotes sont vivants. La 8,8'-biplumbagone est aussi cytotoxique que la plumbagone vis à vis des cellules hôtes, mais moins active sur les amastigotes, deux tiers de ceux-ci ont survécu à  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Il est dommage que des essais à la concentration de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  n'aient pu être effectués, car à cette concentration, nous aurions probablement eu une idée plus précise de l'activité leishmanicide de ce produit. A  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , 5 % des macrophages n'ont pas été lysés par la quinone 3.

Il est intéressant de noter la relation existant entre l'activité *in vitro* sur le stade promastigote des leishmanies et la cytotoxicité des quinones vis à vis des cellules hôtes. Plus les produits sont cytotoxiques, plus ils sont actifs sur les parasites en milieu de culture. Ceci confirmerait notre impression, après avoir effectué des milliers de tests biologiques *in vitro* sur le stade promastigote de *Leishmania* ssp., que ce test reflète surtout une "cytotoxicité" tout en donnant une précieuse indication sur l'activité potentielle d'un produit. Ces essais doivent être confirmés par les essais sur le modèle animal, les souris Balb/c infectées par *L. amazonensis* (PH8 ou H-142) au stade amastigote.

Nombre de souris par lot expérimental	6
Mode d'inoculation	Intrapéritonéal
Conc. max.	200 mg
Conc. min	6,25 mg
Raison de de la progression	2

Temps d'observation des souris	Calcul de la DL50
2 h	141 mg kg <sup>-1</sup>
24 h	63 mg kg <sup>-1</sup>
48 h	35 mg kg <sup>-1</sup>
72 h	35 mg kg <sup>-1</sup>

Tableau N° 4.3.  
Toxicité de la plumbagone (DL50)

Nombre de souris par lot expérimental	6
Mode d'inoculation	Intrapéritonéal
Conc. max.	200 mg
Conc. min	6,25 mg
Raison de de la progression	2

Temps d'observation des souris	Calcul de la DL50
2 h	>200 mg kg <sup>-1</sup>
24 h	>200 mg kg <sup>-1</sup>
48 h	>200 mg kg <sup>-1</sup>
72 h	>200 mg kg <sup>-1</sup>

Tableau N° 4.4.  
Toxicités de la 3,3'-biplumbagone et de la 8,8'-biplumbagone (DL50))

Nombre de souris par par lot expérimental	6
Mode d'inoculation	Intrapéritonéal
Conc. Max.	450 mg
Conc. Min	50 mg
Raison de de la progression	3

Temps d'observation des souris	Calcul de la DL50
2 h	>450 mg kg <sup>-1</sup>
24 h	>450 mg kg <sup>-1</sup>
48 h	>450 mg kg <sup>-1</sup>
72 h	>450 mg kg <sup>-1</sup>

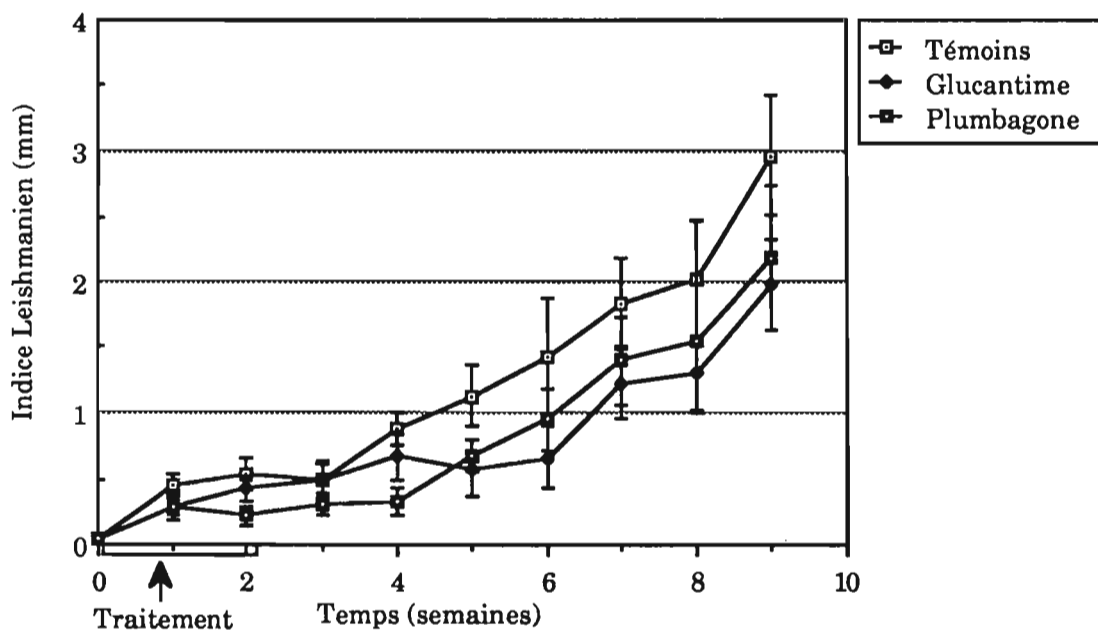
Tableau N° 4.5.  
Toxicité du lupéol (DL50))

#### 4.4.3. Mesure de la toxicité (DL<sub>50</sub>) des quinones et du lupéol isolés de *Pera benensis*

A part la plumbagone particulièrement toxique, les deux dimères de celle-ci sont nettement moins toxiques. La toxicité aiguë de la plumbagone nous a amené à effectuer plusieurs essais préliminaires à des concentrations quatre à dix fois inférieures à sa DL<sub>50</sub>. Des petites variations de la quantité de plumbagone administrée ont parfois un effet néfaste sur les souris. Au cours de la mesure de la DL<sub>50</sub> de la plumbagone, une forte toxicité a été observée en particulier au niveau du système nerveux central des souris. En effet, à la concentration la plus élevée (200 mg.kg<sup>-1</sup>), les souris deviennent hystériques, sont prises de convulsions et effectuent des bonds disproportionnés par rapport à leur taille. Après quelques minutes, elles succombent d'un seul coup par arrêt cardiaque. Avec les souris ayant reçu une quantité inférieure de plumbagone, aucune réaction de ce type n'a été notée. Par contre, les souris cessent de s'alimenter, restent prostrées et succombent dans les 48 ou 72 heures après l'administration de la plumbagone. Les souris inoculées avec 25 mg.kg<sup>-1</sup> paraissent normales et survivent toutes 72 h après l'administration de la plumbagone par voie intrapéritonéale. Avec les deux autres quinones, aucun effet de ce type n'a été observé.

Les deux dérivés dimères de la plumbagone, la 3,3'-biplumbagone et la 8,8'-biplumbagone (maritinone) ne présentent pas les effets toxiques de la plumbagone, leur DL<sub>50</sub> est supérieure à 200 mg.kg<sup>-1</sup>.

La toxicité du lupéol a été également mesurée, la DL<sub>50</sub> est supérieure à 450 mg.kg<sup>-1</sup>.



A la 4ème semaine 3 souris mortes

A la 5ème semaine 4 souris mortes

Courbe N°4.1.

Activité de la plumbagone ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142), début du traitement 24 h *post*-infection

#### 4.4.4. Activité biologique *in vivo* des quinones et du lupéol extrait de *Pera benensis* Rusby sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142 ou PH8) ou de *L. venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

Pour tous les essais, les animaux employés sont des souris Balb/c provenant au départ de Charles Rivers (USA), puis élevées à l'IBBA à La Paz.

Au cours de ces protocoles, est pris en compte le même critère d'évaluation de l'activité des produits que celui déjà utilisé lors des essais avec les alcaloïdes quinoléiques de *Galipea longiflora* Kr, l'Indice Leishmanien (IL). (moyenne arithmétique des mesures, et calcul de l'intervalle de confiance de la moyenne observée).

##### 4.4.4.1. La plumbagone

##### 4.4.4.1.1. Activité biologique *in vivo* de la plumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (H-142) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N° 4.1)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	24 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	H-142
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$2,5 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

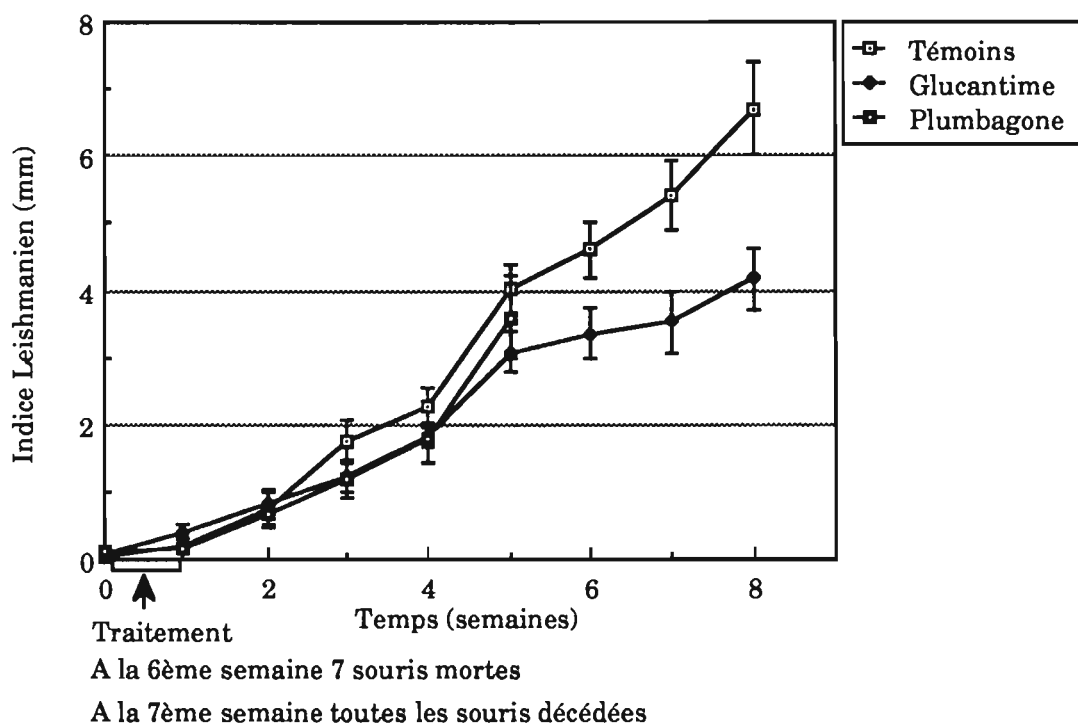
L'expérimentation avec *Leishmania amazonensis* (H-142) a dû être prolongée d'une semaine. Les différences de mesures (0,7 mm et 0,5 mm) entre les Indices Leishmaniens des lots expérimentaux témoins (2,0 mm) et des lots expérimentaux ayant reçu un traitement étaient trop faibles et non significatives à la 8<sup>ème</sup> semaine. A la 9<sup>ème</sup> semaine, la différence des IL

s'accroît sensiblement en faveur des lots expérimentaux traités, 1 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 0,8 mm (plumbagone). Ces écarts sont statistiquement significatifs pour le groupe expérimental traité avec le Glucantime<sup>R</sup>, ce qui n'est pas le cas avec les souris traitées avec la plumbagone.

Au cours de cette expérimentation, trois souris traitées avec la plumbagone sont mortes à la 4<sup>ème</sup> semaine et une quatrième à la 5<sup>ème</sup> semaine probablement en raison de la toxicité de la plumbagone. Les cinq premières semaines, les souris traitées avec la plumbagone et le Glucantime<sup>R</sup> ne développent pratiquement pas de lésions (0,7 mm et 0,6 mm); dans le même temps, les lésions mesurées chez les souris témoins sont deux fois plus importantes (1,1 mm). Les trois semaines suivantes, la croissance de ces lésions s'accélérent légèrement chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et la plumbagone, de 1,3 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et de 1,2 mm chez les souris traitées avec la plumbagone.

En conclusion, la plumbagone est aussi efficace malgré sa toxicité que le dérivé antimonié pour ralentir le développement des lésions provoquées par l'infection de *Leishmania amazonensis* (H-142) au stade amastigote, même si d'un point de vue statistique ce résultat est contestable. Ce doute peut être mis sur le compte de la souche H-142 ne produisant pas des lésions suffisamment importantes et par conséquent des différences notables entre les divers groupes expérimentaux.





Courbe N° 4.2

Activité de la plumbagone ( $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

4.4.4.1.2. Activité biologique *in vivo* de la plumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Plusieurs expérimentations ont été réalisées avec une infection parasitaire par la souche PH8 et des traitements avec la plumbagone à différentes concentrations ( $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  et  $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) à cause de sa toxicité, décelable parfois plusieurs semaines après le traitement.

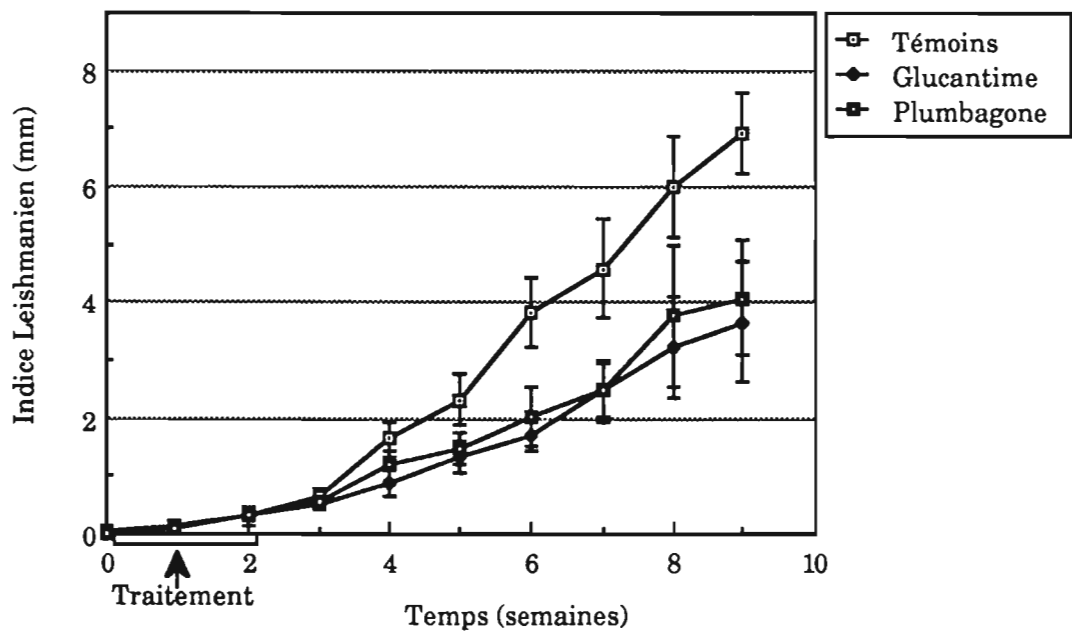
Conditions expérimentales (courbes N° 4.2, 4.3. et 4.4)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	10
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu\text{l}$
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu\text{l}$ )
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentrations de produit à tester	$7,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ou $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ou $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

L'activité de la plumbagone, administrée pendant une semaine à la concentration de  $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , n'a pu être évaluée (voir courbe N° 4.2).

A la 5<sup>ème</sup> semaine, toutes les souris avaient succombé. La quantité cumulée de plumbagone administrée en une semaine correspond à  $37,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , le niveau de la DL 50. La plumbagone paraît donc s'accumuler dans l'organisme des souris pour provoquer leur décès trois semaines après la cessation du traitement par la plumbagone.

Suite à ce protocole, il a été décidé d'employer la plumbagone à  $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Aucun décès n'a été constaté chez les souris recevant quotidiennement  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  pendant 14 jours consécutifs. Pendant le traitement et les trois semaines qui l'ont suivi, les souris recevant la plumbagone paraissent perdre du poids. A la 6<sup>ème</sup> semaine, toutes ces souris semblent récupérer le poids perdu suite à la cure de plumbagone. Au cours du traitement, il se forme au point d'inoculation du médicament des nécroses qui disparaissent à la



Courbe N° 4.3

Activité de la plumbagone ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

suspension des injections de plumbagone.

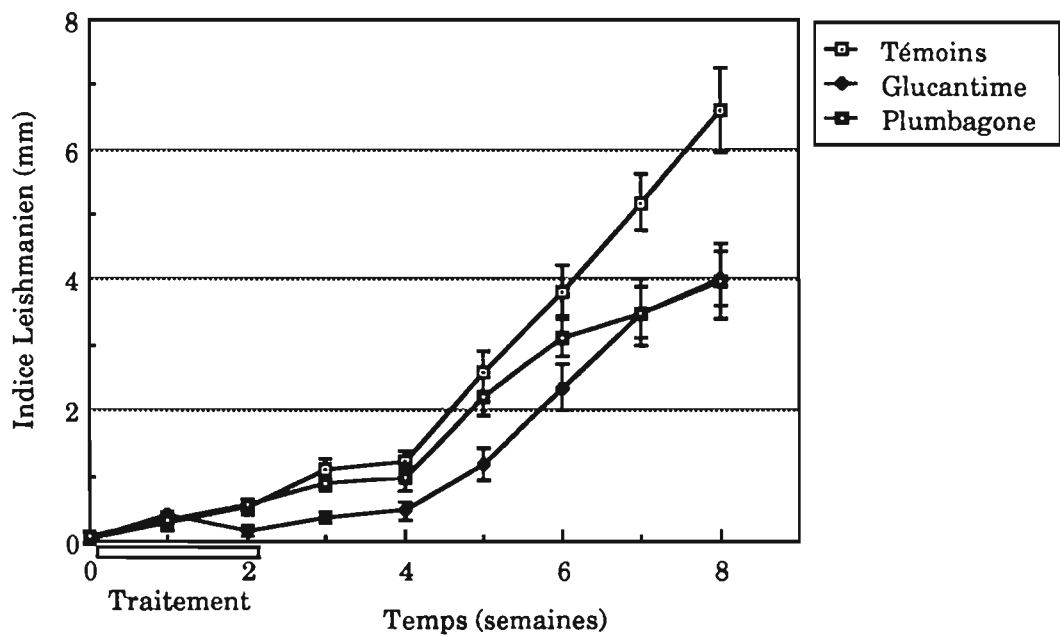
Pendant les neuf semaines de l'expérimentation (voir courbe N° 4.3), les souris traitées avec le médicament de référence et celles traitées avec la plumbagone développent des lésions de même importance. Le protocole expérimental a été volontairement prolongé d'une semaine car les lésions des souris témoins continuaient à croître très rapidement. A la fin de l'expérimentation, l'IL moyen des souris traitées au Glucantime<sup>R</sup> est de 3,7 mm et celui des souris traitées avec la plumbagone de 4,1 mm, soit une différence de 0,4 mm alors que l'écart entre les deux mesures était de 0,5 mm à la 8<sup>ème</sup> semaine, ce qui suggère que l'action de la plumbagone est durable dans le temps.

Enfin, la plumbagone, administrée à la dose de 5 mg.kg<sup>-1</sup>, est pratiquement aussi active que le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>.

La plumbagone a été essayée dans les mêmes conditions expérimentales à la concentration de 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> par jour pendant quatorze jours consécutifs (voir courbe N° 4.4). Au cours des huit semaines d'expérimentation, aucun effet indésirable n'a été observé, sauf la formation de nécroses au point d'injection du traitement. Cet effet indésirable se dissipe à la suspension du traitement.

Les quatre premières semaines, les lésions chez les souris sont de faible diamètre, 0,9 mm chez les souris traitées avec la plumbagone et 0,5 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, les IL augmentent en une semaine d'une façon très spectaculaire chez toutes les souris, de 1,3 mm chez les souris témoins, de 1,3 mm chez les souris traitées avec la plumbagone et de 0,7 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. La 6<sup>ème</sup> semaine, cette croissance des lésions est presque aussi importante, 1,2 mm chez les souris témoins, 0,9 mm chez les souris traitées avec la plumbagone et 1,2 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. La plumbagone semble ralentir la multiplication des amastigotes chez les souris ayant reçu ce traitement. La 7<sup>ème</sup> semaine, il se produit une nette diminution de la croissance des lésions chez les souris traitées avec la plumbagone, 0,4 mm, alors que chez les deux autres lots expérimentaux, les parasites continuent à se multiplier au même rythme que les semaines précédentes, 1,4 mm chez les souris témoins et 0,8 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Enfin à la 8<sup>ème</sup>



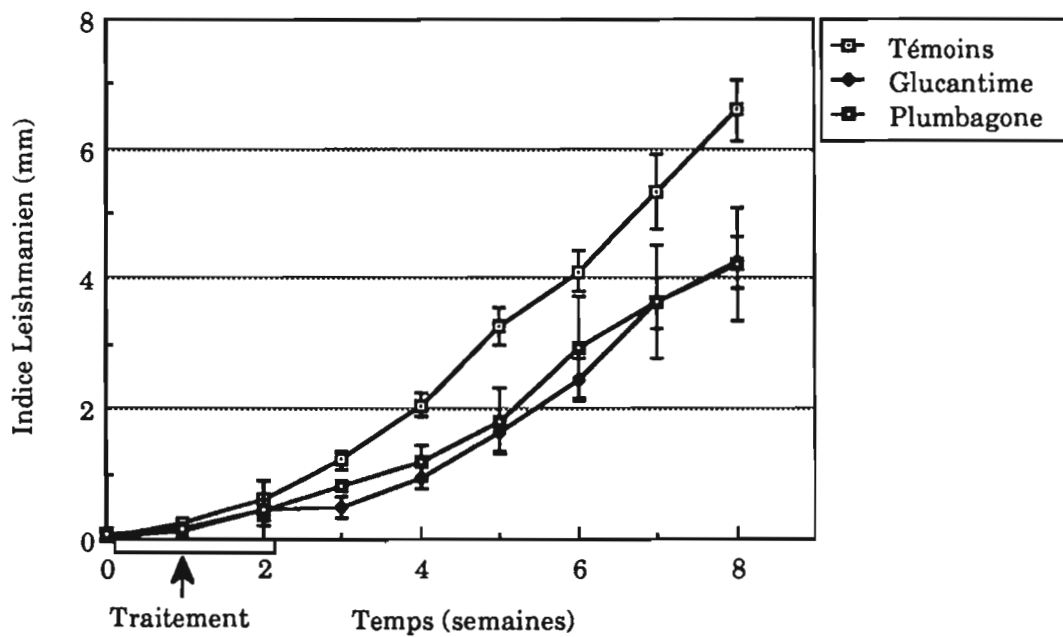
Courbe N° 4.4

Activité de la plumbagone ( $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

semaine, les IL des lots expérimentaux traités sont sensiblement les mêmes, 4,0 mm pour les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et 3,9 mm chez les souris traitées avec la plumbagone.

Cette expérimentation (Voir courbe N° 4.4.) a permis de voir qu'il n'est peut-être pas nécessaire d'administrer des quantités trop importantes de plumbagone qui engendrent des effets indésirables et augmentent la toxicité sans apporter une meilleure action thérapeutique. L'effet retard observé lors des trois dernières semaines de l'expérimentation montre également, comme lors des essais précédents, que la plumbagone ne s'élimine pas facilement de l'organisme. L'activité biologique *in vivo* de la plumbagone sur des souris infectées par *L. amazonensis* confirme l'activité entrevue lors des essais *in vitro* sur les leishmanies aux stades promastigote et amastigote. Sa forte toxicité doit limiter son emploi peut-être à des traitements locaux sur les lésions, comme l'usage traditionnel ou à des traitements très faiblement dosés.

Des essais par injection locale à l'endroit de l'infection ont été réalisés avec la plumbagone dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites lors des essais avec les alcaloïdes de *Galipea longiflora*. C'est à dire injection du produit quatorze jours après l'infection parasitaire en une seule dose, à une concentration de principe actif double de celle employée lors des essais par voie générale, soit 10 mg.kg<sup>-1</sup> pour la plumbagone. Cette expérimentation n'a pu être menée à son terme car toutes les souris ont succombé à la 4<sup>ème</sup> semaine probablement en raison de la trop forte concentration de plumbagone administrée. Des essais avec 7,5 voire 5 mg.kg<sup>-1</sup> n'ont pas pu être effectués.



Courbe N° 4.5

Activité de la plumbagone ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezulensis* (H-3), début du traitement 24 h *post*-infection

4.4.4.1.3. Activité biologique *in vivo* de la plumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

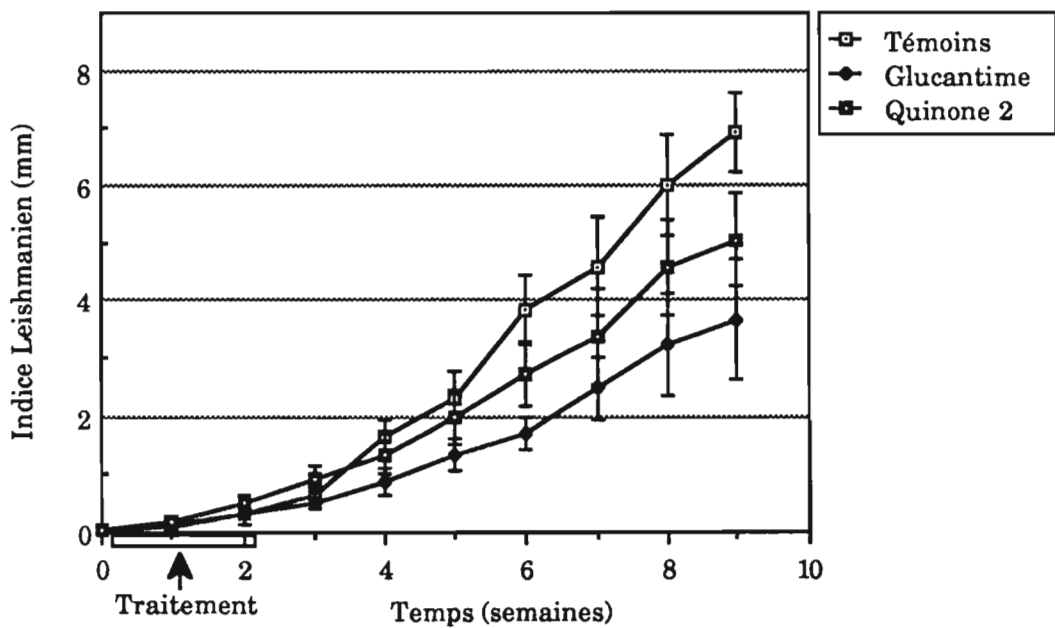
Conditions expérimentales (courbe N° 4.5)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. v.</i>	H-3
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos(200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentrations de produit à tester	$5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

L'expérimentation avec l'espèce très virulente *Leishmania venezuelensis* (H-3) a apporté des informations complémentaires sur l'activité leishmanicide *in vivo* de la plumbagone. Au cours de cette expérimentation, les mêmes effets indésirables ont été observés que lors des précédents essais avec la plumbagone, perte de poids les cinq premières semaines et formation de nécroses au point d'injection du produit. Aucune souris n'est morte pendant les huit semaines de l'expérimentation. Pendant les quatre premières semaines, l'accroissement des lésions chez les souris traitées est sensiblement de même importance, 0,9 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et de 1,2 mm chez les souris traitées avec 5 mg kg<sup>-1</sup> de plumbagone alors que les lésions des souris témoins mesurent 1,8 mm. Les quatre dernières semaines d'expérimentation les lésions des souris traitées augmentent de 3,4 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et de 3 mm (plumbagone). Une fois de plus, l'effet retard de la plumbagone est observé.

Ces essais sur les souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* corroborent les essais effectués sur *L. amazonensis in vivo*. La forte teneur en plumbagone dans les écorces de tronc de *Pera benensis* explique et démontre sans ambigüité l'activité leishmanicide de celles-ci lors de leur application locale sur les lésions provoquées par une infection par *L. braziliensis*. L'activité leishmanicide de la plumbagone isolée de *Pera benensis* est identique à celle déjà décrite sur *L. amazonensis* (Croft et al., 1984).





Courbe N° 4.6

Activité de la 3,3'-plumbagone ( $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

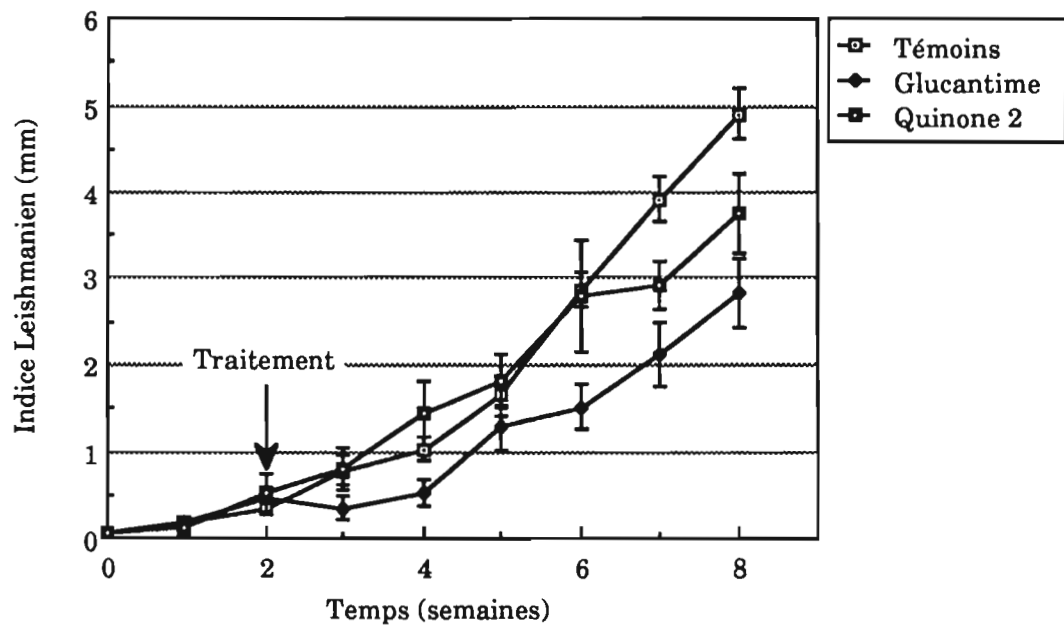
#### 4.4.4.2. La 3,3'-biplumbagone

##### 4.4.4.2.1. Activité biologique *in vivo* de la 3,3'-biplumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

###### Conditions expérimentales (courbe N° 4.6.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	17 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	8
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentrations de produit à tester	25 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Moins toxique que la plumbagone, la 3,3'-biplumbagone a pu être testée sur les souris infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) à la concentration de 25 mg.kg<sup>-1</sup> par jour pendant 14 jours consécutifs. Au cours de cette expérimentation, aucun effet indésirable n'a été observé. Les quatre premières semaines, l'accroissement des lésions est assez modeste chez toutes les souris, 1,6 mm (témoins), 1,4 mm (souris traitées avec la quinone 2), et 0,9 mm (souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>). A partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, les lésions augmentent rapidement comme lors de toutes les expérimentations avec la souche PH8. Cette croissance des lésions est plus importante à la 6<sup>ème</sup> semaine chez les souris témoins, 1,50 mm, et seulement de 0,7 mm, chez les souris traitées avec la 3,3'-biplumbagone et 0,4 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. L'expérimentation a été prolongée d'une semaine pour observer des différences notables entre les IL du groupe expérimental témoin et les groupes expérimentaux ayant reçu une thérapie. Finalement à la 9<sup>ème</sup> semaine, les IL sont les suivants; 6,8 mm chez les souris témoins, 5 mm chez les souris traitées avec la 3,3'-biplumbagone et 3 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Du point de vue statistique, les intervalles de confiance au sein de chaque groupe sont importants du fait de la diminution du nombre



Courbe N°4.7

Activité de la 3,3'-biplumbagone ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours post-infection

d'animaux par groupe expérimental, huit au lieu de dix. Cet abaissement du nombre d'animaux est dû au ralentissement de la natalité des souris Balb/c dans l'élevage à l'IBBA.

La 3,3'-biplumbagone n'est pas aussi active *in vivo* sur *Leishmania amazonensis* (PH8) que la plumbagone et le Glucantime<sup>R</sup>. Ce résultat est à mettre en relation avec la faible activité entrevue lors des essais biologiques *in vitro* sur les promastigotes et les amastigotes des différentes espèces de leishmanies.

4.4.4.2.2. Activité biologique *in vivo* de la 3,3'-biplumbagone administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 4.7.)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	24 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 µl)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	50 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

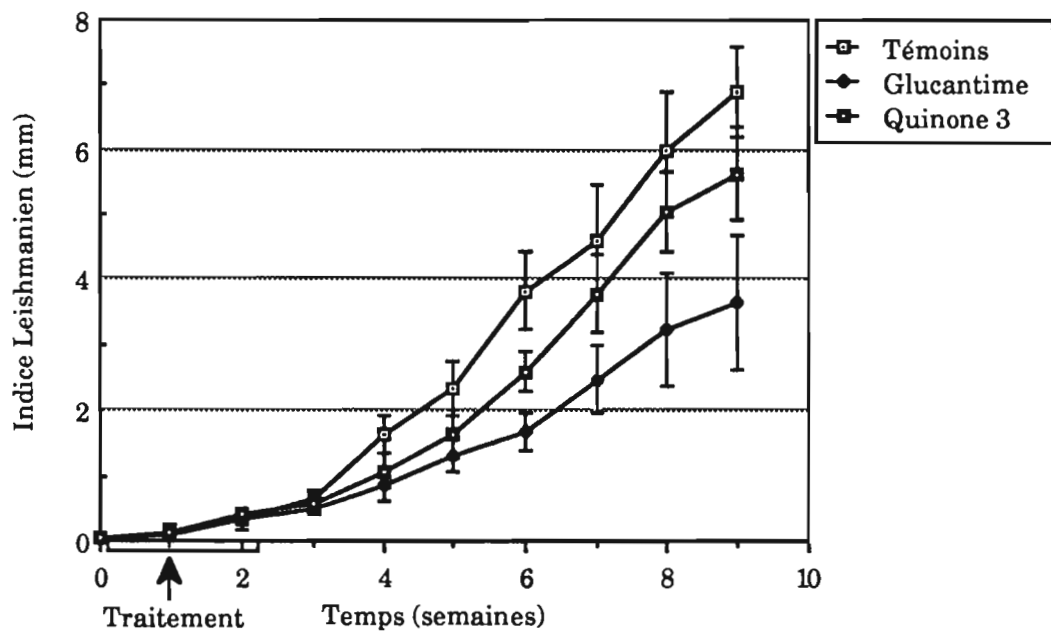
En médecine traditionnelle, les écorces de tronc de *Pera benensis* sont appliquées localement sur les lésions de leishmaniose tégumentaire. Nous avons voulu vérifier si la 3,3'-biplumbagone possédait une activité leishmanicide lorsqu'elle était inoculée à l'endroit de l'infection parasitaire.

Le traitement "flash" employé, injection 14 jours après l'infection par *Leishmania amazonensis* (PH8) de 50 mg.kg<sup>-1</sup> de 3,3'-biplumbagone, a donné des résultats très moyens, impossibles à comparer avec un traitement similaire avec la plumbagone (voir paragraphe 4.4.4.1.2).

Pendant les six premières semaines, les souris traitées avec la 3,3'-biplumbagone développent des lésions égales (2,9 mm) à celles mesurées chez les souris témoins (2,8 mm). Les deux dernières semaines de l'expérimentation, la croissance de ces lésions se ralentit chez les souris ayant reçu un traitement à base de 3,3'-biplumbagone, 0,1 mm contre 1,1 mm chez les souris témoins. Les IL mesurés chez les trois groupes expérimentaux sont les suivants à la 8<sup>ème</sup> semaine: chez les souris témoins 4,9 mm, chez les souris traitées avec la 3,3'-biplumbagone 3,7 mm et chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> 2,8 mm. Les différences de mesures sont significatives sur le plan statistique (voir courbe N° 4.7.).

Cette expérimentation corrobore les résultats moyens obtenus lors des essais de traitement par voie générale et ceux observés lors des essais *in vitro* sur les leishmanies aux stades promastigote et amastigote.

Il semble qu'il y ait un lien entre l'activité leishmanicide des naphtoquinones *in vitro* sur les leishmanies aux stade promastigote et amastigote et leur activité leishmanicide *in vivo* sur le modèle animal. Cela reste à démontrer sur un plus grand nombre de naphtoquinones et sur d'autres espèces de *Leishmania* ssp. notamment sur *L. donovani*.



Courbe N°4.8

Activité de la 8,8'-plumbagone ( $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post-infection*

#### 4.4.4.3. La 8,8''-biplumbagone ou marinone

##### 4.4.4.3.1. Activité biologique *in vivo* de la 8,8'-biplumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

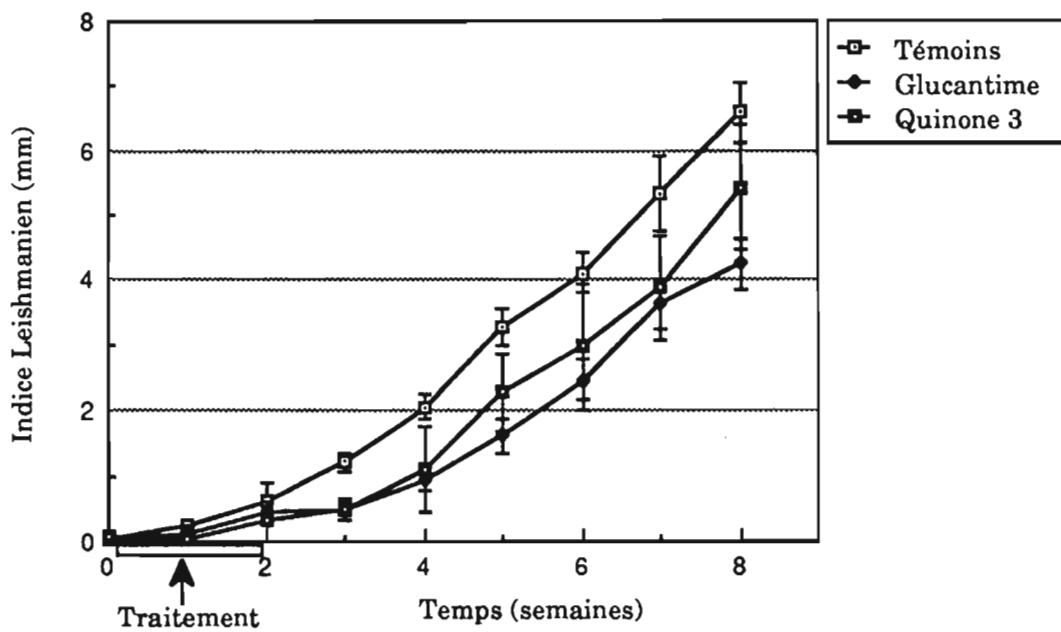
Conditions expérimentales (courbe N° 4.8.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	16 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	8
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentrations de produit à tester	$25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

La troisième quinone active *in vitro* isolée de *Pera benensis* est un dimère de la plumbagone comme la 3,3'-biplumbagone.

Un traitement pendant quatorze jours consécutifs a permis de vérifier que la quinone 3 ne possédait pas l'activité leishmanicide entrevue lors des essais *in vitro* sur les leishmanies au stade promastigote et à un degré moindre *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote. Pendant l'expérimentation aucun effet indésirable n'a été noté chez les souris recevant la 8,8'-biplumbagone à  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  pendant 14 jours.

Les cinq premières semaines de l'expérimentation, les souris traitées avec la 8,8'-biplumbagone développaient des lésions sensiblement de même taille que celles mesurées chez les souris traitées avec le dérivé antimonié; respectivement 1,6 mm et 1,3 mm. La 6<sup>ème</sup> semaine, il se produit une forte croissance des lésions chez les souris ayant reçu la quinone 3 (1 mm), alors que cette croissance n'est que de 0,4 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et de 1,5 mm chez les souris témoins. La prolongation de l'expérimentation une semaine supplémentaire a permis d'augmenter les écarts des mesures des lésions des trois groupes expérimentaux. Les IL calculés étaient les suivants à la 9<sup>ème</sup> semaine: 3,7 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>, 5,6 mm chez les souris traitées avec la 8,8'-



Courbe N° 4.9

Activité de la 8,8'-biplumbagone ( $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezulensis* (H-3), début du traitement 24 h *post*-infection



biplumbagone et 6,8 mm chez les souris témoins (voir courbe N° 4.8).

Ces résultats montrent une activité leishmanicide *in vivo* de la 8,8'-biplumbagone nettement moindre que celle du Glucantime<sup>R</sup>. L'analyse des résultats obtenus lors des essais biologiques *in vitro* sur le modèle infection des macrophages par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote avaient laissé planer un doute sur l'activité leishmanicide de la 8,8'-biplumbagone. Cette activité *in vivo* doit être confirmée sur d'autres modèles, tels que l'infection des souris par *L. venezuelensis* et le traitement local de la lésion.

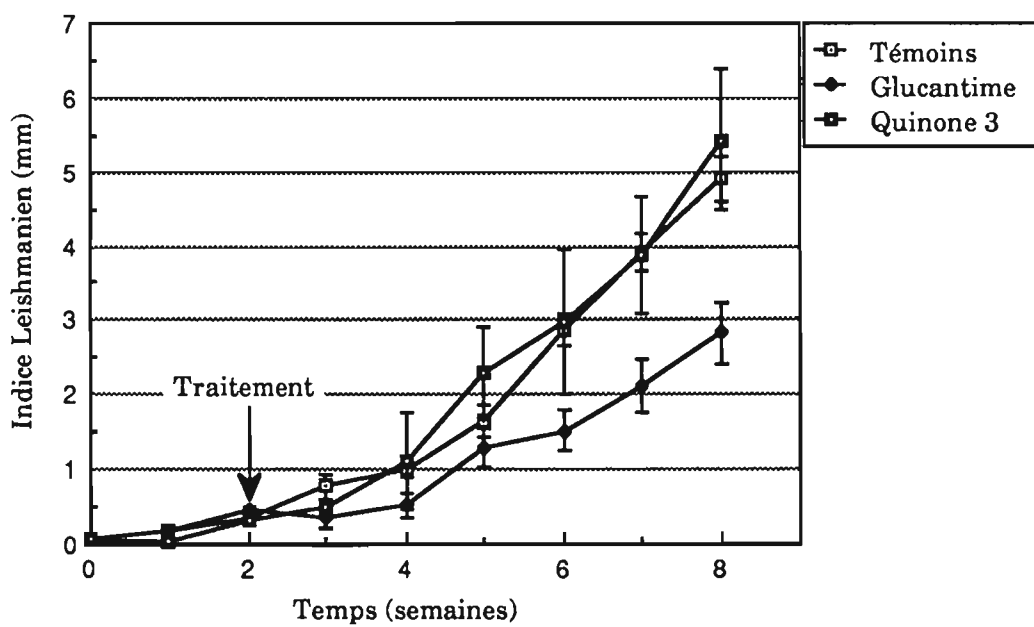
#### 4.4.4.3.2. Activité biologique *in vivo* de la 8,8'-biplumbagone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

##### Conditions expérimentales (courbe N° 4.9)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	17 g
Réf. de la souche de <i>L. v.</i>	H-3
Nombre de souris par lot	8
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 µl)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentrations de produit à tester	25 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Les souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* et traitées avec la 8,8'-biplumbagone développent des lésions légèrement plus importantes que celles mesurées chez les souris ayant reçu le dérivé antimonié.

Les quatre premières semaines de l'expérimentation, les IL sont pratiquement identiques, 1 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 1,1 mm (quinone 3). La cinquième semaine, il se produit une forte croissance des lésions; 0,9 mm (témoins), 0,7 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 1,2 mm (8,8'-biplumbagone). Cette augmentation des IL s'intensifie lors des trois dernières semaines de



Courbe N°4.10

Activité de la 8,8'-biplumbagone ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

l'expérimentation; 4 mm chez les souris témoins, de 2,8 mm chez les souris traitées avec la 8-8'-biplumbagone et de 2,6 mm chez souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine, les lésions chez les souris, soumises à une thérapie, sont pratiquement de mêmes tailles, 3,7 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 3,9 mm (8-8'-biplumbagone) (voir courbe N° 4.9).

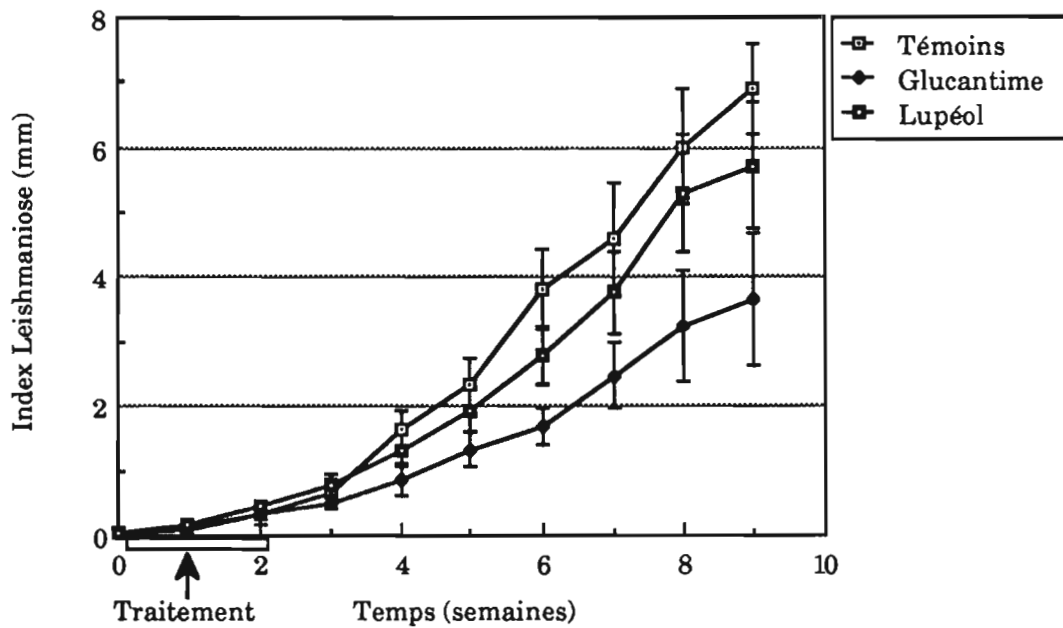
Les résultats de cette expérimentation sont un peu différents de ceux exposés lors de l'expérimentation précédente, infection des souris par *L. amazonensis* (PH8) et d'un traitement dans les mêmes conditions par la 8-8'-biplumbagone. En effet, cette quinone ralentit nettement la multiplication de l'espèce *L. venezuelensis* au stade amastigote pendant sept semaines.

Ce protocole a permis une fois de plus de montrer qu'il n'est pas très évident de rencontrer un produit efficace sur toutes les espèces de *Leishmania* ssp. même lorsqu'il s'agit d'espèces très voisines génétiquement, en l'occurrence *L. amazonensis* et *L. venezuelensis* appartenant au complexe *Leishmania mexicana*.

4.4.3.3.3. Activité biologique *in vivo* de la 8,8'-biplumbagone administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 4.10)

Sexe des souris	Femelles
Poids moyen	25 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	1 x 10 <sup>6</sup> dans 200 µl
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 µl)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	50 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>



Courbe N° 4.11

Activité du lupéol ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) isolée de *Pera benensis* Rusby et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h post-infection

Les souris traitées avec la 8,8'-biplumbagone n'ont pas été protégées de l'infection par les amastigotes de *L. amazonensis* (voir courbe N° 4.10). Elles ont développé des lésions de même taille que celles mesurées chez les souris témoins pendant les huit semaines de l'expérimentation.

L'injection de la 8-8'-biplumbagone au niveau de la patte infectée par *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote reproduit d'une manière assez simpliste les conditions rencontrées en médecine traditionnelle, lorsque les Indiens Chimanes appliquent les écorces de tronc de *Pera benensis*. L'idéal serait l'application d'une pommade à base du principe actif, mais notre inexpérience en matière d'essais pharmacologiques ne nous a pas permis de mettre au point de tels essais biologiques.

#### 4.4.4.4. Le lupéol

Activité biologique *in vivo* du lupéol sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 4.11)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	16 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	8
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentrations de produit à tester	100 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

Le lupéol se trouve en abondance dans les écorces de tronc et les écorces de racines de *Pera benensis*, 10 g.kg<sup>-1</sup> en moyenne. Bien que légèrement actif sur les leishmanies au stade promastigote (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), nous avons voulu vérifier son activité *in vivo* sur *Leishmania amazonensis* au stade amastigote.

Des difficultés ont été rencontrées lors de la préparation des solutions à

administrer. L'aspect cartonneux des cristaux de lupéol ne facilite pas l'inoculation de la solution à base de ce terpène. Néanmoins, il a été possible d'effectuer le traitement 14 jours consécutifs en changeant souvent d'aiguilles.

Les souris traitées avec le lupéol développent des lésions sensiblement moins importantes que celles mesurées chez les souris témoins. Les trois premières semaines, peu de différences sont observées entre les IL des trois groupes expérimentaux: 0,7 mm chez le souris témoins, 0,5 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>, et 0,8 mm chez les souris traitées avec le lupéol. Les deux semaines suivantes, les IL augmentent rapidement chez les souris témoins et les souris traitées avec le lupéol, de 1,7 mm chez les premières et de 1,2 mm chez les secondes (voir courbe N° 4.11). Les quatre dernières semaines, l'accroissement des lésions s'accroît pour ces deux groupes expérimentaux, de 4,7 mm et de 3,7 mm chez les souris traitées avec le lupéol.

Enfin, les IL des souris traitées par le lupéol sont supérieures de 56 % à celles mesurées chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

Cette expérimentation a permis d'exclure une éventuelle activité antiparasitaire du lupéol dans les écorces de tronc ou de racines de *Pera benensis*.

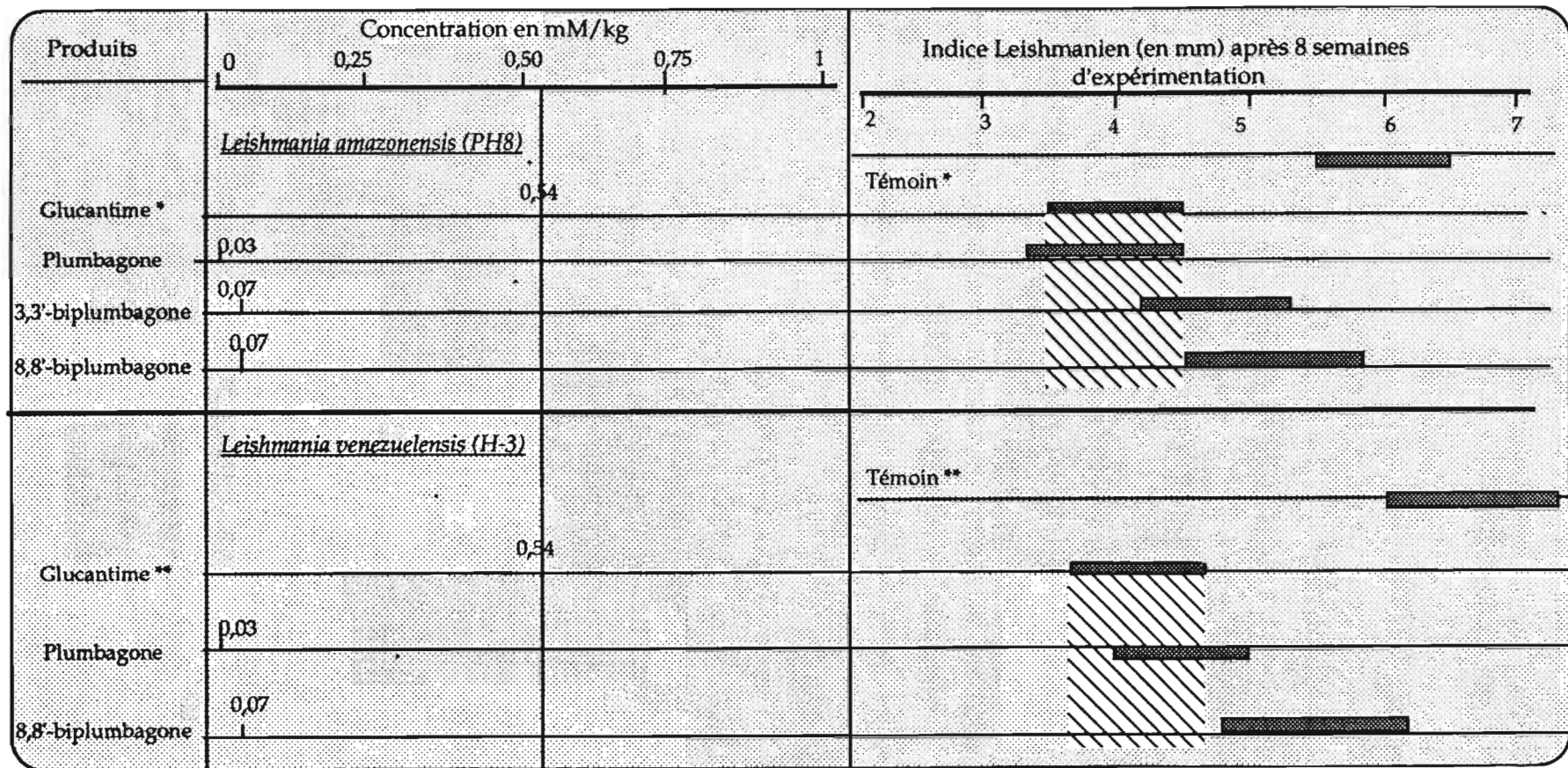
#### 4.4.5. **Discussion des résultats obtenus lors des essais biologiques *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par les leishmanies et traitées avec les principes actifs de *Pera benensis* Rusby.**

Les trois naphtoquinones isolées à partir des écorces de *Pera benensis* par guidage biologique, la plumbagone et deux dimères de celle-ci, la 3,3'-biplumbagone et la 8,8'-biplumbagone, n'ont pas la même efficacité thérapeutique sur les leishmanioses cutanées provoquée par *L. amazonensis* (H-142 et PH8) et sur *L. venezuelensis*.

Seule la plumbagone confirme les résultats obtenus lors des essais biologiques *in vitro* sur les formes promastigotes et amastigotes. Ce n'est pas une surprise, cette naphtoquinone a déjà fait l'objet d'essais biologiques *in vitro* et *in vivo* sur *L. amazonensis* (Croft et al., 1985). Les résultats exposés dans ce travail sont presque en accord avec ceux reportés par S.L. CROFT et coll. 1985. Si nous n'avons pas pu tester *in vivo* la plumbagone sur *L. donovani*, en revanche il a été possible de vérifier son activité sur une autre espèce, *L. venezuelensis* et également lorsqu'elle est inoculée localement au point de l'infection parasitaire. Dans les deux cas la plumbagone s'est révélée aussi active que le Glucantime<sup>R</sup>.

La plumbagone à 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> est aussi efficace que le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup> à 200 mg.kg<sup>-1</sup> (voir schéma 4.1). Une concentration supérieure de plumbagone n'augmente pas son efficacité et engendre des effets secondaires néfastes pour les animaux en expérimentation. Il est dommage que cette quinone soit si toxique. Nous avons vu que les dosages de la plumbagone devaient être minutieux, à 5 mg.kg<sup>-1</sup>, malgré quelques effets indésirables, toutes les souris survivaient à ce traitement; par contre à 7,5 mg.kg<sup>-1</sup> elles succombaient toutes quatre semaines après l'arrêt du traitement. Cette dernière observation laisse penser que la plumbagone doit être difficile à métaboliser par l'organisme des souris.

Les deux dimères de la plumbagone, moins toxiques que celle-ci, se sont montrés moins actifs au cours des différentes expérimentations, en particulier la 3,3'-biplumbagone. Une seule fois la 8,8'-biplumbagone s'est révélée efficace, sur *L. venezuelensis*. Les dimères de la plumbagone sont administrés à la concentration de 0,06 mM.kg<sup>-1</sup> au lieu de 0,03 mM.kg<sup>-1</sup> pour la plumbagone (schéma N° 4.1). En prenant en compte les quantités de médicament administrées, nous apercevons que les souris traitées avec la plumbagone ont reçu 20 fois moins à 5 mg.kg<sup>-1</sup> (0,026 mM.kg<sup>-1</sup>) et 40 fois moins à 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> (0,013 mM.kg<sup>-1</sup>) en concentration molaire que celles



**Légende:**

■ Indice Leishmanien +/- Intervalle de confiance au risque a 5 %

▨ Zone d'activité du Glucantime

\* Moyenne sur 24 souris

\*\* Moyenne sur 6 souris

Schéma N° 4.1

Activité comparative du Glucantime, des quinones isolées de *Pera benensis* Rusby. administrés par voie sous cutanée pendant 14 jours sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH 8), et par *L. venezuelensis* (H-3)



traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Pour les deux dimères les concentrations administrées sont de 0,07 mM.kg<sup>-1</sup>.

Il paraît certain que les fortes teneurs en plumbagone et ses dérivés dans les écorces de racines et de tronc sont responsables de l'activité leishmanicide de ces écorces lorsqu'elles sont appliquées localement sur les lésions. Tout ceci démontre que les Indiens Chimanes emploient un traitement efficace sur l'espundia.

En prenant des précautions simples, telles que l'application une ou deux fois par jour, avec au préalable une aseptisation de la lésion, l'usage des écorces de *Pera benensis* pourrait être conseillé aux populations vivant dans les régions d'endémie de la leishmaniose cutanée et dépourvues des ressources suffisantes pour acheter les médicaments classiques. Bien que la plumbagone soit toxique, l'application locale des écorces de *Pera benensis* doit diminuer sa toxicité tout en restant très efficace.

Ces résultats ne peuvent pas être comparés avec ceux déjà obtenus avec la diospyrine, dimère de la 7-méthyl-juglone, où les expérimentateurs avaient testé cette naphthoquinone *in vitro* sur un parasite très différent, *L. donovani* (Hazra et al., 1987).

Selon certains auteurs (Callahan et al., 1988; Goncalves et al., 1980; Wright et Phillipson, 1990), l'activité des naphthoquinones sur les protozoaires, tels que les *Leishmania*, serait dû au fait qu'elles stimulent la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la cellule hôte favorisant ainsi la lyse des parasites très sensibles à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cette étude des principes actifs d'une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les leishmanioses cutanées provoquées par *L. braziliensis* a mis en évidence des naphthoquinones connues pour leurs propriétés antiprotozoaires et leur efficacité sur les maladies de peau (Gujar, 1990; Katsumi et Akinoki, 1990; Tsucha et Yutaka, 1990). Plusieurs de ces composés ont déjà fait l'objet d'essais biologiques sur différents modèles; le lapachol et la β-lapachone isolés de *Tabebuia rosea* (Bignoniacées) sont les plus connus pour leur activité antiprotozoaire sur *Plasmodium falciparum* (Carvalho et al., 1988) et sur *Trypanosoma cruzi* (Goncalves et al., 1980). D'autres naphthoquinones ont été signalées actives sur les protozoaires (*Plasmodium vivax*), un dérivé du lapachone, la lapinone (Hudson et al., 1985). Récemment, des naphthoquinones de synthèse (566 C 80 de Wellcome) ont été décrites actives sur *Pneumocystis carinii* (Wellcome Foundation, 1990), un parasite responsable d'une maladie opportuniste provoquant la mort de 25 %

des malades atteints du SIDA (Dei Cas, 1990).

Cette deuxième étude approfondie d'une plante employée par les Indiens Chimanes pour traiter les leishmanioses cutanées a montré une nouvelle fois que ces populations, bien qu'ignorant tout de la chimie et de la pharmacologie, ont choisi une espèce végétale contenant des principes actifs déjà reconnus scientifiquement pour leur activité antiprotozoaire, en particulier leishmanicide.

Le choix de *Pera benensis* par les Chimanes fait sans doute suite à de nombreux essais empiriques de leur part, et aussi à un remarquable don d'observation sur l'efficacité du remède employé. Cette étude démontre, une deuxième fois, l'efficacité des plantes ou plus exactement des composants de ces plantes comme moyens thérapeutiques pour traiter les leishmanioses cutanées, tout cela grâce à des informations de grandes qualités recueillies sur le terrain auprès de populations ayant une parfaite connaissance de leur milieu, la forêt tropicale.

Noms des produits	Souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade épimastigote					
	C8 CL1 IC90 en $\mu\text{g.ml}^{-1}$	R-107 IC90 en $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Te CL2 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Tula. IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1979 CL7 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	SC43 CL1 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Plumbagone	5	1	5	5	5	5
3,3'-biplumbagone	100	100	100	100	100	100
8,8'-biplumbagone	25	25	25	25	25	25
Lupéol	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Benznidazol	100	50	25	50	25	50
Nifurtimox	25	25	25	25	50	50

Tableau N° 4.6  
 Activité *in vitro* des trois quinones et du lupéol isolés de *Pera benensis* Rusby  
 sur six souches de *Trypanosoma cruzi* au stade d'épimastigote

#### 4.4.6. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs souches *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote

Les trois quinones et le lupéol isolés de *Pera benensis* ont été testés *in vitro* sur plusieurs souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote.

La plumbagone s'est montrée de loin la plus active à  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les six souches, alors que ses deux dimères ne sont actifs qu'à  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (3,3'-biplumbagone) et à  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (8,8'-biplumbagone). Ces résultats ne sont pas surprenants (voir Tableau N° 4.6). L'activité trypanocide des naphthoquinones ou de ses dérivés a été signalée par différents auteurs (Detarlovsky et al., 1990; Goijman et Stoppani, 1985; Goncalves et al., 1980; Lopes et al., 1978). Cette activité doit être confirmée sur les formes circulantes de *T. cruzi*, les trypomastigotes, voire sur le stade amastigote *in vitro* et surtout *in vivo*.

*Trypanosoma cruzi* est un parasite encore plus sensible que *Leishmania* aux composés produisant  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gutteridge, 1985) parce qu'il est totalement dépourvu de catalase (Opperdoes, 1985).

#### 4.4.7. Essais *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* au stade trypomastigote dans le sang

Après les essais biologiques *in vitro* sur les formes extracellulaires de *T. cruzi*, il était naturel de vérifier l'activité trypanocide des quatre produits isolés de *Pera benensis* sur les formes circulantes de *T. cruzi*, les trypomastigotes.

Après 24 h de contact avec les différents produits, seuls la plumbagone et le médicament de référence (le violet de gentiane) ont lysé complètement à  $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$  les trypomastigotes de la souche Y de *T. cruzi*. Le comptage visuel au microscope ne permet pas de déceler quelques trypomastigotes restant. Les puits contenant les extraits inactifs sont remis en culture dans le milieu LIT (Liver Infusion Tryptose) et suivis pendant quatre mois. Chaque semaine, la présence de parasite au stade épimastigote est contrôlée. Si celle-ci est toujours négative après ces quatre mois d'observation, le produit est considéré comme actif sur les formes circulantes de *T. cruzi*. C'est le cas de la plumbagone, seule quinone isolée de *Pera benensis* lysant complètement *T. cruzi* dans le sang.

L'activité trypanocide des naphthoquinones a souvent été signalée (Boveris et al., 1978; Docampo et al., 1978). La couleur rouge de la plumbagone

Noms des produits	Concentration initiale en parasites par ml	Concentration de parasites après 24 h de contact avec les produits à 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Extrait quinonique total des écorces de tronc ou de racines	$3 \times 10^6$	$2 \times 10^4$
Plumbagone	$3 \times 10^6$	0
3,3'-biplumbagone	$3 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$
8,8'-biplumbagone	$3 \times 10^6$	$4,1 \times 10^4$
Lupéol	$3 \times 10^6$	$6 \times 10^4$
Violet de gentiane	$1 \times 10^7$	0

Tableau N° 4.7.

Activité *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* (Y) au stade trypomastigote de l'extrait quinonique total des écorces de racines ou de tronc, des quinones et du lupéol isolés de *Pera benensis* Rusby

pourrait être un argument pour son addition dans les lots de sang stockés dans les banques de sang des pays touchés par la maladie de Chagas, si sa forte cytotoxicité empêchait son emploi dans ces conditions. La mutagénéicité de la plumbagone n'a pas été mesurée sur les cellules sanguines.

Les deux dimères de la plumbagone ne lysent pas totalement les trypomastigotes, de même que le lupéol (voir tableau 4.7).

Nous avons tenté d'aller plus loin pour démontrer l'activité trypanocide de la plumbagone, en effectuant des essais *in vivo* sur souris Balb/c infectées par *T. cruzi* (Tehuentepec) au stade trypomastigote; malheureusement ces essais n'ont pu être menés à bien. Au moment de l'expérimentation nous ne connaissions pas très bien la toxicité de la plumbagone bien que nous ayons effectué la DL<sub>50</sub>. La plumbagone a été essayée à plusieurs concentrations, 50mg.kg<sup>-1</sup> et 5 mg.kg<sup>-1</sup>, dans tous les cas les souris ont succombé au traitement de sept jours consécutifs, trois jours après l'infection par 25 000 trypomastigotes.

Des essais sur l'activité *in vitro* de la plumbagone sur *T. cruzi* au stade amastigote infectant les cellules hôtes (macrophages intrapéritonaux de souris) ont été également réalisés au laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles. Les essais n'ont pas pu être totalement menés à bien pour des raisons d'ordre technique. Nous avons néanmoins pu observer que la plumbagone à la concentration de 50 µg ml<sup>-1</sup> lysait complètement les amastigotes dans les cellules, sans que nous puissions quantifier l'activité trypanocide de la plumbagone. La concentration un peu élevée de plumbagone affectait légèrement les cellules. Il serait intéressant de recommencer ces essais à des concentrations plus faibles dans un laboratoire ayant l'expérience des essais pharmacologiques sur *T. cruzi* au stade amastigote dans les cellules hôtes.

CINQUIEME PARTIE

ETUDES CHIMIQUE  
ET BIOLOGIQUE  
D'AMPELOCERA EDENTULA  
KUHLM. (ULMACEAE)

## 5.1. ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE D'*AMPELOCERA EDENTULA* KUHLM. (ULMACEAE)

### 5.1.1. Etudes botaniques du genre *Ampelocera* et d' *Ampelocera edentula* Kulm.

Contrairement aux deux plantes précédemment étudiées, *Galipea longiflora* Kr. et *Pera benensis* Kulm., *Ampelocera edentula* Kuhlman et le genre *Ampelocera* viennent de faire l'objet d'une révision systématique par la spécialiste de la famille des Ulmées de la flora néotropica, C.A. TODZIA de l'Université de Austin, Texas, USA (Todzia, 1989).

*Ampelocera* est un petit genre comprenant neuf espèces. Elles poussent dans les régions de faible et moyenne altitude des régions tropicales du Nouveau Monde. L'aire de distribution du genre *Ampelocera* est limitée, au Nord à partir des forêts tropicales du centre du Mexique et au sud jusqu'à la Bolivie et également sur la côte méridionale du Brésil et dans les îles de la Caraïbe. Les herbiers d'*Ampelocera* sont rares parce que ce sont de grands arbres de la forêt tropicale humide très difficiles à récolter.

Le genre *Ampelocera* a été décrit pour la première fois en 1847 par Klotzsch (Klotzsch, 1847) à partir de l'espèce *Ampelocera ruizii* Ruiz et Pavon. Ce genre est inclus dans la sous-famille des Celtidoïdées elle-même appartenant à la famille des Ulmées. Les *Ampelocera* sont des arbres de taille variable reconnaissables à leur tronc à contre-forts. L'écorce est grisâtre, recouvrant un bois de coloration variant du brun clair à la couleur crème. Les feuilles de toutes les espèces sont trinervées à la base. Leur texture est coriace. Elles sont généralement glabres sauf chez *Ampelocera cubensis* et parfois légèrement pubescentes, oblongues à elliptiques à la base et atténuées au sommet. Les inflorescences sont axillaires, parfois simples, généralement des cymes. Les fleurs sont petites, de couleur crème, jaune ou verte, peu caractéristiques, avec un calice de 4 à 5 lobes, les pétales sont absents. Le nombre d'étamines varie de 4 à 16 avec des filaments fins de 1-4 mm de long. L'ovaire est supère, uniloculaire avec un ovule unique. Les fruits sont des drupes de forme et de taille très différentes suivant les espèces; ils sont généralement jaunes, asymétriques transversalement obovoïdes ou ellipsoïdes. Leur taille varie de 0,6 à 2,2 cm de long, ils peuvent être glabres à densément pubescents. Le bois d'*Ampelocera* est dur et utilisé comme bois de chauffage ou bois de construction.

Les neuf espèces d'*Ampelocera* sont les suivantes, avec leur distribution géographique et leur taille (Todzia, 1989):



- *Ampelocera cubensis* Griseb. pousse à Cuba; c'est un arbre de 5 à 30 m de haut, appelé "hueso de costa, jatia blanca" (Cuba).

- *Ampelocera ruizii* Klotzsch se rencontre au Brésil (Acre, Mato Grosso), au Pérou (Loreto, Madre de Dios, San Martin), et en Bolivie (Département de Santa Cruz, Prov. Sara, Buena Vista); c'est un arbre de 10 à 35 m de haut.

- *Ampelocera glabra* Kuhlmann. croît au Brésil (Esperito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro); c'est un arbre de 3 à 20 m de haut appelé "mentira".

- *Ampelocera macphersonii* Todzia sp. nov. pousse au Panama, en Colombie, et au Vénézuéla; c'est un arbre mesurant plus de 20 m de haut, appelé à Panama "carasuma".

- *Ampelocera longissima* Todzia a été récolté dans les forêts primaires d'Equateur (Napo). Cette espèce mesure plus de 20 m de hauteur, elle est très proche d'*Ampelocera edentula* Kuhlmann. avec qui elle est souvent confondue.

- *Ampelocera albertiae* sp. nov. a été récolté pour la première fois en Colombie en 1982 à 1750 m d'altitude le long de la route Cali-Buenaventura; c'est un arbre de 4 m de haut.

- *Ampelocera hottlei* (Standley) Standley pousse en Amérique Centrale, dans la partie méridionale du Mexique (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz), au Belize (El Cayo, El Toledo), au Guatemala (Alta Verapaz, Huehuetenango, Izabal), au Honduras (Colón), et au Nicaragua (Matagalpa, Zelaya). C'est un arbre de 10 à 30 m de haut, appelé "coquito, cautivo, guaya, ojoche blanco, popo mojo" au Mexique, "bullhoof, luin" au Belize, "luin, tison" au Guatemala, "cuscano, yayo" au Nicaragua. Son bois sert à construire les maisons et à confectionner les traverses pour les voies de chemin de fer.

- *Ampelocera macrocarpa* Forero & A. Gentry a été décrit pour la première fois à partir d'un échantillon collecté en Colombie (Chocó). Il pousse dans les forêts tropicales humides de la côte atlantique du Honduras (Atlántida), du Nicaragua (Rio San Juan, Zelaya), du Costa-Rica (Heredia), du Panama (Colón) et du Vénézuéla (Miranda, Zulia). C'est un arbre de 10 à 30 m de haut appelé "cuscano, yayo" au Nicaragua comme *A. hottlei*, et "rescaldo" au Costa-Rica.

- *Ampelocera edentula* Kuhlmann. a été récolté et décrit pour la première fois en 1940 par Kuhlmann (Kuhlmann, 1940) à partir d'un échantillon collecté dans l'Etat de Para au Brésil. C'est un arbre de 12 à 30 m de haut dont le tronc mesure à la base plus un mètre de diamètre avec des contre-forts triangulaires de 1,5 à 3 m de haut. Les jeunes rameaux sont de couleur brun-rougeâtre, glabres à pubescents et lenticellés. Les branches plus âgées sont d'un gris brun avec une écorce exfoliée et des stipules de 2 à 6 mm de long.



Figure N° 64  
 Distribution d'*Ampelocera edentula* Kuhl. (Ulmaceae), *A. albertiae* et  
*A. macrocarpa* (Todzia 1989)

Les feuilles de forme elliptique à oblongue-elliptique mesurent 8 à 26 cm de long sur 3,5 à 12 cm de large. Elles possèdent un apex acuminé avec une extrémité de 0,2 à 1,2 cm de long. Leur base est arrondie, cunéée, avec des marges entières, lustrées sur le dessus, glabres; en séchant, les deux faces deviennent lisses. Elles sont d'un vert terne à brun avec 5 à 7 nervures latérales. Le pétiole mesure 0,5 à 1,4 cm de long, il est glabre ou avec un épiderme rouge écailleux.

Les inflorescences, une à deux par axe sur les branches feuillées, sont petites, densément fleuries en panicules avec des fleurs régulières. Les rachis mesurent de 0,8 à 2,8 cm de long et se ramifient presque à la base. Ils sont densément fleuris avec 6 à 27 fleurs pubescentes. Les fleurs blanches à jaune-vert pâle sont sous-tendues par des bractées rougeâtre de 0,5 à 2 mm de long, ciliées, ovées, pointues et charnues. Les pédicelles de 0,5 à 1 mm de long sont plus étroits que le rachis et la base de la fleur. Le calice de 1,5 à 2 mm de long à quatre lobes unis dans sa partie inférieure est glabre à légèrement pubescent. Les étamines sont au nombre de six. Les filaments mesurent 3-4 mm s'élargissant à la base. Les anthères de 1 mm de long sont souvent courbées. L'ovaire supère dans les fleurs régulières est densément pubescent, oblong, et mesure 1-1,5 mm de long.

Les fruits jaunes sont globuleux à oblongs, légèrement asymétriques, glabres à un peu pubescents et rugueux. Ils mesurent 1,6 à 2,2 mm de long sur 1 à 1,7 cm de large. L'endocarpe est plus petit de 0,5 mm.

*Ampelocera edentula* Kuhl. est appelé "nina-capsi" au Pérou dans le département de San Martin. La fibre de l'écorce est solide, elle provoque au contact de la peau une irritation cutanée. L'écorce du tronc est toxique et vésicante. Les fruits seraient hypnotiques. *A. edentula* se rencontre dans les régions proches du bassin amazonien, du niveau de la mer jusqu'à 750 m d'altitude (voir Figure N° 64), au Brésil (dans les Etats d'Acre, d'Amazonas, Rondonia), au Surinam, en Guyana, au Vénézuéla (Amazonas), en Equateur (Napo), au Pérou (Huanuco, Madre de Dios, San Martin) et en Bolivie. Dans ce pays, il a été récolté pour la première fois en 1939 par KRUKOFF dans la province de Larecaja du département de La Paz près de Mapiri à 600 m d'altitude.

### 5.1.2. Ethnopharmacologie d'*Ampelocera edentula* Kuhlman.

*Ampelocera edentula* Kuhlman est appelé "sou'sou" par les Indiens Chimanes. Ce grand arbre de 25 à 30 m de haut, au tronc flanqué de grands contre-forts, est assez rare et difficile à reconnaître dans la forêt au milieu des grands arbres, souvent de même aspect. Il pousse dans les forêts primaires au pied du "monte" à 400 m d'altitude. L'écorce du tronc possède une odeur médicamenteuse très spéciale due à son essence qui peut servir à l'identifier, car il est très difficile de reconnaître le feuillage vingt à vingt-cinq mètres plus haut.

Pour traiter les leishmanioses cutanées avec les écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhlman., les Chimanes râclent l'écorce du tronc avec un outil comme une machette pour la réduire en poudre et ensuite l'appliquer directement sur la lésion provoquée par *Leishmania braziliensis*. Cette application donne une sensation de chaleur, voire de brûlure. Nos informateurs nous ont indiqué que les écorces de "sou' sou" étaient toxiques et qu'il ne fallait en aucun cas les prendre par voie orale sous forme de préparations (infusion, décoction, etc...). Les traitements se déroulent dans les mêmes conditions que celles pratiquées avec les écorces de tronc de *Galipea longiflora* et *Pera benensis*; ils durent jusqu'à la cicatrisation complète de la lésion. Cette cicatrisation serait particulièrement rapide avec les écorces d'*Ampelocera edentula* d'après nos informateurs.

Il est curieux de constater que C. TODZIA, dans sa monographie sur le genre *Ampelocera*, indique que A. GENTRY (botaniste très connu du Missouri Botanical Garden) a signalé qu'au Pérou, dans la vallée Pichis, les écorces astringentes d'*Ampelocera edentula* Kuhlman. sont employées par les Indiens Campas pour se tatouer la peau. Cette méthode de tatouage provoque une irritation de l'épiderme. Un agent colorant de ces écorces est appliqué pour cicatriser les ulcérations. L'utilisation "dermatologique" de cette plante par un groupe ethnique très différent des Chimanes, vivant dans une région éloignée, est à mettre en parallèle avec l'usage des écorces de tronc de cette plante pour traiter une maladie cutanée, la leishmaniose.

Les échantillons étudiés dans ce travail ont été récoltés à Fatima de Chimanes à une demi-journée de marche de la mission en forêt primaire à 400 m d'altitude début septembre 1988 et sont référencés sous le numéro A.F. 884. Cet échantillon a été identifié en juin 1989 par C. TODZIA (Département de Botanique, Université du Texas, Austin), la spécialiste de la famille des Ulmacées, grâce à l'aide précieuse de C. FEUILLET (ORSTOM et Smithsonian Institution, Washington, DC, USA).

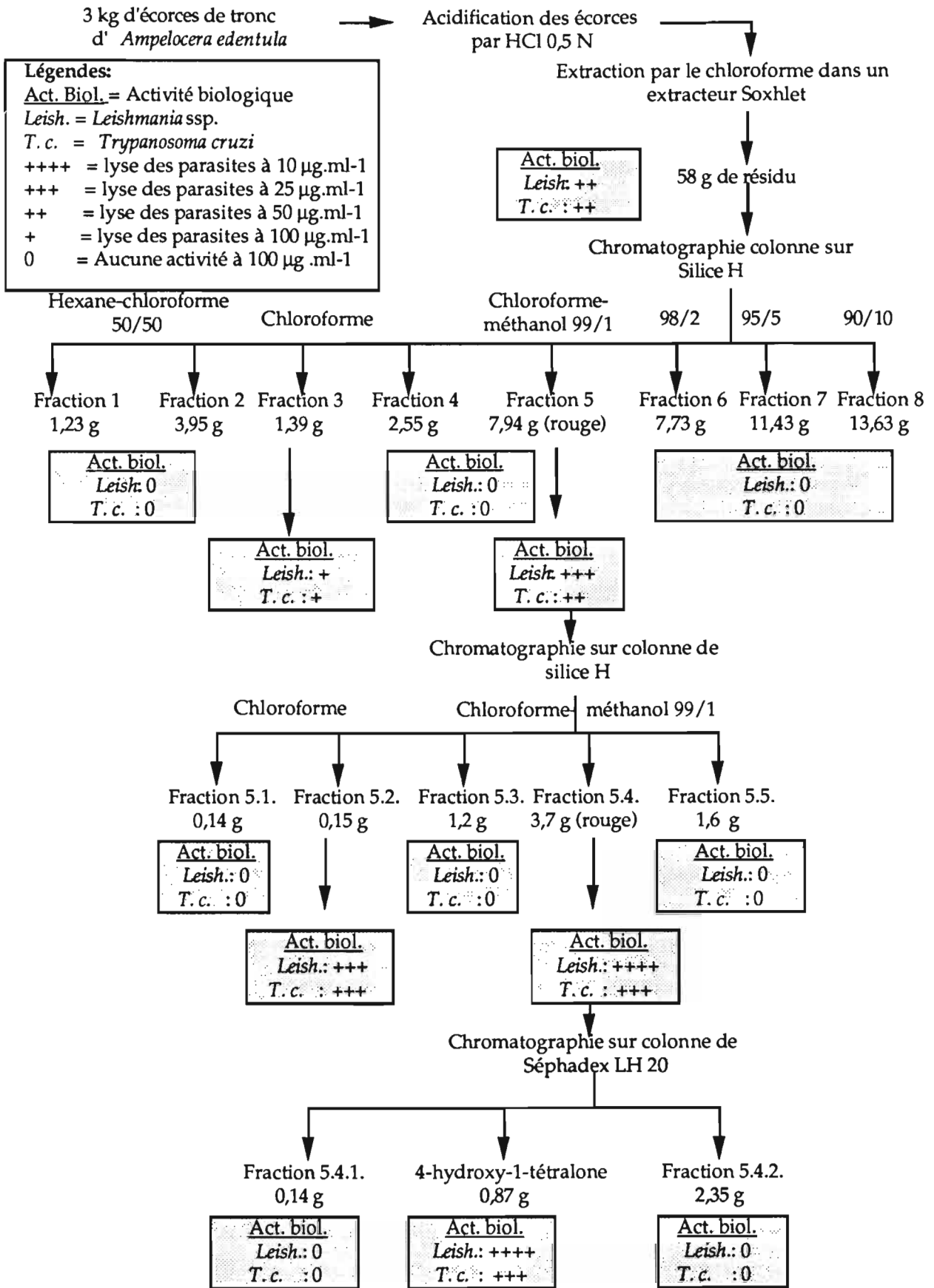


Figure N° 65 Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhl. m.

## 5.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS PAR GUIDAGE BIOLOGIQUE

Si la séparation des principes actifs des deux autres plantes étudiées a été relativement aisée du fait que nous connaissions la nature des principes actifs, cela n'a pas été le cas avec *Ampelocera edentula* Kuhl. Lorsque les études biologique et chimique de cette plante ont commencé, nous ignorions sa famille botanique et aucun des tests chimiques préliminaires n'indiquait la présence de composés chimiques spécifiques (alcaloïdes, quinones, terpènes etc...). L'activité biologique *in vitro* sur les parasites a été mise en évidence après avoir préparé une dizaine d'extraits. Finalement l'extrait chloroformique préparé à partir des écorces de tronc préalablement acidifiées par HCl 0,5 N s'est révélé actif *in vitro* à la concentration de 50 µg.ml<sup>-1</sup>. La réaction de Bornträger sur cet extrait est négative.

### 5.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhl. (Figure N° 65)

L'extraction et l'isolement ont été menés en fonction des résultats obtenus au cours des essais biologiques *in vitro* sur chaque fraction isolée. Seules les écorces de tronc ont fait l'objet d'une étude approfondie. Les autres organes de la plante n'ont montré aucune activité, sauf les écorces de racines présentant la même activité biologique *in vitro*. La composition chimique des écorces de racines semble identique sur CCM de silice (DC Alufolien 60 F 254 MERCK 5554) à celle des écorces de tronc. Plusieurs solvants de CCM ont été employés pour étudier cette plante: hexane-acétate d'éthyle 80-20, le chloroforme seul, les mélanges chloroforme-méthanol 98-2 ou 95-5. Les révélations des plaques chromatographiques ont été effectuées par la vanilline sulfurique à 5 %.

Les écorces de tronc (3 kg) d'*Ampelocera edentula* Kuhl. sont acidifiées par l'acide chlorhydrique 0,5 N et extraites par le chloroforme dans un extracteur de type Soxhlet jusqu'à l'obtention d'un jus pratiquement incolore dans l'extracteur. L'extrait est concentré sous pression réduite, séché, pesé (58 g) et testé *in vitro* sur les différentes espèces de leishmanies et de *Trypanosoma cruzi*. L'extrait lyse les deux types de parasites à la concentration de 50 µg.ml<sup>-1</sup>. La totalité de l'extrait obtenu est chromatographié sur une colonne de silice 60 H (MERCK 7736) sous une pression de 0,35 bar, l'élution commençant avec le mélange hexane-chloroforme 50-50.

La fraction 1 (1,23 g) est inactive *in vitro* à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup> sur les leishmanies et les trypanosomes.

La fraction 2 (3,95 g), éluee par le chloroforme, est également inactive *in vitro* sur les parasites à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

La fraction 3 (1,39 g), éluee au chloroforme, unitache sur CCM, est active sur les parasites à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Elle est mise de côté pour effectuer les essais *in vivo* sur les souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* au stade amastigote et la détermination de la structure chimique du produit actif.

La fraction 4 (2,55 g) est inactive *in vitro* à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

La fraction 5 (7,94 g), éluee par le mélange chloroforme-méthanol 99-1, est très colorée (rouge foncé), active *in vitro* à la concentration de 25 µg.ml<sup>-1</sup> sur les leishmanies et de 50 µg.ml<sup>-1</sup> sur les trypanosomes. L'analyse de la composition chimique de cette fraction sur CCM avec comme solvant d'élution le mélange chloroforme-méthanol 98-2 montre, après révélation de la plaque par l'acide sulfurique ou la vanilline sulfurique, la présence de plusieurs produits, en particulier un produit coloré rouge. La coloration rouge sang de cette fraction nous a incité à effectuer un essai de révélation de la plaque par la potasse alcoolique à 5 % pour détecter l'éventuelle présence de quinones. Après révélation, il est difficile de se prononcer sur la présence de quinone, la coloration rouge initiale faussant l'interprétation de la révélation. La réaction de Bornträger sur cette fraction est négative.

La fraction 6 (7,73 g) éluee par le mélange chloroforme-méthanol 98-2, la fraction 7 (11,43 g) éluee par le solvant chloroforme-méthanol 95-5, et la fraction 8 (13,63 g) éluee par le mélange chloroforme-méthanol 90-10 sont inactives *in vitro* sur les parasites à la concentration de 100 µg.ml<sup>-1</sup>.

La fraction 5 (7,94 g) est à nouveau chromatographiée sur une colonne de silice 60 H (MERCK) sous une pression de 0,35 bar, l'élution commençant par le chloroforme.

De cette colonne cinq fractions sont isolées:

- les fractions 5.1. (0,14 g), 5.3. (1,2 g) et 5.5. (1,6 g) sont inactives *in vitro* à 100 µg ml<sup>-1</sup> sur les parasites en culture et sont mises de côté.

- la fraction 5.2. (0,15 g) est active *in vitro* à la concentration de 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . L'analyse de la composition chimique de cette fraction sur CCM montre la présence de quatre produits se révélant à la vanilline sulfurique. La faible quantité obtenue et la complexité du mélange n'ont pas permis d'aller plus loin dans l'investigation de cette fraction, bien que son activité biologique soit intéressante.

- la fraction 5.4. (3,7 g), éluée par le mélange-chloroforme-méthanol 99-1, est composée de plusieurs produits sur CCM et est active *in vitro* à la concentration de 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les leishmanies et 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur les trypanosomes. Le produit rouge se trouve dans cette fraction. Une nouvelle séparation est nécessaire pour isoler le principe actif. La fraction 5.4. est chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH 20 de laquelle trois fractions sont isolées. Seule la fraction 5.4.2. (0,87 g), composée d'un seul produit rouge sur CCM, la 4-hydroxy-1-tétralone est active *in vitro* à la concentration de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur *Leishmania ssp* et à 25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur *Trypanosoma cruzi*.

Au cours de l'isolement des principes actifs d'*Ampelocera edentula* Kuhl., nous avons remarqué la présence de nombreux produits colorés, souvent rouges et même un bleu. Il sera intéressant d'effectuer l'isolement de ces substances colorées souvent réputées pour leur activité biologique.



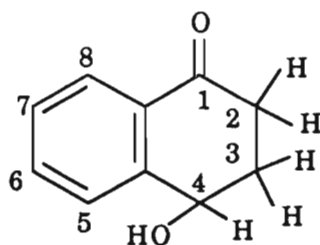


Figure N° 66  
Formule chimique de la 4-hydroxy-1-tétralone

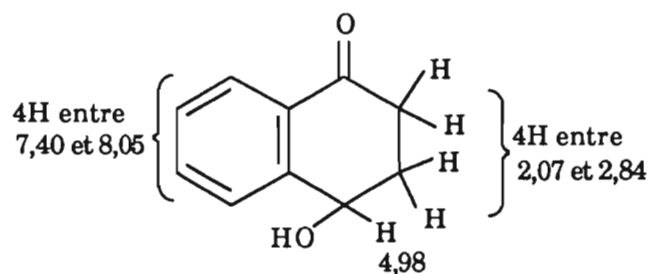


Figure N° 67  
RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-hydroxy-1-tétralone

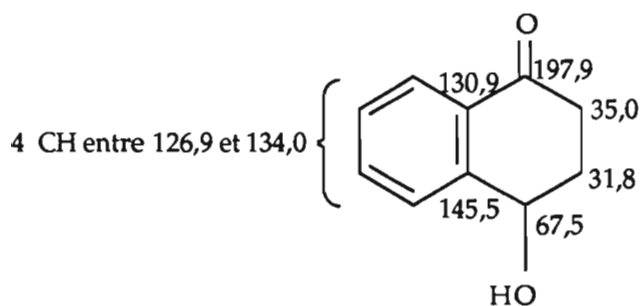


Figure N° 68  
RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la 4-hydroxy-1-tétralone

### 5.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPES ACTIFS D'*AMPELOCERA EDENTULA* KUHLM.

#### Appareillage

Les points de fusion sont mesurés en tubes capillaires et ne sont pas corrigés.

Les spectres sont enregistrés sur les appareils suivants:

- Ultraviolet, PHILIPS PU 8725, éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))
- Infrarouge, PERKIN ELMER 257, KBr ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )
- RMN  $^1\text{H}$ , BRUKER AC 200 P,  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7,27$  ppm)
- RMN  $^{13}\text{C}$ , BRUKER AC 200 P à 50 MHz
- Masse, NERMAG R 1010 C en impact électronique (IE) à 70 ev ( $m/z$  (%))

#### 5.3.1. La 4-hydroxy-1-tétralone

C'est un produit huileux jaunâtre soluble dans l'éther de pétrole, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. Sa teneur dans les écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhl. est estimée à  $290 \text{ mg.kg}^{-1}$ , il est actif *in vitro* à  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  sur *Leishmania* ssp. et à  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sur *Trypanosoma cruzi*.

Le spectre infrarouge sur KBr montre une absorption intense à  $1680 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à une cétone conjuguée, ce que confirme le signal à 197,9 ppm sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure N° 68). Ce dernier présente en outre 2 carbones quaternaires et 4 CH aromatiques permettant de conclure à la présence d'une benzophénone. Les ions à  $m/z$  105 (100 %) et 77 (46 %) sur le spectre de masse confirment cette hypothèse. L'ion moléculaire à  $m/z$  162 permet alors de proposer une formule brute de  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$ , compatible avec une hydroxy tétralone.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure N° 67) confirme la présence de 4 protons aromatiques adjacents et de 5 protons aliphatiques dont 1 à 4,98 ppm est géminé à un hydroxyle et fortement déblindé par la présence du carbonyle, ce qui permet de localiser l'hydroxyle en position 2 ou 4 de l' $\alpha$ -tétralone.

L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Figure N° 67) permet de choisir entre les deux hypothèses de structure possibles, la 4-hydroxy-1-tétralone ou la 2-hydroxy-1-tétralone;

Par comparaison au spectre de l' $\alpha$ -tétralone (Jackman et Sternhell, 1969), les protons benzyliques de la 2-hydroxy-1-tétralone ne devraient pas résonner à moins de 2,92 ppm ce qui ne correspond pas aux valeurs observées pour notre produit. D'autre part, le proton géminé à l'hydroxyle est trop déblindé pour être situé en  $\alpha$  du carbonyle qui est conjugué au noyau benzénique. Par contre, la conjugaison du carbonyle explique parfaitement un fort déblindage du proton en position 4. La valeur observée à 4,98 ppm s'avère en parfait accord avec les valeurs publiées, 4,98 ppm pour la 2, 4, 8-trihydroxy-1-tétralone (Fujimoto et al., 1986) et 4,92 ppm pour la 4, 8-dihydroxy-1-tétralone (Talapatra et al., 1988).

Par ailleurs, les ions observés en spectrométrie de masse, en particulier celui à  $m/z$  134 correspondant à la perte d'éthylène et celui à  $m/z$  115 (134-29), correspondent bien à une 4-hydroxy-1-tétralone. L'ion à  $m/z$  134 se formerait par un mécanisme de rétro-Diels-Alder et impliquerait une relation 1, 4 entre le carbonyle et l'hydroxyle (Bollag et al., 1975).

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer à notre composé la structure d'un produit connu, la 4-hydroxy-1-tétralone ou 4-hydroxy-3,4-dihydro (2H)-naphtalénone ou 4-hydroxy-D<sup>2,3</sup>-benzocyclohexanone. Ce produit a été identifié comme métabolite de dégradation du naphtalène et du 1-naphtol (Bollag et al., 1975; Cernaglia et al., 1980). Il est métabolisé par des champignons (Cerniglia 1982) et des levures (Cerniglia et al., 1981). Il est également employé comme produit intermédiaire pour synthétiser des antibiotiques (Ramesh et al., 1990).

La 4-hydroxy-1-tétralone est considérée comme un précurseur biosynthétique des naphtoquinones, en particulier de la juglone, de la catalpalactone et du catalponol, des naphtoquinones isolées d'une Bignoniacée, *Catalpa ovata* G. Don. (Inoue K. et al., 1978; Inoue K. et al., 1981).

A notre connaissance c'est la première fois que la 4-hydroxy-1-tétralone est isolée à partir d'une plante. La présence dans les écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhlm. de nombreux produits colorés non actifs *in vitro* sur les parasites laisse à penser que celles-ci doivent renfermer des dérivés de la 4-hydroxy-1-tétralone. La présence de dérivés quinoniques a déjà été signalée chez les Ulmacées en particulier des naphtoquinones sesquiterpénoïques (Thomson, 1987) dans le genre *Ulmus* (Chen et al., 1972; Le Thi Ngoc et Ourisson, 1983; Rowe et al., 1972) et *Zelkova serrata* (Hayashi et al., 1972).

C'est la première fois qu'une espèce du genre *Ampelocera* fait l'objet d'une étude de sa composition chimique.

4 HYDROXY-1-TETRALONE

*Produit huileux, C<sub>10</sub> H<sub>10</sub> O<sub>2</sub>*

*Spectre UV : éthanol ( $\lambda$  max, (log  $\epsilon$ ))*

*204 (4,35), 249 (4,04), 289 (3,20)*

*Spectre IR: KBr ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>)*

*3300, 2900, 1680, 770*

*Spectre de masse: m/z (%)*

*M<sup>+</sup>: 162 (19), 134 (84), 134 (69), 115 (22), 105 (100), 77 (46)*

*Spectre de RMN <sup>1</sup>H: (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) Figure N° 67*

*Spectre de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) Figure N° 68*

### 5.3.2.: Autre produit actif: la fraction 3

La fraction 3 se révèle à la vanilline sulfurique sur la plaque de silice sous la forme d'une tache bleue unique. Ce composé est incolore en solution et se présente sous la forme d'un produit pâteux blanchâtre. La pureté de ce produit a été contrôlée en chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cette analyse a montré que la fraction 3 paraissant pure en CCM est en fait un mélange de plusieurs composés. Les spectres de RMN <sup>1</sup>H et de RMN <sup>13</sup>C de cette fraction indiquent également que ce produit actif est un mélange.

Après les essais biologiques *in vivo* (voir 5.4.4.2.), nous ne disposons plus que d'une faible quantité de cette fraction (50 mg environ); il n'a pas été possible d'émettre une hypothèse de structure chimique, ni de désigner le ou les produits responsables de l'activité sur les leishmanies et les trypanosomes.

<sup>1</sup> *Leishmania braziliensis*

<sup>2</sup> *Leishmania amazonensis*

<sup>3</sup> *Leishmania donovani*

Noms des produits	Concentration inhibant 90 % des parasites en µg.ml <sup>-1</sup> (IC 90)				
	<i>L. b.</i> <sup>1</sup> (2903)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> ( PH8)	<i>L. a.</i> <sup>2</sup> (H-142)	<i>L. d.</i> <sup>3</sup> (2682)	<i>L. d.</i> <sup>3</sup> (HS70)
4-hydroxy-1-tétralone	10	10	10	10	10
Fraction 3	50	50	50	50	50
Médicaments de référence					
Antimoniote de méglumine ou Glucantime <sup>R</sup>	>100	>100	>100	>100	>100
Pentamidine	1	1	1	1	1

Tableau N° 5.1.

Inhibition *in vitro* de la croissance de plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote après 48h de contact avec la 4-hydroxy-1-tétralone et la fraction 3 isolées d'*Ampelocera edentula* Kuhl. (deux médicaments de référence, le Glucantime<sup>R</sup> et la pentamidine)

Produits	Souche de <i>L. amazonensis</i>	Concentration en µg.ml <sup>-1</sup>	Viabilité cellulaire % macrophages vivants	% amastigotes survivants Indice de Survie (I.S.)
4-hydroxy-1-tétralone	PH 8	100	0	39
		50	61	
		10	100	
Fraction 3	PH 8	100	0	56
		50	64	
		10	100	
Glucantime <sup>R</sup>	PH 8	100	65	0
		10	85	11

Tableau N° 5.2.

Activité biologique *in vitro* et cytotoxicité de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 isolées d'*Ampelocera edentula* Kuhl. sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c.

## 5.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES AVEC LES COMPOSES ACTIFS ISOLEES D'AMPELOCERA EDENTULA KUHLM.

### 5.4.1. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs espèces de *Leishmania* ssp. au stade promastigote (voir tableau N° 5.1)

La 4-hydroxy-1-tétralone est cinq fois plus active sur les différentes souches de *Leishmania* sp. au stade promastigote ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) que la fraction 3 ( $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ). L'activité leishmanicide de ces produits est identique sur toutes les espèces de *Leishmania*. L'activité de la 4-hydroxy-1-tétralone, précurseur biogénétique des naphtoquinones, est à mettre en relation avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions avec la plumbagone isolée de *Pera benensis*.

### 5.4.2. Activité biologique *in vitro* de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote infectant des macrophages intrapéritonéaux de souris Balb/c (voir tableau N° 5.2.)

Malgré les problèmes rencontrés pour effectuer les essais biologiques sur le modèle *in vitro*, infection des macrophages par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote, les produits actifs isolés d'*Ampelocera edentula* ont pu être testés normalement sur ce modèle biologique.

A  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , les deux produits sont cytotoxiques, ils lysent complètement les cellules hôtes. A  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , toutes les cellules hôtes sont vivantes au contact de l'un ou de l'autre produit. A cette concentration, la 4-hydroxy-1-tétralone inhibe presque les deux tiers des amastigotes de *L. amazonensis* (PH8) présents dans les macrophages et la fraction 3,44 % des parasites intra-cellulaires.

Il est dommage que l'activité sur les amastigotes ne soit pas plus précise. Il aurait été intéressant d'évaluer l'efficacité des deux produits à des concentrations légèrement plus importantes, 25 ou  $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . A  $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , les deux produits ont pratiquement la même cytotoxicité sur les macrophages, affectant un tiers de ceux-ci.

Ces résultats intéressants obtenus lors de ces essais sur l'infection des macrophages intrapéritonéaux de souris par *L. amazonensis* au stade amastigote

doivent être confirmés *in vivo* sur les souris Balb/c infectées par les mêmes parasites.

#### 5.4.3. Mesure de la toxicité (DL<sub>50</sub>) de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 (voir tableaux N° 5.3 et 5.4)

La 4-hydroxy-1-tétralone est nettement plus toxique que la fraction 3. A 48h et à 72 h, la DL<sub>50</sub> de ce composé (par voie intrapéritonéale) est calculée à 168 mg kg<sup>-1</sup> alors que celle de la fraction 3 est supérieure à 450 mg.kg<sup>-1</sup>. Suite à ces mesures de toxicité et après quelques essais préliminaires, il a été décidé d'effectuer les traitements longs de 14 jours consécutifs à la concentration de 25 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> de 4-hydroxy-1-tétralone et de 100 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> de la fraction 3. Ces concentrations sont doublées pour les essais d'inoculation locale du traitement au point de l'infection parasitaire, sur la patte arrière de l'animal.

Nombre de souris par lot expérimental	5
Mode d'inoculation	Intrapéritonéal
Conc. max.	450 mg
Conc. min	50 mg
Raison de	3
de la progression	

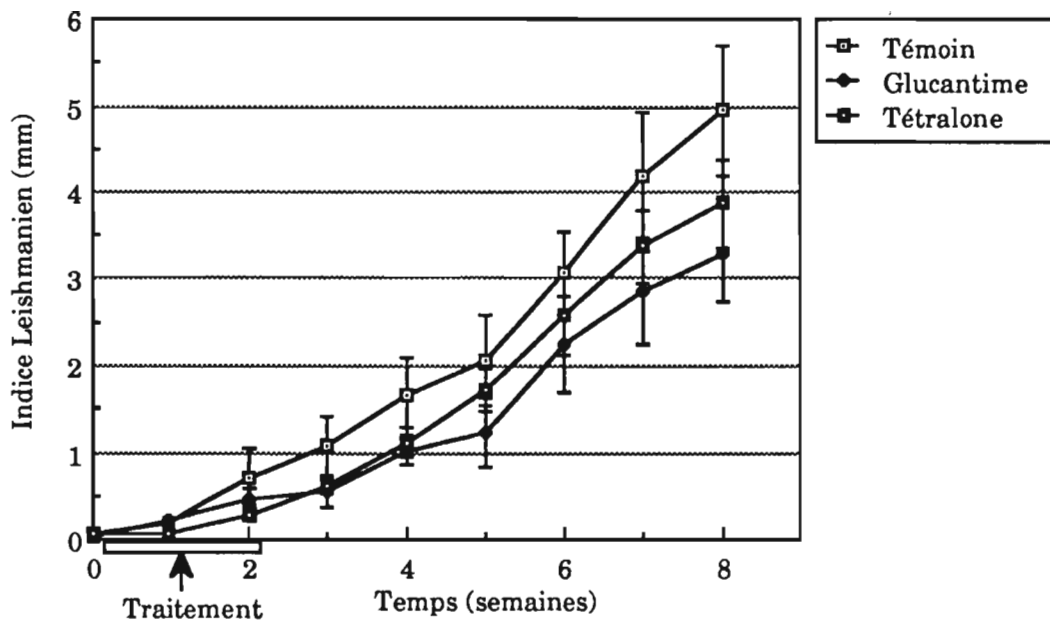
Temps d'observation des souris	Calcul de la DL <sub>50</sub>
2 h	>450 mg.kg <sup>-1</sup>
24 h	172 mg.kg <sup>-1</sup>
48 h	168 mg.kg <sup>-1</sup>
72 h	168 mg.kg <sup>-1</sup>

Tableau N° 5.3.  
Toxicité de la 4-hydroxy-1-tétralone (DL<sub>50</sub>)

Nombre de souris par lot expérimental	5
Mode d'inoculation	Intrapéritonéal
Conc. max.	450 mg
Conc. min	50 mg
Raison de	3
de la progression	

Temps d'observation des souris	Calcul de la DL <sub>50</sub>
2 h	>450 mg.kg <sup>-1</sup>
24 h	>450 mg.kg <sup>-1</sup>
48 h	>450 mg.kg <sup>-1</sup>
72 h	>450 mg.kg <sup>-1</sup>

Tableau N° 5.4.  
Toxicité de la fraction 3 (DL<sub>50</sub>)



Courbe N° 5.1

Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone ( $25 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) isolée de *Ampelocera edentula* Kulm. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection



#### 5.4.4. Activité biologique *in vivo* de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 extraites d'*Ampelocera edentula* Kuhl. sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) ou de *L. venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

##### 5.4.4.1. La 4-hydroxy-1-tétralone

##### 5.4.4.1.1. Activité biologique *in vivo* de la 4-hydroxy-1-tétralone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 5.1)

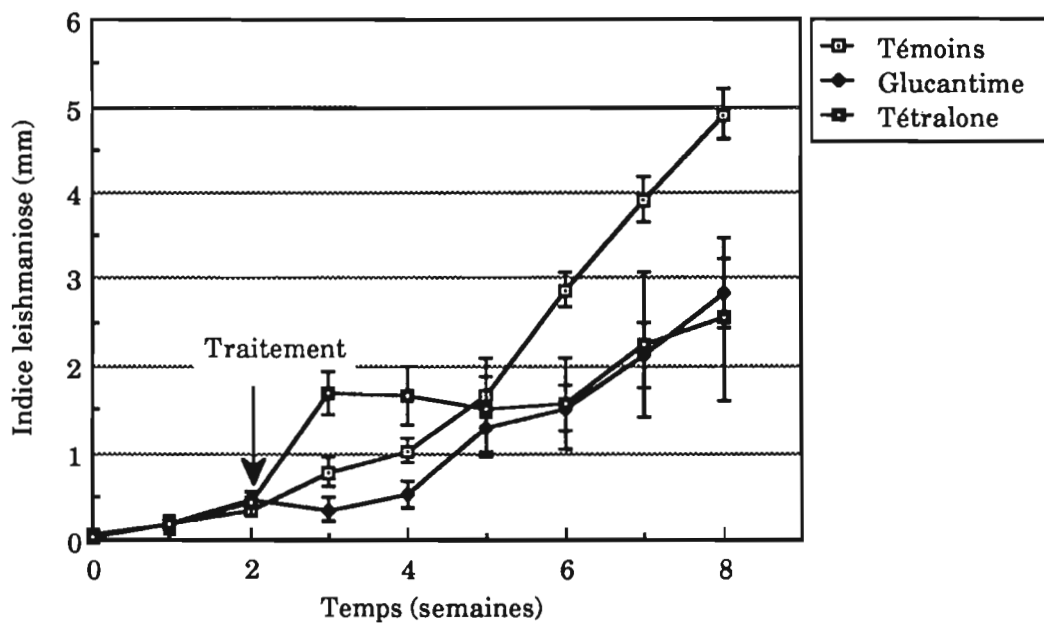
Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	25 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

La toxicité de la 4-hydroxy-1-tétralone et l'expérience acquise après les essais de traitements avec la plumbagone nous ont incité à la prudence pour effectuer les essais sur les souris Balb/c. La concentration de 25 mg.kg<sup>-1</sup> correspond approximativement au sixième de la DL<sub>50</sub>.

Pendant les huit semaines de l'expérimentation, aucun incident n'a été enregistré. La nature huileuse de la 4-hydroxy-1-tétralone facilite grandement la préparation de la solution à administrer.

Les quatre premières semaines du protocole expérimental, la croissance des lésions chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> ou avec la 4-hydroxy-1-tétralone est sensiblement la même, 1 mm chez les premières et 1,1 mm chez les secondes.

A ce stade de l'expérimentation, les lésions du lot expérimental témoin mesurent 1,7 mm. A partir de la cinquième semaine et jusqu'au terme du



Courbe N°5.2

Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée d'*Ampelocera edentula* Kulm et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours *post*-infection

protocole, les lésions chez les souris traitées avec la 4-hydroxy-1-tétralone croissent un peu plus rapidement que chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>.

A la huitième semaine, les moyennes des Indices Leishmaniens sont les suivants pour les trois lots expérimentaux: le lot témoin parasite 5 mm, le lot traité avec le Glucantime<sup>R</sup> 3,3 mm et le lot traité avec la 4-hydroxy-1-tétralone 3,9 mm. Statiquement, l'écart entre les IL des lots expérimentaux témoins et le Glucantime<sup>R</sup> est significatif, ce qui n'est pas le cas avec les groupes expérimentaux 4-hydroxy-1-tétralone et témoins. Les IL de ces derniers sont différents de plus d'un millimètre (5 mm pour les témoins et 3,9 mm pour les autres), mais statistiquement non significatifs.

Ce résultat est la conséquence directe de la diminution du nombre de souris par groupe expérimental, six au lieu de dix dans les précédents protocoles, qui provoque une plus grande dispersion des mesures. Malgré ces résultats moyens, le traitement avec la 4-hydroxy-1-tétralone ralentit nettement la croissance des lésions provoquées par la multiplication de *L. amazonensis* (PH8) au stade amastigote mais un peu moins que le Glucantime<sup>R</sup>.

5.4.4.1.2. Activité biologique *in vivo* de la 4-hydroxy-1-tétralone administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 5.2.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	400 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentration de produit à tester	50 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

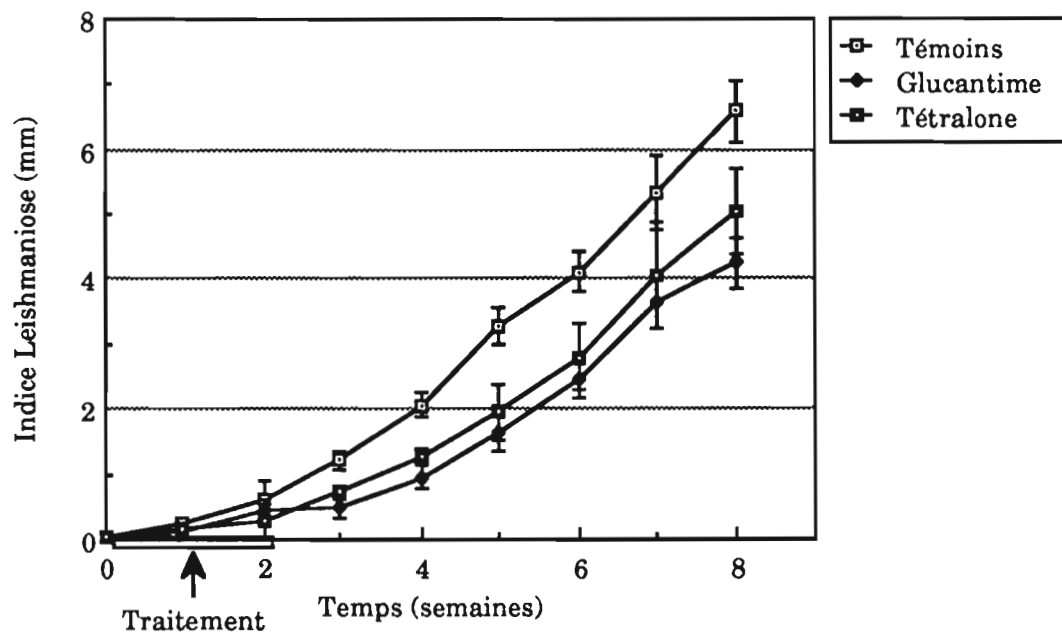
L'activité des principes actifs des écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* devait être confirmée par l'inoculation de la 4-hydroxy-1-tétralone à l'endroit de l'infection parasitaire. En effet, lorsque nos informateurs Chimanes nous ont indiqué l'usage des écorces de tronc pour traiter les lésions de leishmaniose cutanée, nous n'avions aucune idée de l'identification botanique de cette plante et encore moins du type des composés actifs présents dans cette plante.

L'inoculation 14 jours après l'infection parasitaire d'un traitement unique renfermant  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de 4-hydroxy-1-tétralone permet de confirmer l'activité leishmanicide entrevue lors des essais *in vitro* sur les amastigotes infectant les cellules hôtes et les résultats intéressants obtenus lors de l'expérimentation sur le modèle animal avec *Leishmania amazonensis* (PH8).

Après l'administration de la 4-hydroxy-1-tétralone, il se produit une importante inflammation de la patte traitée. Elle se résorbe trois semaines après le traitement. A la cinquième semaine, la situation redevient normale, les IL sont pratiquement les mêmes chez les trois lots expérimentaux, 1,7 mm (témoins), 1,3 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 1,5 mm (4-hydroxy-1-tétralone). La sixième semaine les lésions des souris témoins s'accroissent de 1,2 mm, alors qu'elles restent presque stables chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et diminuent légèrement de 0,2 mm chez les souris traitées avec la 4-hydroxy-1-tétralone. Les deux dernières semaines de l'expérimentation, les lésions augmentent de 2 mm chez les souris témoins, de 1,3 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et de 1 mm chez les souris traitées avec la 4-hydroxy-1-tétralone. Finalement, à la dernière semaine, l'IL des souris traitées avec la 4-hydroxy-1-tétralone est inférieur de 0,3 mm à celui mesuré chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>. Il est remarquable de voir l'effet retard de la 4-hydroxy-tétralone qui se comporte de la même manière que le Glucantime<sup>R</sup>.

A la huitième semaine, les IL des témoins sont le double de ceux mesurés chez les souris traitées avec la 4-hydroxy-1-tétralone, 4,9 et 2,5 mm.

Ce protocole montre clairement que la 4-hydroxy-1-tétralone est très active *in vivo* pour inhiber la multiplication de *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote lorsqu'elle est administrée localement. Ce résultat démontre que les écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* sont efficaces pour traiter les leishmanioses cutanées.



Courbe N° 5.3

Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone ( $25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Ampelocera edentula* Kulm. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3), début du traitement 24 h *post*-infection

5.4.4.1.3. Activité biologique *in vivo* de la 4-hydroxy-1-tétralone sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote

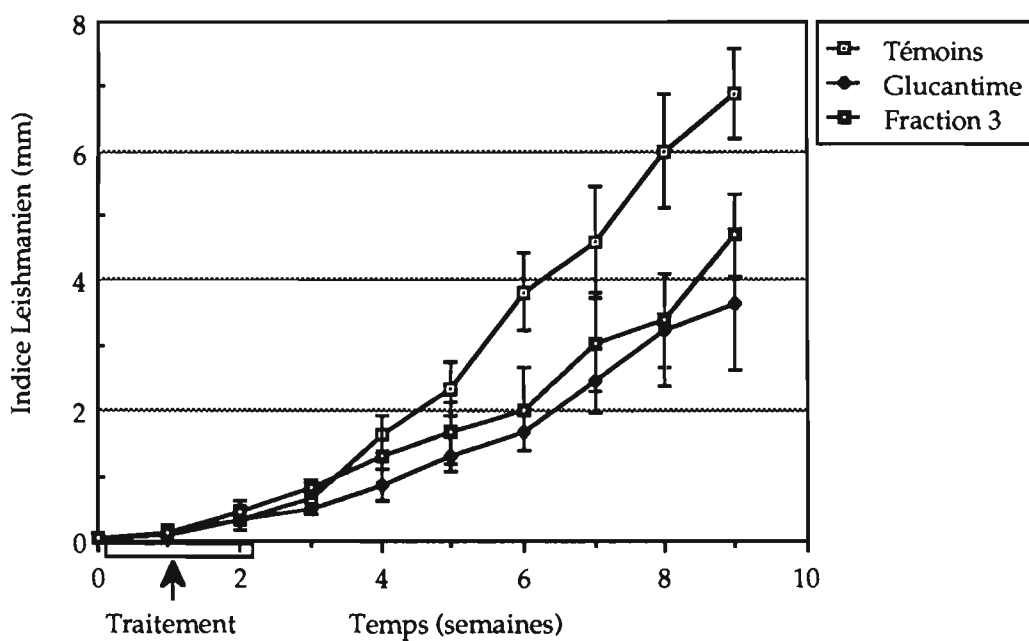
Conditions expérimentales (courbe N° 5.3.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	16 g
Réf. de la souche de <i>L. v.</i>	H-3
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	200 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>
Concentrations de produit à tester	25 mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup>

L'activité leishmanicide de la 4-hydroxy-1-tétralone est évaluée *in vivo* sur une autre espèce de leishmaniose cutanée. Le choix de *Leishmania venezuelensis* est idéal pour confirmer les résultats intéressants obtenus lors des deux précédentes expérimentations.

Les trois premières semaines, la croissance des IL des souris des trois groupes expérimentaux est assez faible, 1,2 mm (témoins), 0,5 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 0,7 mm (4-hydroxy-1-tétralone). La quatrième semaine de l'expérimentation, il se produit une augmentation de 0,9 mm des lésions chez les souris témoins, alors que chez les souris traitées, elle est modérée: 0,5 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 0,6 mm (tétralone). Les quatre dernières semaines, la croissance des IL est constante chez tous les lots expérimentaux. Elle est calculée à 4,5 mm chez les souris témoins, à 3,3 mm chez les souris traitées avec le dérivé antimonié et à 3,8 mm chez les souris traitées avec la tétralone. En analysant ces données, il est intéressant de noter que les traitements ne protègent relativement bien de la multiplication de *Leishmania venezuelensis* (H-3) au stade amastigote que deux semaines après l'arrêt du traitement.

Les semaines suivantes, la croissance des lésions est pratiquement la même chez toutes les souris, 1,7 mm chez les témoins, 1,8 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup>, et 2,2 mm chez les souris traitées avec la tétralone.



Courbe N° 5.4

Activité de la fraction 3 ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) isolée de *Ampelocera edentula* Kulm. et du Glucantime<sup>R</sup> ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) administrés pendant 14 jours consécutifs sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), début du traitement 24 h *post*-infection

Si nous avons continué l'expérimentation deux ou trois semaines supplémentaires, nous aurions sans doute obtenu chez toutes les souris des lésions de même importance. Mais tout ceci est théorique car en pratique, lorsque la première série de piqûres de Glucantime<sup>R</sup> n'est pas assez efficace, le traitement est suspendu dix à quinze jours puis repris dans les mêmes conditions.

Cette expérimentation a permis de confirmer que la 4-hydroxy-1-tétralone était presque aussi efficace que le Glucantime<sup>R</sup>. Cette activité peut être reliée à la structure chimique des tétralones, proches de celles des naphthoquinones. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une tétralone est décrite comme leishmanicide.

#### 5.4.4.2. Fraction 3

5.4.4.2.1. Activité biologique *in vivo* de la fraction 3 sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 5.4.)

Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	18 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	8
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	24 heures post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau du dos (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	14 jours consécutifs
Durée de l'expérimentation	9 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$200 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Bien que non identifiée chimiquement, la fraction 3 paraissant pure sur CCM a fait l'objet d'une évaluation de son activité leishmanicide sur les différents modèles *in vivo* à notre disposition. Elle est nettement moins toxique que la 4-hydroxy-1-tétralone, sa DL<sub>50</sub> est supérieure à  $450 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mais moins



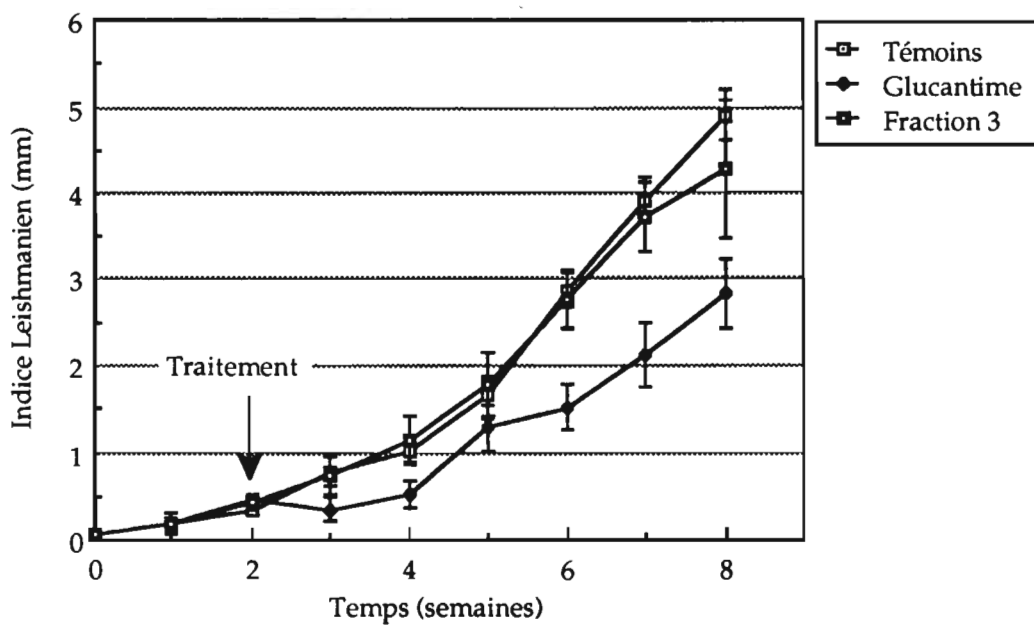
active *in vitro* sur les leishmanies au stade promastigote et sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote.

La marge entre la toxicité et une possible activité leishmanicide paraît importante. Les traitements de 14 jours ont été effectués à la concentration quotidienne de 100 mg.kg<sup>-1</sup>.

Aucun problème n'a été observé au cours de cette expérimentation. Les cinq premières semaines, la croissance des lésions est modérée chez toutes les souris, 2,3 mm chez les souris témoins, 1,3 mm chez les souris traitées avec le dérivé antimonié et 1,7 mm chez les souris traitées avec la fraction 3. La 6<sup>ème</sup> semaine, il se produit une importante croissance des lésions, en particulier chez les souris témoins (1,5 mm). Cette augmentation des lésions chez les souris témoins est continue jusqu'à la neuvième semaine. Dans le même temps, les lésions des souris traitées évoluent pratiquement de la même manière entre la sixième semaine et la huitième semaine, elles augmentent de 1,9 mm chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> et de 1,7 mm chez les souris traitées avec la fraction 3. A ce moment de l'expérimentation, les IL de ces deux groupes expérimentaux sont pratiquement identiques, 3,2 mm (Glucantime<sup>R</sup>) et 3,4 mm (terpène). A la neuvième semaine, il se produit un accroissement des lésions de 1,3 mm chez les souris traitées avec la fraction 3 alors que la moyenne des IL chez les souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> n'augmente que de 0,5 mm.

Enfin, finalement en fin d'expérimentation, les IL des souris traitées avec le Glucantime<sup>R</sup> sont inférieurs de 1 mm (3,7 mm) à ceux mesurés chez les souris traitées avec la fraction 3 (4,7 mm). Du point de vue statistique, les écarts de mesure entre ces deux groupes expérimentaux ne sont pas significatifs, et se démarquent très nettement des IL des souris témoins.

Il est dommage que nous n'ayons pas pu identifier chimiquement la ou les substances responsables de l'activité leishmanicide, qui sembleraient appartenir à une famille de produits différente des tétralones.



Courbe N°5.5

Activité de la fraction 3 ( $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) isolée d'*Ampelocera edentula* Kulm et du Glucantime<sup>R</sup> ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8), le traitement s'effectuant 14 jours post-infection

5.4.4.2.2. Activité biologique *in vivo* de la fraction 3 administrée localement en dose unique à des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote

Conditions expérimentales (courbe N° 5.5)

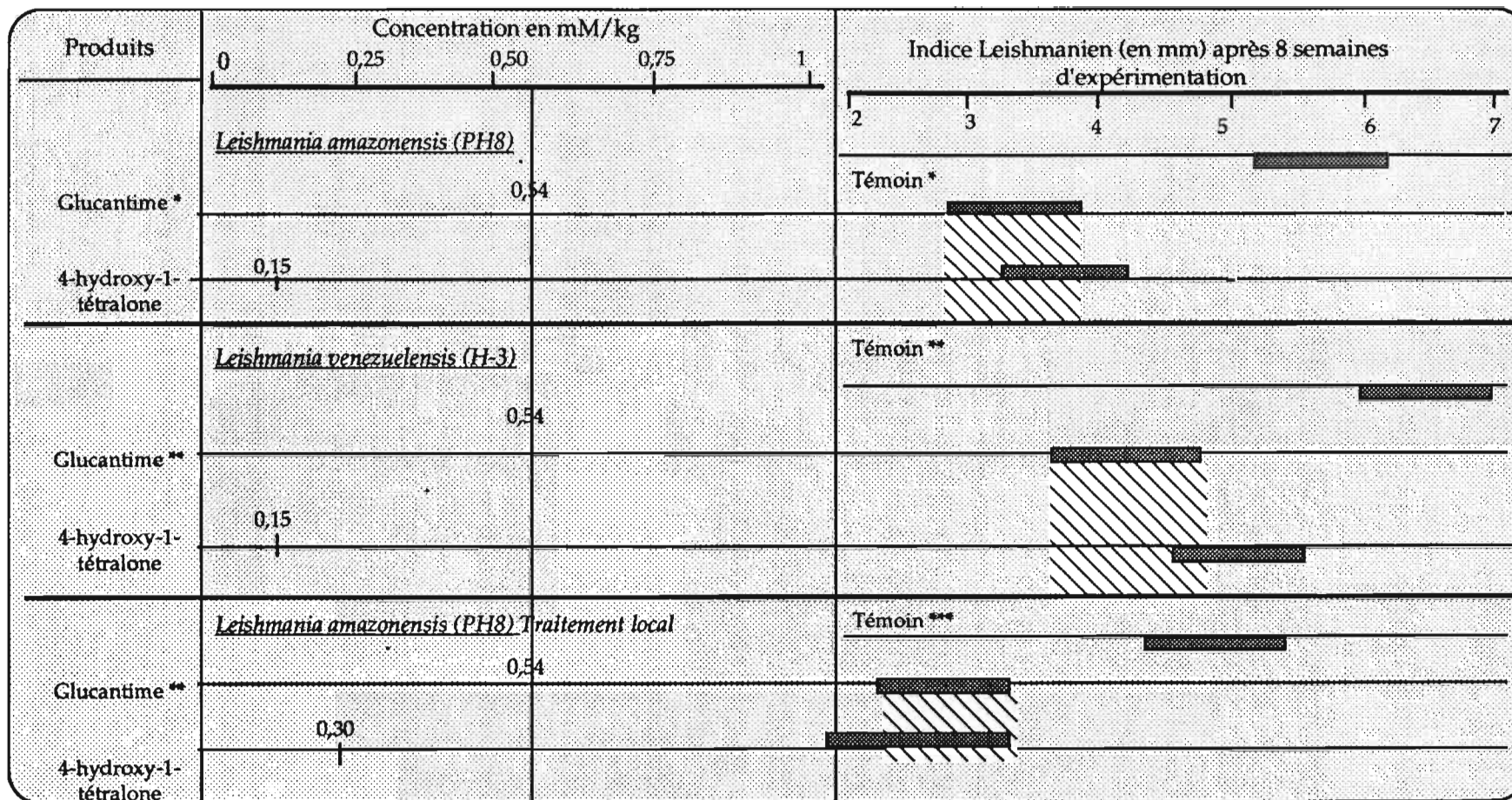
Sexe des souris	Mâles
Poids moyen	17 g
Réf. de la souche de <i>L. a.</i>	PH8
Nombre de souris par lot	6
Quantité d'amastigotes inoculée	$1 \times 10^6$ dans 200 $\mu$ l
Début du traitement	14 jours post infection
Mode d'inoculation des médicaments	sous cutanée au niveau de la patte infectée (200 $\mu$ l)
Durée du traitement	Dose unique
Durée de l'expérimentation	8 semaines
Concentration de Glucantime <sup>R</sup>	$400 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
Concentration de produit à tester	$150 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Suite à l'expérimentation précédente, nous avons voulu savoir si la fraction 3 avait une activité antiparasitaire lorsque les écorces de tronc sont appliquées localement sur les lésions en médecine traditionnelle.

Connaissant la faible toxicité de ce produit, la concentration de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  a été choisie.

Lors de l'inoculation du traitement, aucune inflammation de la patte traitée, n'a été observée. En revanche, ce traitement ne ralentit en rien la croissance des lésions, sauf la dernière semaine où il se produit une légère diminution de la croissance des lésions chez les souris traitées avec la fraction 3. Les lésions mesurées chez les souris traitées avec la fraction 3 sont inférieures de 0,6 mm (4,3 mm) à celles des souris témoins (4,9 mm). Cette différence n'est pas significative sur le plan statistique.

La fraction 3 inoculée localement n'a aucune activité sur *Leishmania amazonensis* au stade amastigotes.



**Légende**

■ Indice Leishmanien +/- Intervalle de confiance au risque  $\alpha$  5 %

//// Activité du Glucantime

\* Moyenne sur 14 souris, \*\* Moyenne sur 6 souris

Schéma N° 5.1.  
 Activité comparative du Glucantime et de la 4-hydroxy-1-tétralone isolée d'*Ampelocera edentula* Kulm administrés par voie sous cutanée ou localement sur des souris Balb/c infectées par *Leishmania amazonensis* (PH 8) et par *L. venezuelensis* (H-3)

#### 5.4.5. Discussion des résultats obtenus lors des essais biologiques *in vivo* sur souris Balb/c infectées par les leishmanies et traitées avec les principes actifs d'*Ampelocera edentula* Kuhl.

Deux produits actifs ont été isolés dont un seul a pu être identifié chimiquement à partir des écorces de tronc d'*Ampelocera edentula* Kuhl. L'isolement de ces produits a été rendu plus difficile que lors des précédentes études par manque de répère phytochimique.

La famille des Ulmacées ne se distingue pas particulièrement par la présence de métabolites spécifiques orientant les recherches. Des principes actifs, seule la 4-hydroxy-1-tétralone a été identifiée et a réellement confirmé son activité leishmanicide au cours des différentes expérimentations biologiques *in vitro* sur *Leishmania* ssp. au stade promastigote, sur *Leishmania amazonensis* (PH8) au stade amastigote et *in vivo* sur des souris Balb/c infectées par la même espèce ou par *L. venezuelensis*.

Dans tous les cas, ce composé s'est révélé presque aussi actif que le produit de référence (voir schéma N° 5.1). Il est administré à 0,15 mM.kg<sup>-1</sup> par voie sous cutanée pendant 14 jours et à 0,30 mM.kg<sup>-1</sup> localement au point d'infection.

De ce point de vue, la 4-hydroxy-1-tétralone peut être considérée comme plus efficace que le Glucantime<sup>R</sup> lorsqu'elle est administrée localement au niveau de l'infection parasitaire. Ces résultats démontrent que les écorces du tronc d'*Ampelocera edentula* ou "sou' sou" en Chimane possèdent réellement des propriétés leishmanicides dûes à la présence de la 4-hydroxy-1-tétralone qui agirait comme accepteur d'électron (Cerniglia et Gibson, 1977), donc rentrerait dans le même mécanisme d'action que les naphtoquinones. Après avoir identifié le produit actif, ce résultat n'est pas très étonnant. La structure chimique des tétralones est proche de celles des naphtoquinones (Inoue et al., 1981), elles-mêmes réputées pour leur activité antiparasitaire (voir Quatrième Partie). Néanmoins c'est la première fois que ce type de produit est décrit comme leishmanicide.

Pour la troisième fois dans ce travail, l'activité leishmanicide d'une plante employée traditionnellement par les indiens Chimanes pour traiter les leishmanioses est démontrée. Sans information ethnopharmacologique jamais, nous n'aurions collecté les écorces de cet arbre de 30 m de haut. Ce type d'arbre, fait rarement l'objet de récolte car il est très difficile par la suite de les identifier botaniquement. La présence dans l'extrait travaillé de nombreux produits colorés nous laisse penser que d'autres dérivés quinoïdes sont présents dans cet extrait, et qu'il serait intéressant de les isoler et d'évaluer leur activité biologique

Souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade épimastigote						
Noms des produits	C8 CL1 IC90 en $\mu\text{g.ml}^{-1}$	R-107 IC90 en $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Te CL2 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Tula. IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	1979 CL7 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	SC43 CL1 IC90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
4-hydroxy-1-tétralone	10	10	10	10	10	10
Fraction 3	50	50	50	50	50	50
Benznidazol	100	50	25	50	25	50
Nifurtimox	25	25	25	25	50	50

Tableau N° 5.5.

Activité *in vitro* de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 isolées d'*Ampelocera edentula* Khulm., de deux médicaments de référence, le benznidazole et le nifurtimox sur six souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote

sur d'autres parasites que les leishmanies. Des tétralones de synthèse ont été signalées comme anti-schistosomiennes (Gan et al., 1985).

#### 5.4.6. Essais biologiques *in vitro* sur plusieurs souches d'épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Tableau N° 5.5.)

La 4-hydroxy-1-tétralone est active *in vitro* sur les six souches de *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote à la concentration de  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  et la fraction 3 à  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . C'est la première fois qu'est signalée l'activité trypanocide *in vitro* d'une tétralone. Il est probable que la nature quinoïque de ce produit est "responsable" de l'activité. L'activité anti-*Trypanosoma cruzi* des naphtoquinones a été mentionnée dans la quatrième partie.

#### 5.4.7. Essais *in vitro* sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma cruzi* (Tableau N° 5.6)

L'activité trypanocide a été évaluée sur *Trypanosoma cruzi* (Y) au stade trypomastigote dans le sang. Après 24 h de contact, aucun produit ne lyse complètement les trypomastigotes de *T. cruzi* présents dans le sang à la concentration de  $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Il se produit une inhibition de 25 % de la concentration en parasites. Ces produits ne sont pas actifs et ne peuvent en aucun cas être employés préventivement pour traiter les lots de sang stockés dans les banques de sang. En conclusion, la 4-hydroxy-1-tétralone n'est pas active sur *Trypanosoma cruzi*.

Noms des produits	Concentration initiale en parasites par ml	Concentration de parasites après 24 h de contact avec les produits à $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$
4-hydroxy-1-tétralone	$4,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$
Fraction 3	$4,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$
Violet de gentiane	$1 \times 10^7$	0

Tableau N° 5.6.

Activité *in vitro* sur *Trypanosoma cruzi* (Y) au stade trypomastigote de la 4-hydroxy-1-tétralone et de la fraction 3 isolées d'*Ampelocera edentula* Kuhlms.

# CONCLUSION



Les leishmanioses sont des maladies parasitaires qui touchent environ 12 millions de personnes dans le monde. La recherche de molécules naturelles actives sur cette pathologie implique plusieurs disciplines scientifiques, l'ethnopharmacologie, la botanique, la parasitologie, la chimie et la pharmacologie.

Le but de notre travail était d'isoler des principes actifs à partir de plantes et d'évaluer leur activité biologique sur les leishmanies et les trypanosomes.

Le choix de ce sujet était délicat d'autant qu'une difficulté nous est apparue très rapidement, le manque de protocoles biologiques expérimentaux standardisés pour évaluer l'activité d'un produit sur les espèces de leishmanies aux différents stades évolutifs du parasite. Il a fallu faire des choix en fonction non seulement des données de la littérature mais aussi en fonction des moyens techniques et humains à La Paz dans le cadre de l'IBBA.

Sur le plan ethnopharmacologique, nous nous sommes rendus compte que les choix des groupes ethniques et des informateurs sont primordiaux si l'on veut avoir une chance d'aboutir à des résultats significatifs. Pendant plusieurs années, aucune des plantes employées en médecine traditionnelle par les colons des Yungas et de l'Alto-Beni n'a confirmé scientifiquement une activité leishmanicide ni sur *Leishmania* ssp au stade promastigote, ni sur *Trypanosoma cruzi* au stade épimastigote.

Pourquoi ? Il paraît certain que l'arrivée récente des colons d'origine Aymara ou Kechua, dans un milieu écologique différent de celui de l'Altiplano, ne leur a pas permis de s'intégrer complètement au milieu tropical. Ces colons sont avant tout des paysans qui se méfient et craignent leur nouvel environnement souvent inhospitalier. Pendant quatre ans, la seule information crédible a été la plante "Sébastien" (*Oxalis* sp.), utilisée par les colons de l'Alto-Beni. Au total, plus de 250 plantes et plus de mille extraits ont été testés sur *Leishmania* ssp. et *Trypanosoma cruzi*.

Par contre, nous avons pu être mis en contact avec un groupe ethnique originaire des forêts tropicales humides des derniers contre-forts andins, les Chimanes et, surtout, nous avons eu des informateurs qui nous ont indiqué les quelques plantes employées pour traiter les lésions provoquées par la leishmaniose tégumentaire.

Trois plantes, d'ailleurs indiquées par les Chimanes, ont ainsi été sélectionnées, *Galipea longiflora* Kr. (Rutaceae), *Pera benensis* (Euphorbiaceae) et *Ampelocera edentula* Kuhl. (Ulmaceae).

De *Galipea longiflora*, treize alcaloïdes ont été isolés, tous de type quinoléine substituée position en 2. Quatre nouveaux; nous les avons appelés en hommage à nos informateurs, Chimaniques A, B, C et D. Sur les douze alcaloïdes testés sur des souris Balb/c infectées soit par *Leishmania amazonensis* (H-142 ou PH 8) ou soit par *L. venezuelensis*, la 2-*n*-propylquinoléine et les chimaniques B et D se révèlent autant ou plus actives que le médicament de référence, le Glucantime<sup>R</sup>. Trois autres quinoléines sont un peu moins actives que ce dernier.

Ces résultats intéressants ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (Fournet et al., 1991).

De la deuxième plante, *Pera benensis*, trois naphthoquinones ont été isolées dont une seule est réellement efficace, la plumbagone. Ce composé confirme son activité sur tous les modèles *in vivo* mais présente l'inconvénient d'être toxique. Les deux autres, des dimères de la plumbagone, sont moins toxiques mais moins efficaces que la plumbagone.

A partir de la troisième plante, *Ampelocera edentula*, un seul produit a été identifié, la 4-hydroxy-1-tétralone. Ce produit se révèle très actif lorsqu'il est appliqué à l'endroit de l'infection parasitaire et aussi à un degré moindre par administration par voie générale.

L'ensemble de ces résultats est intéressant, trois plantes utilisées traditionnellement par les Chimanes sont réellement efficaces pour traiter les leishmanioses cutanées. On peut noter que ces trois plantes chimaniques leishmanicides sont assez rares.

Ce travail prouve qu'il existe bien dans la nature des plantes actives sur les leishmanioses cutanées. Néanmoins, il reste que l'activité leishmanicide des produits isolés doit être vérifiée sur les leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde et qu'une activité uniquement sur les leishmanioses cutanée n'est pas suffisante.

Il est nécessaire de tester l'ensemble des principes actifs isolés au cours de cette étude sur la leishmaniose viscérale (*Leishmania donovani* et *L. infantum*) qui présente dans certains pays comme le Brésil, les pays méditerranéens et certains pays d'Asie (Inde et Pakistan) un réel problème de santé publique. Cette maladie provoque la mort du malade s'il n'est pas traité à temps. En effet la leishmaniose viscérale est en nette recrudescence dans les zones d'endémies à

cause de la résistance du parasite aux traitements classiques par les antimoniés pentavalents.

Un autre facteur important est venu s'ajouter récemment; la leishmaniose viscérale vient d'être incluse dans les maladies opportunistes chez les malades touchés par le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). De nombreuses communications scientifiques attestent de ce phénomène récent (Flegg et Brettle, 1990; Gradoni et al., 1990; Peters et al., 1990; Velez, 1991).

Au le plan de l'étude chimique, la synthèse des quinoléines de structure assez simple doit être entreprise afin de les tester sur le modèle, "infection des souris Balb/c par *L. donovani*". La synthèse des produits a également pour avantage de préserver la flore tropicale déjà trop dégradée par le défrichement et l'exploitation irrationnelle de la forêt.

En ce qui concerne les essais biologiques sur la maladie de Chagas, ils n'ont pas donné les résultats espérés, sauf pour la plumbagone. *Trypanosoma cruzi*, quoique très proche génétiquement de *Leishmania*, est plus complexe et l'approche pharmacologique nécessite une grande expérience de la manipulation du parasite.

L'évaluation de l'activité biologique des principes actifs décrits dans ce travail doit être étendue à d'autres pathologies voisines, telles que la trypanosomiase humaine africaine, le paludisme, *Pneumocystis carinii*, car les produits anti-protozoaires font partie des médicaments testés en priorité sur cette parasitose (Walzer et al., 1991), et pourquoi pas le SIDA.

En conclusion, cette modeste contribution à la recherche des produits d'origine naturelle efficaces pour traiter les leishmanioses cutanées servira en priorité les populations affectées par cette maladie. En espérant que cette étude permettra de mettre au point des traitements plus efficaces, plus accessibles et moins toxiques que ceux qui existent actuellement sur le marché.

## BIBLIOGRAPHIE

- AHOND A. PICOT F., POTIER P., POUPAT C. et SEVENET T., 1978. Alcaloïdes de *Melicope leratii*. *Phytochemistry*, **17**, 166-167.
- ALTHAUS I.W., REUSSER F., TARPLEY W.G. et SKALETZKY L.L., 1990. Preparation of phenanthrolinecarboxylates esters, 4-aminoquinoline and isoquinoline derivatives as inhibitors of HIV reverse transcriptase. *PCT. Int. Appl. WO 90, 05, 523*. C.A. 113-212013 h
- ALVES J.M. et RABINOVICH M., 1983. Destruction of intracellular *Trypanosoma cruzi* after treatment of infected macrophage with cationic electron carriers. *Infec. Immunity*, **19**, 435-439.
- ANDRADE S.G., SILVA R.C. et SANTIAGO C.M.G., 1989. Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole. *Bull. WHO*, **67**, 504-514.
- ANGELO BARRIOS A.P., 1987. Selección *in vitro* de la quimioterapia experimental en la tripanosomiasis americana. *Tesis de Licenciatura en Farmacia y Bioquímica, Universidad La Paz*.
- AUBLET M.F., 1775. *Plantes de Guiane Française*, **2**, 269.
- AVILA J.L. et AVILA A., 1981. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp. Parasitol.*, **51**, 204-208.
- AVILA J.L., POLEGRE M.A., AVILA A. et ROBINS R.K., 1986. Action of pyrazolopyrimidine derivatives on american *Leishmania* ssp. promastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83C**, 285-289.
- AVILA J.L., ROJAS T., MONZON H. et CONVIT J., 1990. Sinefungin as treatment for american *Leishmania* in sensitive Balb/c and resistant C5BL/6 mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**, 139-145.
- BACHRACH U., SCHNUR L.F., EL-ON J., GREENBLATT C.L., PEARLMAN E., ROBERT-GERO M. et LEDERER E., 1980. Inhibitory activity of sinefungin and SIBA (5' deoxy-5'-S-isobutylthioadenosine) on the growth of promastigotes and amastigotes of different species of *Leishmania*. *FEBS Letters*, **121**, 287-291.
- BADARO R., FALCOFF E., BADARO F.S., CARVALHO E.M., PEDRAL- SAMPAIO D., BARRAL A., CARVALHO J.S., BARRAL-NETTO M., BRANDELY M., SILVA L., BINA J.C., TEIXERA R., FALCOFF R., ROCHA H., HO J.L. et JOHNSON D. Jr., 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N. Engl. J. Med.*, **322**, 16-20.
- BEACH D.H., GOAD L.J. et HOLZ J.J. Jr., 1988. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **31**, 149-162.
- BEHFOROUCZ N.C. et WENGER C.D., 1989. Immunomodulation of murine leishmaniasis with cyclosporine A. *Ad. Exp. Med. Biol.*, **239**, 379-384.
- BELEHU A. et NAAFS B., 1981. Diabetes mellitus associated with pentamidine mesylate (letter). *Lancet*, 1463-1464.
- BELL C.A., HALL J.E., KYLE D.E., GROGL M., OHEMENG K.A., ALLEN M.A. et TIDWELL R.R., 1990. Structure relationship of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1381- 1383.
- BERENS R.L., MARR J.J., LOOKER D.L., NELSON D.J. et LA FON S.W., 1984. Efficacy of pyrazolopyrimidine ribonucleosides against *Trypanosoma cruzi*: studies *in vitro* and *in vivo* with sensitive and resistant strains. *J. Infect. Dis.*, **150**, 602-608.

- BERENS R.L., MARR J.J., NELSON D.J. et LAFON S.W., 1980. Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol riboside on intracellular forms of *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2397-2398.
- BERMAN J.D., 1981. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 566-569.
- BERMAN J.D., 1984. *Leishmania tropica*: quantitation of *in vitro* activity of antileishmanial agents by Giemsa staining viability and 3H-formycin B incorporation. *J. Parasitol.*, **70**, 561-562.
- BERMAN J.D., 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Infec. Dis.*, **10**, 560-586.
- BERMAN J.D., HOLZ G.G. et BEACH D.H., 1984. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **12**, 1-13.
- BERMAN J.D., KEENAN C.M., LAMB S.R., HANSON W.L. et WAITS V.B., 1983. *Leishmania donovani*: oral efficacy and toxicity of Formycin B in the infected hamster. *Exp. Parasitol.*, **56**, 215-221.
- BERMAN J.D. et LEE L.S., 1984. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *J. Parasitol.*, **70**, 220-225.
- BERMAN J.D. et WYLER D.J., 1980. An *In vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J. Infec. Dis.*, **142**, 83-86.
- BEVERIDGE E., CALDWELL I.C., LATTER V.S., NEAL R.A., UDALL V. et WALDRON M.M., 1980. The activity against *Trypanosoma cruzi* and cutaneous leishmaniasis and toxicity of moxipraquine (349C59). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 43-51.
- BJORVATN B.B. et NEVATH F.A., 1979. Experimental therapy of mice infected with *Leishmania tropica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**, 480-485.
- BLANCHARD P., DODIC N., FOURREY J.L., GEZE M., LAWRENCE F., MALINA H., PAOLANTANOCCHI P., VEDEL M., TEMPETE C., ROBERT-GERO M. et LEDERER E., 1986. Biological methylation and drug design. Sinefungin and derivatives: synthesis, biosynthesis and molecular target studies in *Leishmania*. Ed. R. T. Borchardt, C. R. Creveling, and P. Magne Ueland, *The Humana Press*.
- BOHLMANN F. et GRENZ M., 1979. Ein neues germacranolid aus *Munnozia maronii*. *Phytochemistry*, **18**, 334-335.
- BOLLAG J.M., CZAPLICKI E.J., et MINARD R.D., 1975. Bacterial metabolism of 1-naphthol. *J. Agr. Food Chem.*, **23**, 85-90.
- BONFANTE-GARRIDO R., 1983. New observations on *Leishmania mexicana venezuelensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**, 740.
- BONFANTE-GARRIDO R., BARROETA S., MEJIA DE ALEJOS M.A., MELENDEZ E., ARREDONDO C., URDANETA R. et URDANETA I., 1987. Urban cutaneous leishmaniasis in Barquesimeto, Venezuela. *Bull. Pan. Am. Health Organ.*, **21**, 149-155.
- BORELLI D., 1987. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev. Infec. Dis.*, **9** (Suppl.), S57-63.
- BOVERIS A. et STOPPANI A.O.M., 1978. Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. (C)*, **61**, 327-329.

- BRENER Z., 1960. Estudos terapêuticos em corbaías experimentalmente inoculadas com *Leishmania enriettii*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **2**, 71-77.
- BRENER Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **4**, 389-396.
- BRENER Z., 1982. Progrès récents dans le domaine de la maladie de Chagas. *Bull. WHO*, **60**, 845-856.
- CAILLARD T., TIBAYRENC M., LE PONT F., DUJARDIN J.P., DESJEUX P. et AYALA F.J., 1986. Diagnosis by isozyme methods of two critic species, *Psydopygus carrerai* and *P. yucumensis* (Diptera Psydochodidae). *J. Med. Entomol.*, **23**, 489-492.
- CALLAHAN H.K., CROUCH R.K. et JAMES E.R., 1988. Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidant. *Parasitol. Today*, **4**, 218-225.
- CARSON D.A. et CHANG K.P., 1981. Phosphorylation and antileishmanial activity of formycin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1377-1383.
- CARTER K.C., ALEXANDER J. et BAILLIE A.J., 1989. Studies on the topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis: the therapeutic effect of methyl benzethonium chloride and the aminoglycosides, gentamicin and paromomycin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **83**, 233-239.
- CARTER K.C., BAILLIE A.J., ALEXANDER J. et DOLAN T.F., 1988. The therapeutic effect of sodium stigliconate in Balb/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 370-373.
- CARVALHO L.H., ROCHA E.M.M., RASLAN D.S., OLIVEIRA A.B. et KRETTLI A.U., 1988. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *P. falciparum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **21**, 485-487.
- CAVA M.P., BUCK K.T. et DA ROCHA A.I., 1972. Azofluoranthenes alkaloids. A new structural type. *J. Chem. Soc.*, 5931.
- CAVIN J.C., KRASSNER S.M. et RODRIGUEZ E., 1987. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.*, **19**, 89-94.
- CERNIGLIA C.E. et CROW S.A., 1981. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts. *Arch. Microbiol.*, **129**, 9-13.
- CERNIGLIA C.E., FREEMAN J.P. et MITCHUM R.K., 1982. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1070-1075.
- CERNIGLIA C.E. et GIBSON D.T., 1977. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 363-370.
- CERNIGLIA C.E., VAN BAALEN C. et GIBSON D.T., 1980. Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 485-494.
- CHAGAS C., 1909. Nova entidade morbida. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1**, 159-218.
- CHAPMAN W.L. Jr., HANSON W.L., WAITS V.B. et KINNAMON K.E., 1978. Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with *Leishmania donovani*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **21**, 189-193.

- CHEN F.C., LIN Y.M. et CHEN A.H., 1972. Sesquiterpenes from heartwood of Chinese elm. *Phytochemistry*, **11**, 1190-1191.
- CHUNG C.N., GACHIHI, R., MUIGAI K., WASUNA R., RACHID J.R., CHULAY J.D., ANABWANI G., OSTER C.N. et BRYCESON A.D.M., 1985. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. III. Successful treatment using a combination of sodium stibogluconate plus allopurinol. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 715-718.
- COLEMAN R.E., EDMAN J.D. et SEMPREVIVO L.H., 1988. Effect of cimetidine and 2'-deoxyguanosine on the development of *Leishmania mexicana* in Balb/c mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 232-233.
- COLEMAN R.E., EDMAN J.D. et SEMPREVIVO L.H., 1989. The effect of pentostam and cimetidine on the development of leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*) and concomitant malaria (*Plasmodium yoelii*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **83**, 339-334.
- COLL J.C. et BOWDEN B.F., 1986. The application of vacuum liquid chromatography on the separation of terpenes mixtures. *J. Nat. Prod.*, **49**, 934-936.
- CONVIT J., CASTELLANOS P.L., RONDON A., PINARDI M.E., ULRICH M., CASTES M., BLOOM B. et GARCIA L., 1987. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 401-404.
- CROFT S.L., 1988. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 376-381.
- CROFT S.L., EVANS A.T. et NEAL R.A., 1985. The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **79**, 651-653.
- CROFT S.L. et R.A. NEAL, 1985. The effect of allopurinol ribonucleoside and formycin B on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 517-518.
- CROFT S.L., WALKER J.J. et GUTTERIDGE W.E., 1988. Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes *in vitro*. *Trop. Med. Parasitol.*, **39**, 145-148.
- CROIZAT, 1942. Woodson and Schery-Flora of Panama. VI. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **29**, 355-357.
- CRUZ F.S., MARR J.J. et BERENS R.L., 1980. Prevention of transfusion induced Chagas' disease by amphotericin B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 761-765.
- DAS N., MAHATO S.B., NASKAR K., GHOSH D.K. et BASU M.K., 1990. Targeting of urea stibamine encapsulated in liposomes to reticuloendothelial system for the treatment of experimental leishmaniasis. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **43**, 133-139.
- DATRY A., SIMILOWSKI T., JAIS P., ROSEMHEIM M., KATLAMA C., MAHEU E., KAZAZ S., FASSIN D., DANIS M. et GENTILINI M., 1990. AIDS-associated leishmaniasis: an unusual gastro-duodenal presentation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **84**, 239-240.
- DAVIDSON R.N., CROFT S.L., SCOTT A., MAINI A.H. et MOODY A.D.M., 1991. Liposomal amphotericin B in drug. Resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, **337**, 8749.
- DEANE L.M. et DEANE M.P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographic distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**, 198-212.
- DEDET J.P., JAMET P., ESTERRE P., GHIPPONI P.M., GENIN C et LALANDE G., 1980. Failure to cure *Leishmania braziliensis guyanensis* cutaneous leishmaniasis with oral ketoconazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**, 176.

- DEI CAS E., SOULEZ B., PALLUAUT F., CHARET P. et CAMUS P., 1990. *Pneumocystis carinii* un défi pour le biologiste. *M/S*, 6, 517-525.
- DENNIS M.V., JUDY M.M., MATTHEWS J.L. et SOGANDARES-BERNAL F., 1989. Protection of NIF 3T3 cells from infection by trypomastigotes and sphearomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, Tulahuen strain, by porphyrins in the presence and absence of light (630 and 690 nm). *J. Parasitol.*, 75, 970-976.
- DESJEUX P., LE PONT F., MOLLINEDO S. et TIBAYRENC M., 1986a. Les *Leishmania* de Bolivie. 1. *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911 dans les Départements de La Paz et du Beni. Premiers isolements de souches d'origine humaine. Caractérisation enzymatique. (*Coll. Int. CNRS/INSERM*, 1984), IMEE, Montpellier, 401-410.
- DESJEUX P., LE PONT F., MOLLINEDO S. et TIBAYRENC M., 1986b. Les *Leishmania* de Bolivie. 2. *Leishmania chagasi* Cuhna et Chagas, 1937, premiers isolements dans les Yungas. (*Coll. Int. CNRS/INSERM*, 1984), IMEE, Montpellier, 411-419.
- DETARLOVSKY M.N.S., GOIJMAN S.G., PORTELA M.P.M et STOPPANI A.O.M., 1990. Effects of isozolyl-naphtoquinoneimines on growth and oxygen radical production in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Experientia*, 46, 502-505.
- DE VOS L., JOSENS G., VRAY N. et CARLIER Y., 1989. Fascicules iconographiques de biologie: la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine. *Ed. Université Libre de Bruxelles - IBBA*, 6pp.
- DOCAMPO R., DE SOUZA W., CRUZ F.S., FOITMAN I., COVER B. et GUTTERIDGE W.E., 1978. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Z. Parasitenkd.*, 57, 189-198.
- DOCAMPO R. et MORENO S.N.J., 1984. In *Free Radicals in Biology*, W.A., VI, 243-288, London Academic Press.
- DODD R.H., OUANNES C., ROBERT-GERO M. et POTIER P., 1989. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-b-carbolines. *J. Med. Chem.*, 32, 1272-1276.
- DOYLE P.S. et WEINBACH E.C., 1989. The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 68, 230-234.
- DRILLAUD E., 1987. Traitement de la leishmaniose tégumentaire par la pentamidine (Lomidine) en Guyane Française. *Thèse de Doctorat en Médecine, Université de Bordeaux II*.
- ELIAS T.E., 1970. Notes on the genus *Galipea* (Rutaceae) in Central America. *J. Arnold Arbor.*, 51, 427-430.
- EL-ON J., JACOB G.P. et WEINBAUCH L., 1988. Topical chemotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today*, 4, 76-81.
- ENGLER A., 1896. Rutaceae, Die natürlichen Pflanzenfamilien. *Engler et K. Prantl., editors*, 3, 95-201.
- ERCOLI N. et COELHO M.V., 1967. Problems of drug evaluation in cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 61, 488- 499.
- FARGHALY A.M., HABIB N.S., KHALIL M.A. et EL-SAYED O.A., 1990. Synthesis of novel 2-substituted quinoline derivatives: antimicrobial, inotropic, and chronotropic activities. *Arch. Pharm (Weinheim)*, 323, 247-251.



- FLEGG P.J. et BRETTE R.P., 1990. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *AIDS*, **4**, 366-367.
- FOURNET A., ANGELO BARRIOS A., MUÑOZ V., HOCQUEMILLER R., ROBLLOT F., BRUNETON J. et RICHOMME P., 1991. Quinoléines 2-substituées pour le traitement des leishmanioses. *Brevet Français*, N° 91 121 74, déposé le 3/10.1991.
- FOURNET A., HOCQUEMILLER R., ROBLLOT F., CAVÉ A., RICHOMME P. et BRUNETON J., 1992a. Les chimanines, nouveaux alcaloïdes quinoléiques à propriétés leishmanicides isolées de *Galipea longiflora*. (sera envoyée à *Can. J. Chem.*)
- FOURNET A., MANJON A.M., MUÑOZ V., ANGELO A., BRUNETON J., HOCQUEMILLER R., CORTES D. et CAVÉ A., 1988a. Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques. II. Activité *in vitro* sur des épimastigotes de trois souches typifiées de *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.*, **24**, 337-343.
- FOURNET A., MUÑOZ V., ANGELO A., HOCQUEMILLER R., CORTES D., CAVÉ A. et J. BRUNETON J., 1988b. Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques. I. Activité *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *J. Ethnopharmacol.*, **24**, 327-335.
- FOURNET A., MUÑOZ V., ROBLLOT F., GANTIER J.C. et R. HOCQUEMILLER, 1992a. Leishmanicidal and trypanocidal activities of a sesquiterpene lactone isolated from a Bolivian plant, *Munnozia maronii* (Asteraceae). Résultats en cours de publication.
- FOURNET A., VAGNEUR B., RICHOMME P. et BRUNETON J., 1989. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. *Can. J. Chem.*, **67**, 2116-2118.
- FRANKE E.D., WIGNALL S., CRUZ M.E., ROSALES E., TOVAR A.A., LUCAS C.M. et LLANOS CUENTAS A., 1990. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann. Intern. Med.*, **113**, 934-940.
- FUJIMOTO Y., YOKOYAMA E., TAKAHASHI T., UZAWA J., MOROOKA N., TSUNODA H. et TATSUNO T., 1986. Studies on the metabolites of *Penicillium diversum* var. *aureum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1497-1500.
- GAN P., ZHOU D., YAO R., MA Z., XIANG L. et HUANG L., 1985. Synthesis of indanones and tetralones as new potential schistosomicidal. *Yanxue Xuebao*, **20**, 345-352.
- GENTILINI M., DUFLO B., LAGARDERE B., DANIS M. et RICHARD-LENOBLE D., 1982. Médecine Tropicale. *Flammarion, Médecine Sciences*, 125-132.
- GILMAN H., EISCH J. et TODDY T.S., 1959. The preparation and rearrangement of 2-allyl-1,2-dihydroquinoline. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4000-4003.
- GIRAULT L., 1984. Kallawaya guérisseurs itinérants des Andes. Ed. ORSTOM, **107**, 668pp., ISBN 2-7099-0732-1.
- GOIJMAN S.G. et STOPPANI A.O.M., 1985. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 273-280.
- GOIJMAN S.G., TURENS J.F., MARINI-BETTOLO G.B. et STOPPANI A.O.M., 1985. Effect of tingenone, quinonoid triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, **41**, 646-648.

- GONCALVES A.M., VASCONCELLOS M.E., DOCAMPO R., CRUZ F.S., DE SOUZA W. et LEON W., 1980. Evaluation of the toxicity of 3-allyl- $\beta$ -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1**, 167-176.
- GONCALVES DE LIMA O., D'ALBUQUERQUE I.L., DE ANDRADE LIMA D. et MACIEL G.M., 1967. Antimicrobial substances of higher plants. XXVI. Identification of 5-hydroxy-2-methylnaphtoquinone in the root extract of *Pera ferruginea*. *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, **7**, 3-9.
- GOODWIN S., SMITH A.F., VELASQUEZ A.A. et HORNIG E.C., 1959. Alkaloids of *Lunasia amara* Blanco. Isolation studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6209.
- GRADONI L., GRAMICIA M. et BETTI F., 1990. Fatal visceral disease caused by a dermatropic *Leishmania* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *J. Infection*, **20**, 180-181.
- GRADONI L., IORIO M.A., GRAMICIA M. et ORSINI S., 1989. *In vivo* effect of eflornithine (DMFO) and some related compounds on *Leishmania infantum* preliminary communication. *Farmaco*, **44**, 1157-1166.
- GRIMALDI G. Jr., DAVID J.R. et McMAHON-PRATT D., 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **36**, 270-287. (Corrections parues dans *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**, 414).
- GRIMALDI G. Jr., TESH R.B. et McMAHON-PRATT D., 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **41**, 687-725.
- GUJAR G.T., 1990. Plumbagin, a naturally occurring naphtoquinones. Its pharmacological and pesticidal activity. *Fitoterapia*, **59**, 387-393.
- GUNARATH G.M.K.B., 1984. Ph. D, *Tesis, University of Peradenya* (Sri Lanka).
- GUTTERIDGE W.E., 1976. Chemotherapy of Chagas' disease: the present situation. *Trop. Dis. Bull.*, **73**, 699-705.
- GUTTERIDGE W.E., 1985. Existing chemotherapy and its limitations. *Brit. Med. Bull.*, **41**, 162-168.
- HAMMOND D.J., COVER B., HOGG J. et GUTTERIDGE W.E., 1984. A novel series of chemical structures active *in vitro* against the trypomastigotes form of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 91-95.
- HAMMOND D.J., CROFT S.L., HOGG J. et GUTTERIDGE W.E., 1986. A strategy for the prevention of the transmission of Chagas' disease during blood transfusion. *Acta Trop.*, **43**, 367-368.
- HAMMOND D.J., HOGG J.J. et GUTTERIDGE W.E., 1985. *Trypanosoma cruzi* : Possible control of parasite transmission by blood transfusion using amphilitic cationic drugs. *Exp. Parasitol.*, **60**, 32-42.
- HANSON W.L., CHAPMAN W.L. Jr et HENDRICKS L.D., 1977. Testing of drugs for antileishmanial activity in golden hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Int. J. Parasitol.*, **7**, 443-447.
- HANSON E.D., NAKABAYASHI T., ISHIBASHI M. et INOKI S., 1966. Resistance to the drug propamidine in *Leishmania donovani*. *Biken J.*, **6**, 1-7.
- HARDING R.D., 1945. Late results of treatment of sleeping sickness in Sierra Leone by antrypol, tryparsamide, pentamide and propamidine singly and in various combinations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 99-124.

- HARMS G., ZWINGENBERGER K., CHEHADE A.K., TALHARI S., RACZ P., MOUAKEH A., DOUBA M., NAKEL L., NAIFT R.D., KREMSNER P.G., FELDMIEIER H. et BIENZLE U., 1989. Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 1287-1292.
- HAYASHI Y., YASUE M. et TAKAHASHI T., 1972. Two new naphthalene derivatives from the heartwood of *Zelkova serrata*. *Mokuzai Gakkaishi*, 18, 41-42.
- HAZRA B., SAHA A.K., RAY R., ROY D.K., SUR P. et BANERJEE A., 1987. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81, 738-741.
- HERATH W.H.M.W., RAJASEKERA N.D.S., SULTAMBAWA M.U.S., WANNIGAMA G.P. et BALASUBRAMANIAM S., 1978. Triterpenoid coumarin and quinone constituents of eleven *Diospyros* species (Ebenaceae). *Phytochemistry*, 17, 1007-1009.
- HEEL R.C., 1982. *In vivo* and *in vitro* activity. In *Ketoconazole in the Management of Fungal Disease*, ed. Levine, H.B. Revised 1st. Ed., 57-66. Australia: Adi Press.
- HERNANDEZ A., MISLE A., URDATENA J. et DAGGER F., 1987. The effect of tunicamycin on *Leishmania braziliensis*. Glycosylation and cell surface component. *Mol. Biol. Rep.*, 12, 103-110.
- HERRER A., CHRISTENSEN H.A. et BEUMER R.J., 1973. Reservoirs hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 585-591.
- HOARE C.A. et WALLACE F.G., 1986. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212, 1385-1386.
- HOCQUEMILLER R., CORTES D., ARANGO G.J., MYINT S.H., CAVÉ A., ANGELO A., MUÑOZ V. et FOURNET A., 1991. Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *J. Nat. Prod.*, 54, 445-452.
- HOCKERTZ S., FRANCKE G., PAULINI I et LOHMANNMATTES M.L, 1991. Immunotherapy of murine visceral leishmaniasis with murine recombinant interferon-gamma and MTP-PE encapsulated liposomes. *J. Interferon Res.*, 11, 177.
- HUDSON A.T., RANDALL A.W., FRY M., GINGER C.D., HILL B., LATTER V.S., McHARDY N et WILLIAMS R.B., 1985. Novel antimalarial hydronaphthoquinones with potent broad spectrum antiprotozoal activity. *Parasitology*, 90, 45-55.
- INOUE K., UEDA S., SHIOBARA Y. et INOUE H., 1977. Quinones and related compounds in higher plants. Part 6. 2-carboxy-4-hydroxy-alpha-tetralone, a precursor for catalponol. *Phytochemistry*, 26, 1689-1694.
- INOUE K., UEDA S., SHIOBARA Y. et INOUE H., 1981. Quinones and related compounds in higher plants. Part 11. Role of 2-carboxy-2,3-dihydro-1,4-naphthoquinone and 2-carboxy-2-(3-methyl-but-2-enyl)-2,3-dihydro-1,4-naphthoquinone in the biosynthesis of naphthoquinones congeners of *Catalpa ovata* callus tissues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1246-1258.
- ISHIKURA M., ODA I. et TERASHIMA M., 1985. A simple and regioselective preparation of 2- or 3-substituted quinoline derivatives via diacylquinolylboranes. *Heterocycles*, 23, 2375-2386.
- IVADY V.G. et PALDY L., 1958. Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie Frühgeborener mit funfwertigen Stibium and aromatischen Diamidinen. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 106, 10-14.
- JACKMAN L.M. et STERNHELL S., 1969. *Application of Nuclear Magnetic Resonance in Organic Chemistry*. Pergamon Press, Elmsford, N.Y..

- JIMENEZ de G. et ERCOLI N., 1965. Effect of drugs on various *Leishmania* isolates and succinic dehydrogenase inhibition. *Exp. Parasitol.*, **17**, 302-308.
- JOLLIFFE D.S., 1986. Cutaneous leishmaniasis from Belize: treatment with ketoconazole. *Clin. Exp. Dermatol.*, **11**, 62-68.
- JONES S.K., HALL J.E., ALLEN M.A., MORRISON S.D., OHEMENG K.A., REDDY V.V., GERATZ J.D. et TIDWELL R.R., 1990. Novel pentamidine analogs in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1026-1030.
- KATSUMI N. et AKINOKI K., 1990. Preparation of 2-hydroxy-3-dodecyl-1,4 naphthoquinones derivatives and nematocides containing them. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 02,152,943.
- KHATEEB G.H. et MOLAN A.L., 1977. Efficacy of some drugs on *Leishmania donovani* in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Chemotherapy*, **27**, 117-125.
- KILLICK-KENDRICK R., MOLYNEUX D.H., RIOUX J.A. et LEANEY A.J., 1980. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann., Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 563-565.
- KINNAMON K.E., STECK E.A., LOIZEAUX P.S., HANSON W.L., CHAPMAN W.L. Jr. et WAITS V.B., 1978. The antileishmanial activity of lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**, 751-757.
- KIRK R. et SATI M.H., 1940. The use of certain aromatic diamidines in the treatment of kala-azar. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **34**, 181-197.
- KLOTZSCH J.F., 1847. Beiträge zu einer Flora der Aequinoctial-Gegenden der neuen Welt. *Linnaea*, **20**, 337-542.
- KRANE B.D, FAGBULE M.O., SHAMMA M. et GOZLER B., 1984. The benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.*, **47**, 1-43.
- KRAUSE K., 1914. Sowie der botanischen für die deutschen kolonien. *Notizbl. K. Bot. Gart. Berlin*, **6**, 143.
- KREIER J.P., 1977. *Parasitic protozoa, I. Taxonomy, Kinetoplastids and Flagellates of fish*. Academic Press, Inc., 57-133.
- KUHLMANN J.G., 1940. Espécies novas equatorais e tropicais-orientais brasileiras. *Ann. Prim. Rev. Sul. Amer. Bot.*, **3**, 75-92.
- KUMAR V., KUMUDINI M.M. et SINNATHAMBY B., 1985. Quinonoids and other constituents of *Aristea ecklonii*. *Phytochemistry*, **24**, 1118-1119.
- LAINSON R et SHAW J.J., 1979. The role of animals in the epidemiology of the South American leishmaniasis. Lunsden WH, Evans, eds, *Biology of the Kinetoplastida*, **2**, London Academic Press, 1-116.
- LAINSON R. et SHAW J.J., 1987. Evolution classification and geographical distribution. Peters W., Killicks-Kendrick R., eds. *The leishmaniasis in biology and medicine*, **1**, London Academic Press, 1-128.
- LAMY L., WONDE T. et LAMY H., 1966. Activité de l'amphotéricine B sur *Leishmania donovani* en multiplication dans des macrophages de souris entretenus *in vitro*. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **59**, 964-968.
- LEON W., GONCALVES A.M., VASCONCELOS M.E., DO CAMPO R., CRUZ F.S. et V. SOUZA V., 1980. Evaluation of the toxicity of 3-allyl- $\beta$ -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1**, 167-176.

LE PONT F. et DESJEUX P., 1986. Leishmaniasis in Bolivia. II. The involvement of *Psychodopygus yucumensis* and *Psychodopygus llanosmaretinisi* in the selvatic transmission cycle of *Leishmania braziliensis braziliensis* in a lowland subandean region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**, 79-85.

LE THI NGOC L. et OURISSON G., 1983. Cadalenequinone and dihydrocadalenequinone. Isolation from a Zingiberaceae and synthesis. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 111-112.

LOPES J.N., CRUZ P.S., DOCAMPO R., VASCONCELOS M.E., PINTO M.C.F.R., GILBERT B. et PINTO A.V., 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluations of the toxicity of 1,4-naphtoquinone and 1,2-naphtoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **72**, 1-9.

LOPES J.N., CRUZ F.S., DOCAMPO R., VASCONCELLOS M.E., SAMPAIO M.C.R., PINTO A.V. et GILBERT B., 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphtoquinone and 1,2-naphtoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **72**, 523-531.

LORTHARY O., MECHALI D., CHRISTIAENS D., GOUGEROT POCIDALO M., BRANDELY M. et BABINET P., 1990. Interferon-gamma associated with conventional therapy for recurrent visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Rev. Infec. Dis.*, **12**, 370.

LOURIE E.M. et YORKE W., 1939. Studies in chemotherapy. XXI. The trypanocidal action of certain aromatic diamidines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **33**, 289-304.

MACCIO I., 1946. Estudio fitoquímico de la "*Bocconia pearcei*" Hutch.. *Archiv. Farm. Bioquím. Tucuman*, **3**, 27-30.

MARR J.J. et BERENS R.L., 1977. Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in *Leishmania* species to the action of allopurinol. *J. Infec. Dis.*, **136**, 724-731.

MARSTON A., MSONTHI J.D. et HOSTETTMANN K., 1984. Naphtoquinones of *Diospyros usambarensis*; their molluscidal and fungicidal activities. *Planta Medica*, 279-280.

MARTINEZ S., LOOKER D.L. et MARR J.J., 1988. A tissue culture system for the growth of several species of *Leishmania* : growth kinetics and drug sensitivities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**, 304-307.

MATTOCK N.M. et PETERS W., 1975. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **69**, 359-371.

MAYRINK W., GENARO O., DIAS M., DA COSTA C.A., MICHALICK M.S.M., MELO M.M., WILLIAMS P., DA COSTA R.T., NASCIMENTO E. et OLIVEIRA LIMA A., 1989. Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **31**, 67-69.

Mc CABE R.E., 1988. Primaquine is lethal for intracellular but not extracellular *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, **74**, 748-753.

Mc CABE R.E., REMINGTON J.S. et ARAUJO F.G., 1984. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. *J. Infec. Dis.*, **150**, 594-601.

Mc CABE R.E., REMINGTON J.S. et ARAUJO F.G., 1985a. *In vivo* and *in vitro* effects of cyclosporin A on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**, 861-865.

Mc CABE R.E., REMINGTON J.S. et ARAUJO F.G., 1985b. *In vitro* and *in vivo* activities of formycin B against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 491-494.

Mc CABE R.E., REMINGTON J.S. et ARAUJO F.G., 1986. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 280-284.

Mc CABE R.E., REMINGTON J.S. et ARAUJO F.G., 1987. Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**, 613-615.

McMILLAN B., 1960. The inhibition of leptomonads of the genus *Leishmania* in culture by antifungal antibiotics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **54**, 293-299.

MANSKE R.H.F., 1953. The alkaloids of Papaveraceous plants. I. *Dicranostigma lactuoides* Hook. et Thoms and *Bocconia pearcei* Hutchinson. *Can. J. Chem.*, **32**, 83-85.

MESTER I., 1973. The occurrence of the alkaloids in Rutaceae. *Fitoterapia*, **44**, 123-152.

MIETH H., 1966. Untersuchungen mit Berenil an experimentell mit *Leishmania donovani* infizierten Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*). *Z. Tropenmed. Parasitol.*, **17**, 320-327.

MISSONI E., 1984. Heat treatment of cutaneous leishmaniasis. *Trop. Doctor*, **46**.

MONCADA C., REPETTO Y., ALDUNATE J., LETELIER M.E. et MORELLO A., 1989. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 87-91.

MODABBER F., 1990. Development of vaccines against leishmaniasis. *Scand. J. Infec. Dis.*, **S 76**, 72-78.

MONK J.P. et BENFIELD P., 1990. Inhaled pentamidine. An overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Drugs*, **39**, 741-756.

MORAES M.P.L et ROQUE N.F., 1988. Diterpenes from the fruits of *Xylopiya aromatica*. *Phytochemistry*, **27**, 3205-3208.

MORELLO A., 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **C, 90**, 1-12.

MORTATTI R.C. et HENRIQUES A., 1990. Experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania amazonensis* course of fast-growth infection in the mouse ear. *Parasitol. Res.*, **76**, 729-730.

MUKHERJEE T., ROY K. et BHADURY A., 1990. Acivicin: a highly active potential chemotherapeutic agent against visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 426-432.

MUÑOZ ORTIZ V., 1987. Obtención de la fracción activa y estudio de la actividad leishmanicida *in vitro* sobre promastigotes de la especie vegetal *Munnozia maronii*. *Tesis de Licenciatura en Farmacia y Bioquímica, Universidad La Paz*.

MUNSHI C.P., VAIDYA P.M., BURANPURI J.J. et GULATI O.D., 1972. Kala-azar in Gurajat. *J. Indian Med. Ass.*, **59**, 287-293.

MUSSER J.H., KUBRAK D.M., KREFT III A.F. et BENDER R.H.W., 1990. Preparation of 2-(phenoxyethyl) quinolines and analogs as anti-allergic and anti-inflammatory agents. *U.S. Patent*, 4,904,786. C.A. 113. 78185 k

NAHRSTEDT A., 1980. Absence of cyanogenesis from Droseraceae. *Phytochemistry*, **19**, 2757-2758.

NARAIN L. et DHUTTA G.P., 1978. Cultivation and *in vitro* chemotherapeutic studies on *Leishmania donovani*. *Indian J. Parasitol.*, **2**, 83-86.

- NASCIMENTO E., MAYRINK W., DA COSTA C.A., MICHALIK M.S.M., MELO M.N., BARROS G.C., DIAS M., ANTUNES C.M.F., LIMA M.S., TABOADA D.C. et LIU T.Y., 1990. Vaccination of human against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. *Infect. Immunity*, **58**, 2198-2203.
- NEAL R.A., 1964. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: *Leishmania tropica* infections in mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **58**, 420-430.
- NEAL R.A., 1968. The effect of antibiotics of the neomycin group in experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.*, **62**, 54-62.
- NEAL R.A., 1976. Effect of sodium stibogluconate and pyrimethamine on mouse infections with *Leishmania mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **70**, 250.
- NEAL R.A., 1987. *The Leishmaniases: Experimental chemotherapy*, Academic Press Inc., II, 794-844, ISBN-0-12-55102-2.
- NEAL R.A. et MATTHEWS P.J., 1982. *In vitro* antileishmanial properties of pentavalent antimonial compounds. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **76**, 284.
- NEAL R.A. et MILES R.A., 1977. Effect of sodium stibogluconate on infections of *Leishmania enrietti*, with observations on the interaction of drug and immune response. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **71**, 21-27.
- NEAL R.A. et VAN BUEREN J., 1988. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 709-714.
- NELSON D.J., LAFON S.W., TUTTLE, J.V., MILLER W.H., MILLER R.L., KRENITSKY T. et ELION G.B., 1979. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent: biological effects, metabolism and enzymatic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11544-11549.
- NEVA F.A., PETERSEN E.A., CORSEY R., BOGAERT H. et MARTINEZ D., 1984. Observations on local heat treatment for cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**, 800-804.
- NUSSENZWEIG V., BIANCALANA A., AMATO-NETO V., SONNTAG R., FREITAS J.L.P. et KLOETZE J., 1953. Ação da violeta de gentiana sobre o *T. cruzi in vitro*: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Rev. Paul. Med.*, **43**, 57-58.
- OECHSLIN S.M., KÖNIG G.M., OECHSLIN-MERKEL A.D., WRIGHT A.D., KINGHORN A.D. et STICHER O., 1991. An NMR study of four benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.*, **54**, 519-524.
- OGER J.M., DUVAL O., RICHOMME P., BRUNETON J., GUINAUDEAU H. et FOURNET A., 1991. (+)-Noranicanine a new type of trioxygenated benzylisoquinoline. Isolation and synthesis, *Heterocycles* (soumis à publication).
- OMS, 1982. The leishmaniases. *Rapport of the WHO Expert Committee*, 9-129.
- OPPERDOES F.R., 1985. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. *Brit. Med. Bull.*, **41**, 130-136.
- PAOLANTONACCI P., LAWRENCE F. et ROBERT-GERO M., 1985. Differential effect of sinesfungin and its analogs on the multiplication of three *Leishmania* species. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **28**, 528-531.
- PELLETIER S.W., CHOKSHI H.P. et DESAI H.K., 1986. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using liquid chromatography. *J. Nat. Prod.*, **49**, 892-900.

- PEREIRA BARETTO O.C.O., AMATO NETO V., CASTILHO E.A., MOREIRA A.A.B., NONOYAMA K., KANAKA K., SWASTANI E., PINTO P.L.S., OKUMURA Y. et CAMPOS R., 1983. Efeito da anfotericina B sobre a viabilidade eritrocitaria. Perspectivas do seu uso na prevençao da doenca de Chagas induzida pela transfusao de sangue. *Rev. Paul. Med.*, **101**, 212-216.
- PETERS B., FISH D., GOLDEN R., EVANS D.A., BRYCESON A.D.M. et PINCHING A.J., 1990. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Quart. J. Med.*, **77**, 1101-1131.
- PETERS W. et KILLICK-KENDRICK R., 1987. *The leishmaniasis in biology and medicine. Vol. I. Biology and epidemiology. Vol. II. Clinical aspects and control.* London (UK) Academic Press, I, 1-550, II, 551-941.
- PETERS W., LAINSON R., SHAW J.J., ROBINSON B.L. et FRANCA LEÃO A., 1981. Potentiating action of rifampicin and isoniazid against *Leishmania mexicana amazonensis*. *Lancet*, 1122-1124.
- PETERS W., TROTTER E.R. et ROBINSON B.L., 1980a. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. V. The activity of potential leishmanicides against *L. infantum* LV9' in NMRI mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 289-298.
- PETERS W., TROTTER E.R. et ROBINSON B.L., 1980b. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. VII. Drug responses of *L. major* and *L. mexicana amazonensis*, with an analysis of promising chemical leads to new leishmanial agents. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 321-335.
- PFALLER M.A. et MARR J.J., 1974. Antileishmanial effect of allopurinol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**, 469-472.
- PIALOUX G., HENNEQUIN C., DUPONT B. et RAVISSE P., 1990. Cutaneous leishmaniasis in an AIDS patient: Cure with itraconazole. *J. Infec. Dis.*, **162**, 1221-1222.
- PINTO A.V., FERREIRA V.F., CAPELLA R.S., GILBERT B., PINTO M.C.R. et DA SILVA J.S., 1987. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**, 609-610.
- PIRSON P., LECLEF B. et TROUET A., 1990. Activity of ketoconazole derivatives against *Leishmania mexicana amazonensis* within mouse peritoneal macrophages. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **84**, 133-139.
- QUEENER S.F., FUJOKA H., NISHIYAMA Y., FURUKAWA H., BARTLETT M.S. et SMITH J.W., 1991. *In vitro* activities of acridone alkaloids against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 377-379.
- PIZZI T., 1957. *Immunologia de la enfermedad de Chagas. Santiago, Universidad de Chile.*
- REATHER W et SEIDENATH H., 1984. Ketoconazole and other potent antimycotic azoles exhibit pronounced activity against *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium berghei*, and *Entamoeba histolitica* *in vivo*. *Z. Parasitenkd.*, **70**, 135-138.
- RAETHER W., SEIDENATH H. et HOFMAN J., 1989. Potent antibacterial fluoroquinolones with marked activity against *Leishmania donovani* *in vivo*. *Parasitol. Res.*, **75**, 412-413.
- RAETHER W., SEIDENATH H. et LOEWE H., 1978. Action of p-(4-aminophenoxy) benzaldehyde-p-aminido phenylhydrazone dihydrochloride on *Leishmania donovani* infections in the golden hamster. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **72**, 534-547.
- RAMESH S. et FRANCK R.W., 1989. Aureolic acid antibiotics: synthesis of model 2-deoxy-β-glycosides of α-hydroxytetralone. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 960-962.



- REED S.G., BARRAL-NETTO M. et INVERSO J.A., 1984. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with lymphokine encapsulated in liposomes. *J. Immunol.*, **132**, 3116-3119.
- REMBOLD H., 1989. Azadirachtin inhibits *Trypanosoma cruzi* infections of its triatomine insect host. *Rhodnius proxilus*. *Naturwissenschaften*, **76**, 77-78.
- RIBEIRO-SANTOS R., RASSI A., et KOBERLE F., 1980. Chagas' disease. *Antibiot. Chemother.*, **30**, 115-134.
- RIOUX J.A., 1986. *Leishmania. Taxonomy and phylogeny*, Montpellier, IMEE.
- ROBERT-GERO M., BACHRACH U., BHATNAGAR S. et POLONSKY J., 1985. Inhibition *in vitro* de la croissance des promastigotes de *Leishmania donovani* par des quassinoides. *C. R. Acad. Sci. (Paris), Série 2*, **300**, 803-806.
- ROBINSON H., 1987. Studies in the Liabeae (Asteraceae). XVIII. A new species of *Munnozia* from Bolivia. *Phytologia*, **63**, 407-409.
- ROBINSON H. et KAHN B., 1985. New species of *Vernonia* from Bolivia and Peru. *Phytologia*, **58**, 252-257.
- ROJAS T. et AVILA J.L., 1987. American *Leishmania* ssp: Formycin B treatment of cutaneous leishmaniasis in mice. *Parasitology*, **94**, 467-474.
- ROSS R., 1903. Note of the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit. Med. J.*, **11**, 1261-1262.
- ROVAI L.E., AOKI A., GEREZ DE BURGOS N.M. et BLANCO A., 1990. Effect of gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, **37**, 280-286.
- ROWE J.W., SEIKEIL M.K., ROY D.N. et JORGENSEN E., 1972. Chemotaxonomy of *Ulmus*. *Phytochemistry*, **11**, 2513-2517.
- RUSBY H.H., 1920. Three hundred new species of South American plants. *Published by the author at 115, West 68<sup>th</sup> Street, N.Y.*, 49.
- RUSBY H.H., 1927. Mulford exploration of the Amazon Valley. *Mem. N.Y. Bot. Gard.*, 288.
- SAENZ R.E., PAZ H. et BERMAN J.D., 1990. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Med.*, **89**, 147-155.
- SAF'JANOVA V.M., 1982. (Classification of the genus *Leishmania* Ross). *The leishmanias protozoology*; part 7. Leningrad: Academy of Sciences, USSR All Union Society of Protozoology, 95-101.
- SAMUELSON J., LERNER E., TESH R. et TITUS R., 1991. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.*, **173**, 49-54.
- SAND M., KRON M.A. et BROWN R.B., 1985. Pentamidine: a review. *Rev. Infec. Dis.*, **7**, 625-633.
- SANKARAM A.V.B., NARAYANA REDDY V.V. et MARTHANDAMURTHY M., 1986. <sup>13</sup>C NMR spectra of some naturally occurring binaphtoquinones and related compounds. *Phytochemistry*, **25**, 2867-2871.

- SCHWARCZ DE TARLOVSKY M.N., GOIJMAN S.G., MOLINA PORTELA M.P. et STOPPANI A.O.M., 1990. Effects of isoaxalolyl-naphtoquinoneimines on growth and oxygen radical production in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, **46**, 502-505.
- SCHOFIELD C.J., 1985. Control of Chagas' Disease vectors. *Brit. Med. Bull.*, **41**, 187-194.
- SCHÖPF C. et LEHMANN G., 1932. I. Über die Alkaloide der Angosturarinde: die Synthese des Chinaldins und *a-n*-Amyl-chinolins unter physiologischen Bedingungen. *Justus Liebigs Annal. Chem.*, **497**, 7-21.
- SCOTT V.D. et MATTHEWS T.R., 1987. The efficacy of an N-substituted imidazole, RS-49676, against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**, 308-313.
- SEGUINEAU C., RICHOMME P., FOURNET A., GUINAUDEAU H. et BRUNETON J., 1991. Isoquinoline alkaloids from *Cardiopetalum calophyllum* Schecht.. Soumis à *Planta Medica*.
- SIDHU G.S. et SANKARAM A.V.B., 1971. New biplumbagin and 3-chloroplumbagin from *Plumbago zeylanica*. *Tet. Lett.*, 2385-2388.
- SILVEIRA F.T., SHAW J.J., BRAGA R.R. et ISHIKAWA E., 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the State of Para. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**, 289-292.
- SOFOFORA A., 1982. *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. New York, Ed. John Wiley.
- STERN J.J. et MURRAY H.W., 1987. *In vitro* granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **156**, 533-534.
- STILL W.C., KAHN M. et MITRA A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, **43**, 2923-2925.
- TACHIBANA H., KURIHARA K., NAGAKURA K., KANEDA Y. et MONTENEGRO L.T., 1985. Therapeutic effect of hachimycin in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *IRCS, Med. Sci. Pharmacol.*, **13**, 1108-1109.
- TAKADA S. NOMI D., TANIGUCHI Y. et MANABE Y., 1990. Preparation of haloquinolines as intermediates for medicinal bactericides. *Jpn Kokai Tokhyo Koho*, JP 02, 188, 570. C.A. 114. 23 809 g
- TALAPATRA S.K., KARMACHARYA B., DE S.C. et TALAPATRA B., 1988. (-) Regiolone, an a-tetralone from *Juglans regia*: structure, stereochemistry and conformation. *Phytochemistry*, **27**, 3929-3932.
- TEZUKA M., TAKAHASHI C., KUROYANAGI M. SATAKE M., YOSHIHIRA K. et NATORI S., 1973. New naphtoquinones from *Diospyros*. *Phytochemistry*, **12**, 175-183.
- THOMPSON R.H., 1987. *Naturally occurring quinones, III. Recent advances*. Ed Chapman and Hall Ltd, 159-165, 259-261.
- TIBAYRENC M., WARD P., MOYA A. et AYALA F.J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 115-119.
- TODZIA C.A., 1989. A revision of *Ampelocera* (Ulmaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **76**, 1087-1102.
- TORRES GUERRIN M., 1986. Etude de l'activité antileishmanienne, *in vitro*, d'extraits de diverses plantes utilisées en médecine traditionnelle en Guyane Française. *Thèse de doctorat en médecine, Montpellier*.

- TROTTER E.R., PETERS W. et ROBINSON B.L., 1980a. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. IV. The development of a rodent model for visceral infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 127-138.
- TROTTER E.R., PETERS W. et ROBINSON B.L., 1980b. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **74**, 299-319.
- TSUCHA N. et YUTAKA A., 1990. Topical formulations containing 2-hydroxy-1,4-naphtoquinones for prevention of dermatitis on the scalps. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP 02, 42, 012 (9042012).
- URCUYO F.G. et ZAYAS N., 1982. Oral Ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.*, **21**, 414-416.
- VALENCIA TELLERIA A., 1979. Investigación epidemiologica del mal de Chagas. *Bol. Epidemiol.*, 54-60.
- VELEZ I.D., 1991. Co-infection VIH et leishmanies dans le sud de l'Espagne et en Colombie. *Informal Meeting, ORSTOM-OMS, Montpellier*, 14-15 Mars.
- VENNERSTROM J.L., LOVELACE J.K., WAITS V.B., HANSON W.L. et KLAYMAN D.L., 1990. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 918-921.
- VIEIRA P.C. et KUBO I., 1990. Molluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*. *Phytochemistry*, **29**, 813-815.
- WALTON B.C., HARPER J.III et NEAL R.A., 1983. Effectiveness of allopurinol against *Leishmania braziliensis panamensis* in *Aotus trivirgatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**, 46-50.
- WALZER P.D., KIM C.K., FOY J. et ZHANG J., 1991. Furazolidione and nitrofurantoin in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 158-163.
- WEBER J.F., M. LE RAY A.M., BRUNETON J. et FOURNET A., 1989. Alkaloidal content of four *Berberis* species structure of berberilaurine, a new bisbenzyltetrahydroisoquinoline. *J. Nat. Prod.*, **52**, 81-84.
- WEINRAUCH L. et EL-ON J., 1984. The effect of ketoconazole and a combination of rifampicin/amphotericin B on cutaneous leishmaniasis in laboratory mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 389-390.
- WEINRAUCH L., LIVSHIN R., EVEN-PAZ Z. et EL-ON J., 1983. Efficacy of ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Arch. Dermatol. Res.*, **275**, 353-354.
- WEINRAUCH L., LIVSHIN R., JACOBS G.P. et EL-ON J., 1984. Cutaneous leishmaniasis: failure of topical treatment with imidazole derivatives in laboratory animals and man. *Arch. Dermatol. Res.*, **276**, 133-134.
- WELLCOME FOUNDATION, 1990. Preparation of naphthoquinones derivatives and pharmaceutical compositions containing them for treatment of infection with *Pneumocystis carinii*. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*, JP, 02 91 037.
- WHITE M.R., CHAPMAN W.L. et HANSON W.L., 1989. Chemotherapy of experimental visceral leishmaniasis in the opossum. *J. Parasitol.*, **75**, 176-178.
- WILCKOKS C. et MANSON-BAHR P.E.C., 1972. *Manson's Tropical disease*. 17<sup>ed</sup>, London, Baillere Tindall.

WOMMACK Jr J.B. et PEARSON D.E., 1970. Potential antimalarials. IV. Quinoline-a, a dialkylmethanols. *J. Med. Chem.*, **13**, 383-386.

WOODARD G., 1965. *Principles in drug administration in methods of animal experimentation*. WI Gay Ed., Academic Press, NY, p.110.

WRIGHT C.W. et PHILLIPSON J.D., 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother. Res.*, **4**, 127-139.

YORKE W., 1940. Recent work on the chemotherapy of protozoal infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **33**, 463-472.

YOUSSEFYEH R.D., MAGNIEN E., LEE T.D.Y., CHAN W.K., LIN C., GALEMMO R.A. Jr, JOHNSON W.H. Jr., TAN J. et CAMPBELL H.F., 1990. Development of a novel series of (2-quinolinyl methoxy) phenyl containing compounds as high affinity leukotriene receptor antagonists; 1. Initial structure-activity relationship. *J. Med. Chem.*, **33**, 1186-1194.

ZDERO C., BOHLMANN F., SOLOMON J. et DOMINGUEZ X.A., 1988. Further isocedrene derivatives and other constituents from *Perezia* species. *Phytochemistry*, **27**, 849-853.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
<b>PREMIERE PARTIE : LES LEISHMANIOSES ET LA MALADIE DE CHAGAS</b>	
<u>LES LEISHMANIOSES</u>	3
1.1. CLASSIFICATION ET CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE DES LEISHMNIOSSES DU NOUVEAU MONDE	4
1.1.1. Taxonomie des espèces du genre <i>Leishmania</i> ssp.	4
1.1.2. Morphologie	5
1.1.3. Les vecteurs	5
1.1.4. Les réservoirs	6
1.2. ASPECTS CLINIQUES ET REPARTITIONS GEOGRAPHIQUES DES LEISHMANIOSES DU NOUVEAU MONDE	6
1.2.1. Les leishmanioses tégumentaires	6
1.2.2. Les leishmanioses viscérales	9
1.3. CHIMIOOTHERAPIE DES LEISHMANIOSES	10
1.3.1. Produits d'utilisation courante	10
1.3.2. Produits occasionnels	16
1.3.3. Produits en cours d'expérimentation	20
1.4. RECHERCHE DE NOUVEAUX PRODUITS	24
1.4.1. Modèles expérimentaux <i>in vitro</i>	24
1.4.2. Modèles expérimentaux <i>in vivo</i>	25
<u>LA MALADIE DE CHAGAS</u>	27
1.5.. CYCLE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS	28
1.5.1. Le parasite: <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.5.2. Aspects cliniques de la maladie de Chagas	29
1.5.3. Les vecteurs de la maladie de Chagas	30
1.5.4. Lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas	31
1.6. CHIMIOOTHERAPIE DE LA MALADIE DE CHAGAS	31
1.6.1. Médicaments couramment employés	31
1.6.2. Médicaments potentiels	34
<b>DEUXIEME PARTIE</b>	36
2.1. ENQUETES ETHNOPHARMACOLOGIQUES	38
2.1.1. Historique	38
2.1.2. Généralités géographiques et économiques sur la Bolivie	40

2.1.3. Prospections ethnopharmacologiques dans les zones de colonisation	41
2.1.4. Enquêtes ethnopharmacologiques chez les Chimanes	44
2.1.5. La leishmaniose viscérale en Bolivie	48
2.1.6. La maladie de Chagas en Bolivie	48
2.1.7. Récoltes botaniques	49
2.2. METHODOLOGIE DU CRIBLAGE BIOLOGIQUE	51
2.2.1. Tests biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Leishmania</i> ssp au stade promastigotes	51
2.2.2. Tests biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade épimastigote	54
2.3. SELECTION DES PLANTES	56
2.3.1. Résultats sur l'ensemble des récoltes	56
2.3.2. Résultats par type d'extraits	57
2.3.3. Bilan par organe de plantes	58
2.3.4. Résultats par familles botaniques	59
2.3.5. Résultats des essais biologiques préliminaires <i>in vitro</i> sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle comme leishmanicides	62
2.3.6. Tests biologiques préliminaires <i>in vitro</i> avec des plantes récoltées sur des informations ethnopharmacologiques diverses	67
2.3.7. Résultats d'essais préliminaires biologiques <i>in vitro</i> sur quelques plantes récoltées sur des critères chimiotaxonomiques	70
2.4. ESSAIS BIOLOGIQUES SUR LES PRODUITS ISOLEES	73
2.4.1. Méthodes chimiques d'extraction d'isolement et d'identification des principes actifs	73
2.4.2. Protocoles expérimentaux des essais biologiques sur les produits purifiés	74
2.4.3. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur les amastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> infectant les macrophages de souris Balb/c	75
2.4.4. Essais <i>in vivo</i> sur <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. venezuelensis</i>	79
2.4.5. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade trypomastigote	83
2.4.6. Essais biologiques <i>in vivo</i> sur <i>Trypanosoma cruzi</i>	84

### TROISIEME PARTIE :

#### ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE *GALIPEA LONGIFLORA* Kr. (RUTACEAE)

3.1 ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE <i>GALIPEA LONGIFLORA</i> Kr. (RUTACEAE)	86
3.1.1. Etude botanique du genre <i>Galipea</i> et de <i>Galipea longiflora</i> Krause	86
3.1.2. Ethnopharmacologie de <i>Galipea longiflora</i> Kr	88
3.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS	89
3.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc	90

3.2.2. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines	92
3.2.3. Extraction et isolement des principes actifs des feuilles	93
3.2.4. Composition alcaloïdique des différents organes de <i>G. longiflora</i>	94
3.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES ALCALOÏDES ACTIFS <i>IN VITRO</i> DU <i>GALIPEA LONGIFLORA</i> Kr	95
3.3.1. Alcaloïde I: 2-phénylquinoléine	96
3.3.2. Alcaloïde II: 2- <i>n</i> -pentylquinoléine	97
3.3.3. Alcaloïde III: 2- <i>n</i> -propylquinoléine	98
3.3.4. Alcaloïde IV: 4-méthoxy-2-phénylquinoléine	99
3.3.5. Alcaloïde V: 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine	100
3.3.6. Alcaloïde VI: 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	101
3.3.7. Alcaloïde VII: 4-méthoxy-2- <i>n</i> -propylquinoléine ou Chimanine A	102
3.3.8. Alcaloïde VIII: 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine	103
3.3.9. Alcaloïde IX: 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine	104
3.3.10. Alcaloïde X: skimmianine	105
3.3.11. Alcaloïde XI: 2-( <i>E</i> )-prop-1'énylquinoléine ou chimanine B	106
3.3.12. Alcaloïde XII: 2-(1',2'- <i>trans</i> -époxypropyl)quinoléine ou chimanine D	107
3.3.13. Alcaloïde XIII: 4-méthoxy-2-( <i>E</i> )-prop-1'énylquinoléine ou chimanine C	108
3.3.14. Discussion sur la composition alcaloïdique du <i>G. longiflora</i> Kr.	109
3.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES AVEC LES QUINOLEINES DE <i>GALIPEA LONGIFLORA</i> Kr.	110
3.4.1. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Leishmania</i> ssp au stade promastigote	110
3.4.2. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>L. amazonensis</i> (PH8) au stade amastigote	111
3.4.3. Mesure de la toxicité (DL 50) des alcaloïdes I à XII	112
3.4.4. Activité biologique <i>in vivo</i>	113
3.4.4.1 Alcaloïde I : 2-phénylquinoléine	114
3.4.4.2. Alcaloïde II: 2- <i>n</i> -pentylquinoléine	118
3.4.4.3. Alcaloïde III: 2- <i>n</i> -propylquinoléine	120
3.4.4.4. Alcaloïde IV: 4-méthoxy-2-phénylquinoléine	124
3.4.4.5. Alcaloïde V: 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine	126
3.4.4.6. Alcaloïde VI: 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine	130
3.4.4.7. Alcaloïde VII: 4-méthoxy-2- <i>n</i> -propylquinoléine ou Chimanine A	132
3.4.4.8. Alcaloïde VIII: cusparine	134
3.4.4.9. Alcaloïde IX: 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine	137
3.4.4.10. Alcaloïde X: skimmianine	138
3.4.4.11. Alcaloïde XI: chimanine B	140
3.4.4.12. Alcaloïde XII: chimanine D	143

3.4.5. Discussion des résultats	146
3.4.6. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>T. cruzi</i> au stade épimastigote	151
3.4.7. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>T. cruzi</i> au stade trypomastigote	152
3.4.8. Essai <i>in vivo</i> sur des souris Balb/c infectées par <i>T. cruzi</i>	153

#### QUATRIEME PARTIE:

#### ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE *PERA BENENSIS* Rusby (EUPHORBIACEAE)

4.1. ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE DE <i>PERA BENENSIS</i> RUSBY (EUPHORBIACEAE)	154
4.1.1. Etude botanique du genre <i>Pera</i> et de <i>Pera benensis</i> Rusby	154
4.1.2. Ethnopharmacologie de <i>P. benensis</i> Rusby	155
4.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS	155
4.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines	156
4.2.2. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc	158
4.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES QUINONES ACTIVES <i>IN VITRO</i> DE <i>PERA BENENSIS</i> RUSBY	160
4.3.1. Quinone 1: la plumbagone	161
4.3.2. Quinone 2 : la 3,3'-biplumbagone	162
4.3.3. Quinone 3 : la 8,8'-biplumbagone ou marinone	163
4.3.4. Produit neutre: le lupéol	164
4.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES EFFECTUES AVEC LES QUINONES ET LE LUPEOL ISOLEES DE <i>PERA BENENSIS</i> RUSBY	165
4.4.1. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Leishmania .ssp</i> au stade promastigote	165
4.4.2. Activité biologique <i>in vitro</i> sur <i>L.amazonensis</i> (PH8) au stade amastigote	166
4.4.3. Mesure de la toxicité (DL 50 ) des produits isolés de <i>P. benensis</i>	167
4.4.4. Activité biologique <i>in vivo</i>	168
4.4.4.1. La plumbagone	168
4.4.4.2. La 3,3'-biplumbagone	174
4.4.4.3. La 8,8'-biplumbagone ou marinone	177
4.4.4.4. Le lupéol :Essais <i>in vivo</i> sur <i>L.amazonensis</i> (PH8)	180
4.4.5. Discussion	182
4.4.6. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>T.cruzi</i> au stade épimastigote	185
4.4.7. Essais <i>in vitro</i> sur <i>T. cruzi</i> (Y) au stade trypomastigote	185



## CINQUIEME PARTIE:

### ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE D'AMPELOCERA EDENTULA KUHLM. (ULMACEAE)

5.1. ETUDES BOTANIQUE ET ETHNOPHARMACOLOGIQUE D'A. EDENTULA KUHLM. (ULMACEAE)	187
5.1.1. Etudes botaniques du genre <i>Ampelocera</i> et d' <i>A. edentula</i> Kuhlman	187
5.1.2. Ethnopharmacologie d' <i>A. edentula</i> Kuhlman	190
5.2. SEPARATION ET ISOLEMENT DES PRODUITS ACTIFS	191
5.2.1. Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc	191
5.3. DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPES ACTIFS D'AMPELOCERA EDENTULA KUHLM	194
5.3.1. La 4-hydroxy-1-tétralone	194
5.3.2.: Autre produit actif: la fraction 3	196
5.4. RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES	197
5.4.1. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>Leishmania</i> ssp au stade promastigote	197
5.4.2. Activité biologique <i>in vitro</i> sur <i>L.amazonensis</i> (PH8) au stade amastigote	197
5.4.3. Mesure de la toxicité (DL50)	198
5.4.4. Activité biologiques <i>in vivo</i>	199
5.4.4.1. La 4-hydroxy-1-tétralone	199
5.4.4.2. La fraction 3	203
5.4.5. Discussion	206
5.4.6. Essais biologiques <i>in vitro</i> sur <i>T. cruzi</i> au stade épimastigote	207
5.4.7. Essais <i>in vitro</i> sur <i>T. cruzi</i> au stade trypomastigote	207
CONCLUSION	208
BIBLIOGRAPHIE	211

## Cartes - Courbes - Figures - Schémas - Tableaux

Cartes		Page
Carte N° 1	Estimations des zones d'endémies de la leishmaniose cutanée et de la maladie de Chagas	39
Carte N° 2	Bolivie physique	40
Carte N° 3	Régions de Bolivie prospectées	41
Courbes		
Courbe N° 2.1	Evolution de l'Indice Leishmanien (IL) en fonction de la quantité d'amastigotes de <i>Leishmania amazonensis</i> (PH8) inoculée à des souris Balb/c	81
Courbe N° 2.2	Evolution de l'Indice Leishmanien (IL) en fonction de la quantité d'amastigotes de <i>L. venezuelensis</i> (H-3) inoculée à des souris Balb/c	82
Courbe N° 3.1	Activité de la 2-phénylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	114
Courbe N° 3.2	Activité de la 2-phénylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	115
Courbe N° 3.3	Activité de la 2-phénylquinoléine (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	117
Courbe N° 3.4	Activité de la 2- <i>n</i> -pentylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	118
Courbe N° 3.5	Activité de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	120
Courbe N° 3.6	Activité de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	121
Courbe N° 3.7	Activité de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	122
Courbe N° 3.8	Activité de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	123
Courbe N° 3.9	Activité de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) (écorces de racines) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	124
Courbe N° 3.10	Activité de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) (écorces de tronc) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	125
Courbe N° 3.11	Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	126
Courbe N° 3.12	Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	127
Courbe N° 3.13	Activité de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényléthyl) quinoléine (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	128

	Page
Courbe N° 3.14	129
Activité de la 2-(3,4-méthylènedicoxyphényléthyl) quinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	
Courbe N° 3.15	130
Activité de la 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.16	132
Activité de la chimanine A (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	
Courbe N° 3.17	133
Activité de la chimanine A (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.18	134
Activité de la cusparine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	
Courbe N° 3.19	135
Activité de la cusparine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.20	136
Activité de la cusparine (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.21	137
Activité de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.22	138
Activité de la skimmianine (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.23	139
Activité de la skimmianine (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> en dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> en dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.24	140
Activité de la chimanine B (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.25	142
Activité de la chimanine B (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.26	143
Activité de la chimanine D (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.27	145
Activité de la chimanine D (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 3.28	153
Courbe de la mortalité des souris Balb/c infectées par 25.000 trypanostigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tehuntepec)	
Courbe N° 3.29	153
Courbe de la parasitémie des souris Balb/c infectées par 25.000 trypanostigotes de <i>T. cruzi</i> (Tehuntepec) et traitées avec la 2-phénylquinoléine	
Courbe N° 4.1	168
Activité de la plumbagone (5 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (H-142)	
Courbe N° 4.2	170
Activité de la plumbagone (7,5 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> pendant une semaine) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 4.3	171
Activité de la plumbagone (5 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	
Courbe N° 4.4	172
Activité de la plumbagone (2,5 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	

		Page
Courbe N° 4.5	Activité de la plumbagone (5 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	173
Courbe N° 4.6	Activité de la 3,3'-biplumbagone (25 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	174
Courbe N° 4.7	Activité de la 3,3'-biplumbagone (50 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	175
Courbe N° 4.8	Activité de la 8,8'-biplumbagone (25 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	177
Courbe N° 4.9	Activité de la 8,8'-biplumbagone (25 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	178
Courbe N° 4.10	Activité de la 8,8'-biplumbagone (50 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	179
Courbe N° 4.11	Activité du lupéol (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) et du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	180
Courbe N° 5.1	Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone (25 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	199
Courbe N° 5.2	Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone (50 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	200
Courbe N° 5.3	Activité de la 4-hydroxy-1-tétralone (25 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>Leishmania venezuelensis</i> (H-3)	202
Courbe N° 5.4	Activité de la fraction 3 (100 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ), du Glucantime <sup>R</sup> (200 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> ) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	203
Courbe N° 5.5	Activité de la fraction 3 (150 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) et du Glucantime <sup>R</sup> (400 mg kg <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> , dose unique) sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	205
<b>Figures</b>		
Figure N° 1	Taxonomie des <i>Leishmania</i> ssp d'après Peters et Killick-Kendrick, 1987	4
Figure N° 2	Promastigotes, (O.M.S., 1982)	5
Figure N° 3	Amastigotes dans des macrophages (O.M.S., 1982)	5
Figure N° 4	Phlébotome ( O.M.S. ,1982)	5
Figure N° 5	Distribution géographique dans le Nouveau Monde des leishmanioses cutanées associées aux parasites du complexe <i>Leishmania braziliensis</i> (Grimaldi et al., 1989)	6
Figure N° 6	Leishmaniose cutanée ( <i>Leishmania braziliensis</i> ): aspect du "nez de tapir" (Yungas, Bolivie) d'après Photo de P. DESJEUX	7
Figure N° 7	Distribution géographique dans le Nouveau Monde des leishmanioses cutanées associées au complexe <i>Leishmania mexicana</i> (Grimaldi et al., 1989)	8
Figure N° 8	Distribution géographique de la leishmaniose viscérale associée à <i>Leishmania chagasi</i> dans le Nouveau Monde (Grimaldi et al. 1989)	9
Figure N° 9	Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde (OMS, 1982)	9

		Page
Figure N° 10	Formules chimiques du stibogluconate de Sodium (Pentostam <sup>R</sup> ) et antimoniate de méglumine (Glucantime <sup>R</sup> )	11
Figure N°11	Formule chimique de la Pentamidine ou bis (carbonamido-4-phénoxy)-1,5 pentane	13
Figure N° 12	Formule chimique de l'amphotéricine B	15
Figure N° 13	Formules chimiques de quelques 8-aminoquinoléines	17
Figure N° 14	Formule chimique du ketoconazole	18
Figure N° 15	Estimation de la distribution géographique de la maladie de Chagas en Amérique du Sud	27
Figure N° 16	Taxonomie de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figure N° 17	Cycle de <i>Trypanosoma cruzi</i> (De Vos et al., 1989)	28
Figure N° 18	Symptomatologie de la maladie de Chagas ( Gentilini et al., 1982)	29
Figure N° 19	Cycle de <i>Triatoma infestans</i> (De Vos et al., 1989)	30
Figure N° 20	Formule chimique du nifurtimox	31
Figure N° 21	Formule chimique du benznidazole	32
Figure N° 22	Formule chimique du violet de gentiane	33
Figure N° 23	<i>Galipea longiflora</i> Kr.	87
Figure N° 24	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de <i>Galipea longiflora</i> Kr. par l'éther de pétrole	90
Figure N° 25	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de <i>Galipea longiflora</i> Kr. par le chloroforme	91
Figure N° 26	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines de <i>Galipea longiflora</i> Kr.	92
Figure N° 27	Extraction et isolement des principes actifs des feuilles de <i>Galipea longiflora</i> Kr.	93
Figure N° 28	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-phénylquinoléine (Alcaloïde I)	96
Figure N° 29	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-phénylquinoléine (Alcaloïde I)	96
Figure N° 30	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2- <i>n</i> -pentylquinoléine (Alcaloïde II)	97
Figure N° 31	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2- <i>n</i> -pentylquinoléine (Alcaloïde II)	97
Figure N° 32	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (Alcaloïde III)	98
Figure N° 33	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2- <i>n</i> -propylquinoléine (Alcaloïde III)	98
Figure N° 34	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (Alcaloïde IV)	99
Figure N° 35	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2-phénylquinoléine (Alcaloïde IV)	99
Figure N° 36	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine (Alcaloïde V)	100
Figure N° 37	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl) quinoléine (Alcaloïde IV)	100
Figure N° 38	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine (Alcaloïde VI)	101
Figure N° 39	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2- <i>n</i> -pentylquinoléine (Alcaloïde VI)	101
Figure N° 40	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2- <i>n</i> -propylquinoléine ou Chimanine A (Alcaloïde VII)	102
Figure N° 41	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2- <i>n</i> -propylquinoléine ou Chimanine A (Alcaloïde VII)	102
Figure N° 42	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine (Alcaloïde VIII)	103

		Page
Figure N° 43	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-méthylènedioxyphényl éthyl)-4-méthoxyquinoléine ou cusparine (Alcaloïde VIII)	103
Figure N° 44	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine (Alcaloïde IX)	104
Figure N° 45	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(3,4-diméthoxyphényléthyl) quinoléine (Alcaloïde IX)	104
Figure N° 46	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la skimmianine (Alcaloïde X)	105
Figure N° 46 bis	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la skimmianine (Alcaloïde X)	105
Figure N° 47	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(E)-prop-1'énylquinoléine ou chimanine B (Alcaloïde XI)	106
Figure N° 48	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(E)-prop-1'énylquinoléine ou chimanine B (Alcaloïde XI)	106
Figure N° 49	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(1',2'-trans-époxypropyl) quinoléine ou chimanine D (Alcaloïde XII)	107
Figure N° 50	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 2-(1,2-trans-époxypropyl) quinoléine ou chimanine D (Alcaloïde XII)	107
Figure N° 51	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2-(E)-prop-1'ényl quinoléine ou chimanine C (Alcaloïde XIII)	108
Figure N° 52	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-méthoxy-2-(E)-prop-1'ényl quinoléine ou chimanine C (Alcaloïde XIII)	108
Figure N° 53	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de racines de <i>Pera benensis</i> Rusby	156
Figure N° 54	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc de <i>Pera. benensis</i> Rusby	157
Figure N° 55	Formule chimique de la plumbagone	161
Figure N° 56	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la plumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	161
Figure N° 57	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la plumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	161
Figure N° 58	Formule chimique de la 3,3'-biplumbagone	162
Figure N° 59	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 3,3'-biplumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	162
Figure N° 60	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 3-3'-biplumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	162
Figure N° 61	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 8,8'-biplumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	163
Figure N° 62	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 8-8'-biplumbagone (CDCl <sub>3</sub> )	163
Figure N° 63	Formule chimique du lupéol	164
Figure N° 64	Distribution d' <i>Ampelocera edentula</i> Kuhl. (Ulmaceae), <i>A. albertiae</i> et <i>A. macrocarpa</i> (Todzia 1989)	189
Figure N° 65	Extraction et isolement des principes actifs des écorces de tronc d' <i>Ampelocera edentula</i> Kuhl.	191
Figure N° 66	Formule chimique de la 4-hydroxy-1-tétralone	194
Figure N° 67	RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-hydroxy-1-tétralone (CDCl <sub>3</sub> )	194
Figure N° 68	RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la 4-hydroxy-1-tétralone (CDCl <sub>3</sub> )	194
<b>Schémas</b>		
Schéma N° 2.1	Chronologie des recherches	36
Schéma N° 2.2	Plan de travail après la récolte des plantes sur le terrain	51
Schéma N° 2.3	Méthodologie d'extraction, d'isolement des principes actifs	73
Schéma N° 3.1	Activité comparative des quinoléines isolées de <i>Galipea longiflora</i> Kr. du Glucantime sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8)	149

		Page
Schéma N° 4.1	Activité comparative des quinones isolées de <i>Pera benensis</i> Rusby, du Glucantime sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8) et par <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	183
Schéma N° 5.1	Activité comparative du Glucantime de la 4-hydroxy-1-tétralone isolée d' <i>Ampelocera edentula</i> Kulm sur des souris Balb/c infectées par <i>L. amazonensis</i> (PH8) et sur <i>L. venezuelensis</i> (H-3)	206
<b>Tableaux</b>		
Tableau N° 1.1	Nom des espèces de leishmanies du Nouveau Monde et leur forme clinique	3
Tableau N° 1.2	Activité du stibogluconate de sodium (Pentostam <sup>R</sup> ) sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	10
Tableau N° 1.3	Activité de l'antimoniote de méglumine (Glucantime <sup>R</sup> ) sur plusieurs modèles expérimentaux (Neal, 1987)	11
Tableau N° 1.4	Activité <i>in vitro</i> des médicaments couramment employés pour traiter les leishmanioses (Neal, 1987)	11
Tableau N° 1.5	Activité de la pentamidine sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	14
Tableau N° 1.6	Activité de l'amphotéricine B sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	15
Tableau N° 1.7	Activité de l'allopurinol et quelques uns de ses dérivés sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	16
Tableau N° 1.8	Activité de quelques amino-8 quinoléines sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	18
Tableau N° 1.9	Activité de quelques médicaments sur les modèles expérimentaux (Neal, 1987)	19
Tableau N° 1.10	Activités biologiques <i>in vitro</i> de quelques produits sur <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Tableau N° 1.11	Activités biologiques <i>in vivo</i> de quelques produits sur <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Tableau N° 2.1	Bilan global de tous les essais biologiques <i>in vitro</i> de criblage sur les extraits bruts de plantes	56
Tableau N° 2.2	Résultats des essais biologiques <i>in vitro</i> par type d'extraits sur trois espèces de <i>Leishmania</i> ssp. au stade de promastigote	57
Tableau N° 2.3	Résultats des essais biologiques <i>in vitro</i> par type d'extraits sur trois souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade d'épimastigote	57
Tableau N° 2.4	Résultats des essais biologiques préliminaires <i>in vitro</i> sur trois espèces de <i>Leishmania</i> ssp au stade de promastigote, en fonction de l'organe de la plante et le type d'extrait préparé	58
Tableau N° 2.5	Résultats des essais biologiques préliminaires <i>in vitro</i> sur trois souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade d'épimastigote, en fonction de l'organe de la plante et le type d'extrait préparé	58
Tableau N° 2.6	Résultats des tests préliminaires <i>in vitro</i> sur trois espèces de <i>Leishmania</i> sp. au stade de promastigote, en fonction de la famille botanique des plantes récoltées	59
Tableau N° 2.7	Résultats des tests préliminaires <i>in vitro</i> sur trois souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> au stade d'épimastigote, en fonction de la famille botanique des plantes récoltées	60
Tableau N° 3.1	Composition alcaloïdique des différents organes de <i>Galipea longiflora</i>	94
Tableau N° 3.2	Inhibition de la croissance des promastigotes de leishmanies après 48h de contact avec les douze quinoléines isolées à partir de <i>Galipea longiflora</i> Kr. et deux médicaments de référence, la pentamidine et l'antimoniote de méglumine	110

	Page
Tableau N° 3.3	111
Tableau N° 3.4	112
Tableau N° 3.5	147
Tableau N° 3.6	148
Tableau N° 3.7	151
Tableau N° 3.8	152
Tableau N° 4.1	165
Tableau N° 4.2	166
Tableau N° 4.3	167
Tableau N° 4.4	167
Tableau N° 4.5	167
Tableau N° 4.6	185
Tableau N° 4.7	186
Tableau N° 5.1	197
Tableau N° 5.2	197
Tableau N° 5.3	198
Tableau N° 5.4	198
Tableau N° 5.5	207
Tableau N° 5.6	207



## Abréviations

- A.D.N.= Acide désoxyribonucléique  
Act. Biol.= Activité biologique  
A.R.N.= Acide ribonucléique  
BBTHQ = Bisbenzyltétrahydroisoquinoléine  
BSS = Buffer Salt Solution (Solution salée tamponnée)  
CC = Chromatographie sur colonne  
CCM = Chromatographie sur couche mince  
C8 CL 1 = Souche C8 CL1 de *Trypanosoma. cruzi*  
DL 50 = Dose létale 50  
DMSO = diméthylsulfoxyde  
EDTA = acide éthylène diamino tétraacétique  
FC = Flash chromatographie  
I.L. = Indice Leishmanien  
I.S. = Indice de survie  
*L. a.*=*Leishmania amazonensis*  
*L. b.* =*Leishmania braziliensis*  
*L. d. c.*=*Leishmania donovani chagasi*  
*Leish.* = *Leishmania* ssp  
LIT = Liver Infusion Tryptose  
MEM = Minimum Essential Medium Eagle  
NNN = Novy, McNeal, Nicoll  
O.N.G. = Organisation Non Gouvernementale  
PBS = Phosphate Buffer Solution  
SVF = Sérum Foetal de Veau  
U = Unité  
U.I. = Unité Internationale

FOURNET Alain

Titre de la thèse:

Plantes médicinales boliviennes antiparasitaires (leishmaniose et maladie de Chagas): *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae), *Pera benensis* Rusby (Euphorbiaceae) et *Ampelocera edentula* Kuhlmann (Ulmaceae)

RESUME :

Par des enquêtes ethnopharmacologiques, nous avons recueilli, en Bolivie, des informations sur l'utilisation de plantes dans le traitement des leishmanioses cutanées. Après un criblage biologique *in vitro* sur plus de 250 plantes, trois d'entre elles ont été sélectionnées. Treize alcaloïdes ont été isolés et identifiés de *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae), trois naphthoquinones de *Pera benensis* Rusby (Euphorbiaceae), et une tétralone de *Ampelocera edentula* Kuhlmann (Ulmaceae). Plusieurs de ces produits se sont révélés aussi actifs *in vivo* que le médicament de référence, le Glucantime<sup>®</sup>.

MOTS-CLE :

Bolivie, ethnopharmacologie, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, Rutaceae, *Galipea longiflora*, quinoléines, *Pera benensis*, naphthoquinones, Ulmaceae, *Ampelocera edentula*, Ulmaceae.

GROUPE DE FORMATION DOCTORALE :

DEA de Chimie et Physicochimie des Composés d'Intérêt Biologique

UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE PHARMACIE  
5, rue Jean-Baptiste Clément  
92296 CHATENAY-MALABRY