



**HAL**  
open science

# Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité.

Yannick Estevez

## ► To cite this version:

Yannick Estevez. Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité.. Sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2009. Français. NNT: . tel-00519174

**HAL Id: tel-00519174**

**<https://theses.hal.science/tel-00519174>**

Submitted on 18 Sep 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Innovations pharmaceutiques*

---

Présentée et soutenue par *Estevez Yannick*  
Le 28 septembre 2009

**Titre :** *Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité*

---

### JURY

*Pr Valentin Alexis (Président du Jury)*  
*Dr Eric Deharo (directeur de thèse)*  
*Dr Piarroux Renaud (Rapporteur)*  
*Dr Loiseau Philippe M. (Rapporteur)*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie-Santé-Biotechnologie*  
**Unité de recherche :** UMR 152-IRD/Université  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr Eric Deharo*

*A mes familles du Nord et du Sud  
A Mai Daudignon et Thierry Michon  
Aux gens d'Azulis*

*Il y a à parier que toute idée publique, toute convention reçue, est une sottise, car elle a convenu au plus grand nombre.*

*L'importance sans mérite obtient des égards sans estime.*

*Chamfort (1741-1794)*

## ***Remerciements***

Je tiens à remercier Monsieur le Dr Michel Sauvain de m'avoir permis d'effectuer un volontariat dans l'unité mixte de recherche 152 IRD / Université de Toulouse : Pharmacohimie des substances naturelles et pharmacophores redox au sein du laboratoire de parasitologie cellulaire de l'Université Péruvienne Cayetano Heredia à Lima.

Je remercie Monsieur le Dr Eric Deharo, de l'UMR 152, d'avoir accepté d'être mon Directeur de thèse en me faisant confiance tout en me laissant une part de liberté.

Je remercie Madame la Dr Geneviève Bourdy de m'avoir fait goûter au travail de terrain ethnopharmacologique, travail très intéressant qui nécessite une très bonne approche sociologique avec les communautés rencontrées ainsi que ses remarques avisées.

-----

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Alexis Valentin de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.

J'aimerais également remercier Monsieur le Dr Renaud Piarroux Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Hôpital de la Timone à Marseille et Monsieur le Dr Phillippe Loiseau Professeur des Universités de la Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud 11 pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'en être rapporteurs et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'ai apprécié notre interaction et leurs remarques avisées lors de ma soutenance de thèse.

-----

Je tiens à remercier Messieurs les Professeurs Monge et Aldana de l'Université de Navarre à Pampelune pour la discussion intense et les conseils avisés prodigués lors de la présentation de mes résultats au sein de leur laboratoire du CIFA.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions.

Premièrement, Monsieur le Professeur Jorge Arevalo de l'Université Péruvienne Cayetano Heredia du laboratoire de parasitologie cellulaire qui m'a permis de découvrir l'épidémiologie clinique et d'aiguiser mon sens critique sur nos modèles de laboratoires.

Je voudrais remercier ensuite, Monsieur le Dr Mirko Zimic ainsi que Monsieur le Ms Miguel Quiliano Meza de l'Université Péruvienne Cayetano Heredia du laboratoire de bio-informatique qui m'ont initié à la modélisation et au docking.

Merci aussi à tous les collègues du laboratoire de Toulouse : Valérie, Anne-Cécile, Nicolas, Dominique, Carine, Jan, Marion, Pierre, Emilie, Romain, Billy, Hany, Mohamed et Nawal pour leur aide précieuse et leur temps accordé.

-----

Gracias a todos y todas del laboratorio C del IMT-vH a Lima tanto a los “malaricos” como a los “leishmanicos” por la recepción que me han dado, la gran ayuda por mi tesis y sus amistad.

Gracias a Cristian, Renzo, Roberto, Diego, Vanessa, Ángela, Raúl, Nicolás, Patty, Lis, Zenobia, Sonia, Giovana, Dioni, Kathy, Elizabeth, Cristopher, Sandra, Giovanni, Michael, Francesca, Martín, César, Iskra, Ivan, Jaime, Victor, Jorge, Carlos. Mil disculpa si falta alguien....

Gracias, particularmente, a los dos compadres de cabina Germán y Denis con quién he podido aprender a cortar laminillas y contar macrófagos.....

Gracias también a las chicas del laboratorio de química y de etnobotánica: Candy, Giovanna, y la Dra. Rosario Rojas, Virginia, Nanette, Lisset, Alicia y la Profesora Joaquina Alban.

Gracias también a las pasantes y amigas del laboratorio: la colombiana, Adriana; la belga, Marieke y la alemana, Andrea.

-----

Merci à Hélène qui m’a permis de me repérer dans cette grande ville qu’est Lima et de m’avoir trouvé un toit.

Merci à Thomas et aux 2 Julie pour les bons moments passés en votre compagnie dans et en dehors du laboratoire.

Merci aux français de Lima pour leur soutien et leur encouragement : Agathe, Mathieu, Robin, Anne, Carole, Marie-ester, Marie-des-neiges, les 2 Jérémie, Arnaud et Sophie, Ali et Domi, Alexis et Raphaëlle.

Merci à l’encadrement de la mission IRD à Lima : Jeannette, Miriam, Alain, Alexandra, Lula, Liliana, José, Pierre et Gérard.

Je tiens aussi à remercier, Pamela, Céline, Caro, Jug et Guillaume pour avoir été de très bon colocataires sur notre grand toit de la calle Collasuyo et qui sont devenus des amis au fil des années. Merci pour votre soutien et nos soirées vin rouge pour se remonter le moral.....

-----

Merci à Mallo, pour son temps qu’il a accordé à la relecture de ce manuscrit et aux diapositives de la présentation.

Merci à Peio pour son temps qu’il m’a accordé à m’expliquer la régression linéaire multiple nécessaire aux calculs de QSAR.

Merci à Thomas et Emilie pour leur accueil toujours parfait lors de mes séjours à Toulouse ainsi que Sandra, Bénédicte, Laurent et Lucia pour leurs encouragements et leurs conseils avisés.

Enfin, merci beaucoup, à l’association IPARKOR, plus particulièrement à son président, Monsieur Jon Eyherabide, qui m’a fait confiance et à permis le financement de la 3<sup>ème</sup> année de cette thèse. Milesker anitz

## Abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- a.i. : après infection
- APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric pressure chemical ionization)
- ARN : Acide ribonucléique
- ATP : Adénosine triphosphate
- CLHP : Chromatographie liquide haute performance
- $C_{i50}$  : Concentration Inhibitrice à 50%, concentration nécessaire pour avoir 50% d'inhibition de croissance du parasite
- CIFA : Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada
- $CO_2$  : Dioxyde de carbone
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DO : Densité Optique
- $D_{t50}$  : Dose toxique à 50%, concentration nécessaire pour tuer 50% des cellules
- ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
- g : gravité
- gr : Gramme
- h : heure
- IL-12 : Interleukine 12
- I.M.T-AvH : Instituto de Medicina Tropical-Alender van Humbolt
- $INF-\gamma$  : Interféron gamma
- IRD : Institut de Recherche pour le Développement
- IS : Index de sélectivité ( $IS = C_{i50} \text{ Cellule} / C_{i50} \text{ parasites}$ )
- LC : Leishmaniose cutanée
- LCM : Leishmaniose mucocutanée
- LCD : Leishmaniose cutanée diffuse
- LID : Laboratorio de Investigación y Desarrollo
- LLc-MK2 : Lignée de cellules de rein de singe
- Log P : coefficient de partition
- LV : Leishmaniose viscérale
- MAA : Milieu pour Amastigotes Axéniques
- $\mu L$  : microlitre
- $\mu g$  : microgramme
- mL : millilitre
- mm : millimètre
- MTT : Sel de tetrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)].
- NaCl : chlorure de sodium
- nm : nanomètre
- ng : nanogramme
- O.M.S : Organisme Mondial de la Santé
- PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate
- Ri : Réduction de l'Infection
- RPMI : Roswell Park Memorial Institut

- Sb<sup>V</sup> : antimoine pentavalent
- Sb<sup>III</sup> : antimoine trivalent
- SDS : Dodécyl sulphate de sodium
- SFB : Sérum Fœtal Bovin
- SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
- *sp* : Espèces
- THP-1 : Lignée monocyttaire humaine
- UMR : Unité Mixte de Recherche
- UNMSM : Universidad National Mayor San Marcos
- UPCH : Universidad Peruana Cayetano Heredia
- UPS : Université Paul Sabatier
- US\$ : dollar américains
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- VERO : Lignée de cellules de rein de singe
- WHO : World Health Organization.

# Table des matières

I.	Les Leishmanioses .....	1
1.1.	Historique .....	1
1.1.1.	Dans l’Ancien Monde .....	1
1.1.1.1.	Leishmanioses tégumentaires.....	1
1.1.1.2.	Leishmanioses viscérales .....	2
1.1.2.	Dans le Nouveau Monde .....	2
1.1.2.1.	Leishmanioses tégumentaires.....	2
1.1.2.2.	Leishmanioses viscérales .....	3
1.2.	Protagonistes de la maladie .....	3
1.2.1.	Les parasites .....	3
1.2.2.	Les vecteurs.....	5
1.2.3.	Les hôtes.....	5
1.3.	Biologie des Leishmania.....	6
1.3.1.	Organisation cellulaire de <i>Leishmania</i> .....	6
1.3.2.	Le dimorphisme des <i>Leishmania</i> .....	7
1.3.2.1.	Les promastigotes.....	8
1.3.2.2.	Les amastigotes .....	9
1.4.	Distribution des Leishmanioses de la part le monde .....	10
1.4.1.	Les chiffres .....	10
1.4.2.	Co-infection VIH/ <i>Leishmania</i> .....	11
1.5.	Réponses immunologiques chez l’hôte vertébré .....	12
1.6.	Les formes clinique de la maladie chez l’Homme.....	13
1.6.1.	Leishmaniose viscérale (LV) .....	13
1.6.2.	Leishmaniose cutanée (LC).....	14
1.6.3.	Leishmaniose cutanée diffuse (LCD).....	15
1.6.4.	Leishmaniose mucocutanée ou cutanéomuqueuse (LCM) .....	15
1.7.	Traitement des Leishmanioses.....	16
1.7.1.	Traitement de première intention .....	16
1.7.2.	Traitement de seconde intention .....	16
1.7.3.	Nouveaux traitements.....	17
II.	Problématique.....	19
2.1.	Terrain d’étude : le Pérou .....	21
2.1.1.	Distribution géographique des Leishmanioses.....	21
2.1.1.1.	Espèces de <i>Leishmania</i> .....	21
2.1.1.2.	Espèces de <i>Lutzomyia</i> .....	22
2.1.1.3.	Espèces réservoirs .....	23
2.1.2.	Situation épidémiologique.....	24
2.1.2.1.	Leishmaniose cutanée .....	24
2.1.2.2.	Leishmaniose mucocutanée.....	25
2.1.3.	Terrains de collectes.....	26
2.1.3.1.	L’ethnie Chayahuita .....	26
2.1.3.2.	L’ethnie Yanasha.....	27
2.2.	Objectifs.....	28
III.	Matériels et méthodes.....	30
3.1.	Préparation du matériel biologique.....	30
3.1.1.	Parasites.....	30
3.1.1.1.	Promastigotes .....	30
3.1.1.1.1.	Principe.....	30



3.1.1.1.2.	Méthodologie .....	30
3.1.1.2.	Amastigotes axéniques .....	30
3.1.1.2.1.	Principe.....	30
3.1.1.2.2.	Méthodologie .....	31
3.1.2.	Macrophages péritonéaux de souris Balb/c.....	31
3.1.3.	Cellules Thp-1 .....	31
3.2.	Essais biologiques.....	32
3.2.1.	Toxicité.....	32
3.2.1.1.	Evaluation des composés sur macrophages péritonéaux de souris Balb/c et/ou cellules Thp-1 différenciées .....	32
3.2.1.1.1.	Principe.....	32
3.2.1.1.2.	Méthodologie .....	32
3.2.1.1.3.	Evaluation de la toxicité des composés.....	32
3.2.1.2.	Evaluation des composés sur des cellules VERO, LLC_MK2 et Thp-1 .	33
3.2.1.2.1.	Principe.....	33
3.2.1.2.2.	Méthodologie .....	33
3.2.1.2.3.	Calcul de la $CI_{50}$ .....	33
3.2.2.	Activité leishmanicide.....	34
3.2.2.1.	Amastigotes axéniques .....	34
3.2.2.1.1.	Principe.....	34
3.2.2.1.2.	Méthodologie .....	34
3.2.2.1.3.	Calcul de la $CI_{50}$ .....	34
3.2.2.2.	Macrophages infectés .....	35
3.2.2.2.1.	Principe.....	35
3.2.2.2.2.	Méthodologie .....	35
3.2.2.2.3.	Infection des macrophages .....	35
3.2.2.2.4.	Composés à tester.....	35
3.2.2.2.5.	Coloration au Giemsa.....	36
3.2.2.2.6.	Evaluation l'activité leishmanicide des composés .....	36
3.3.	Annexes .....	37
3.3.1.	Technique de comptage à l'hémacytomètre (Annexe I) .....	37
3.3.2.	Extraction de macrophages péritonéaux de souris (Annexe II) .....	38
IV.	Résultats .....	39
4.1.	Article 1 .....	39
4.2.	Article 2 .....	47
4.3.	Article 3 .....	61
4.4.	Article 4 .....	66
4.5.	Données additionnelles :.....	72
V.	Discussions et perspectives .....	78
5.1.	Etude sur les extraits de plantes .....	78
5.2.	Étude sur des dérivés de quinoxalines .....	81
VI.	Conclusion.....	84
VII.	Bibliographie.....	86

# I. Les Leishmanioses

Sont regroupées sous le nom de Leishmaniose, un groupe de parasitoses tropicales qui demeure encore aujourd'hui un grave problème de santé publique à travers le monde malgré les avancées de la recherche.

Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde, comme la dengue et la trypanosomiase africaine. Ces maladies d'une part, sont émergentes et négligées et d'autre part, peuvent être opportunistes au cours du SIDA.

Cette parasitose, qui est provoquée par un Protiste Euglenobionte appartenant au genre *Leishmania*, constitue un spectre de maladies, pour l'Homme, allant de formes cutanées présentant des cicatrices à des formes défigurantes dénommées mucocutanées. Elles peuvent aussi être fatales, si non traitées, lorsqu'elles évoluent sous forme viscérale [1]. Ces parasites sont transmis par des insectes hématophages.

## 1.1. Historique

### 1.1.1. Dans l'Ancien Monde

#### 1.1.1.1. Leishmanioses tégumentaires

Les premières descriptions d'ulcérations cutanées de la face pourraient remonter au troisième millénaire avant notre ère. Avicenne, Xe siècle, pensait déjà que cette affection cutanée était due à une piqûre de moustique.

Les premiers cas correctement décrits de leishmanioses tégumentaires ou " bouton d'orient " le furent par Guilhou en 1833. En 1903, Wright étudia le parasite provenant d'une lésion d'un enfant arménien mais le parasite fut considéré comme une microsporidie. Il faut attendre 1908 pour que Nicolle et Sicre confirment que le parasite étudié par Wright était comparable au niveau morphologique avec celui décrit par Leishman-Donovan. Ce n'est qu'à partir des années 1970, grâce à l'analyse isoenzymatique, que furent identifiées les différentes espèces responsables des leishmanioses cutanées [2].

### **1.1.1.2. Leishmanioses viscérales**

Au cours du XIXe siècle, apparurent des épidémies sous le nom de " kala-azar " ou de fièvre " dum-dum " qui s'étendaient de la Grèce à l'Inde. A cette époque, les observateurs de ces épisodes de fièvres, pensaient qu'elles étaient dues à une forme de paludisme. A la fin du XIXe siècle, Sir Manson Patrick pensa que ces fièvres étaient plutôt dues à un trypanosomose du fait du manque d'activité de la quinine et du manque de régularité des périodes de fièvres. C'est en 1903, alors qu'il étudiait des trypanosomes chez un rat, que Sir William Leishman put observer des frottis de rate d'un soldat mort à Calcutta, pensant y voir des " corps en involution ". Durant la même année, Donovan put observer ces mêmes éléments provenant de ponctions de rates .Sir Ronald Ross créa le genre *Leishmania*.et c'est en leur honneur qu'apparu le taxon *Leishmania donovan* [2].

## **1.1.2. Dans le Nouveau Monde**

### **1.1.2.1. Leishmanioses tégumentaires**

Des céramiques précolombiennes, de la culture Moche, représentent des visages avec des lésions de la face et des déformations faciales (Figure 1).



Figure 1 : Photographie d'une céramique de l'art Moche (IV<sup>ème</sup>-VI<sup>ème</sup> siècle après J.-C.) représentant une femme atteinte de leishmaniose mucocutanée : le nez et la lèvre supérieure sont déjà presque totalement détruits. Pièce **ML002644a** du Museo Larco Lima – Pérou

C'est en 1911 que Vianna dénomma *Leishmania braziliensis* un parasite qu'il avait observé comme étant responsable de lésions cutanées et mucocutanées. Deux ans plus tard, la "Uta" fut déterminée comme étant une leishmaniose provoquant des ulcères cutanés par la Commission de Harvard. Dans la décennie des années 1950, Biagi détermina *L. braziliensis* comme étant responsable de la forme "espundia" et détermina *L. mexicana* comme étant responsable des ulcères de pavillon d'oreilles (ulcères des "chicleros"). A la même période, Floch décrivit *L. guyanensis* et Medina et Romero déterminèrent *L. pifanoi*. [2].

### **1.1.2.2. Leishmanioses viscérales**

En 1911, un brésilien, du nom de Carlos Chagas, découvrit dans la forêt amazonienne brésilienne des enfants présentant des splénomégalies et fut amené à penser qu'il était en présence de "kala-azar". Durant la première moitié du XXe siècle, des cas présentant des analogies tant au niveau clinique qu'épidémiologique, furent répertoriés dans pratiquement toute l'Amérique du Sud et Centrale. Cette espèce de *Leishmania* finit par prendre le nom de *chagasi* mais dans les années 1980, grâce aux déterminations par isoenzymes, il fut démontré que *L. chagasi* et *L. donovani* étaient les mêmes [2].

## **1.2. Protagonistes de la maladie**

### **1.2.1. Les parasites**

Les Leishmanioses sont des parasitoses provoquées par des protistes appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* et du genre *Leishmania*. Depuis la description par Ross en 1903, différentes classifications taxonomiques ont été proposées en s'appuyant sur divers critères comme l'aspect clinique de la maladie, la distribution géographique, les espèces réservoirs ou bien encore le comportement chez le hamster ou en milieu de culture "in vitro" [3-5]. De plus, grâce au développement d'outils moléculaires, d'autres critères biochimiques, immunologiques et de biologie moléculaire ont permis d'arriver à un consensus pour classer les *Leishmania* et leurs espèces [6, 7].

## La classification du genre de *Leishmania*

---

**DOMAINE** : *Eukaryota*

**RÈGNE** : *Excavata*

**EMBRANCHEMENT** : *Euglenozoa*

**CLASSE** : *Kinetoplastida*

**ORDRE** : *Trypanosomatida*

**FAMILLE** : *Trypanosomatidae*

**GENRE** : *Leishmania*

**SOUS GENRE** : *Leishmania* (L.) et *Viannia* (V.)

---

Les sous-genres de *Leishmania* furent décrits pour différencier le développement du parasite au niveau du tube digestif du vecteur et plus précisément au niveau du pylore.

Les parasites présentant une multiplication au niveau de l'intestin moyen et antérieur (suprasyplaria), sont caractérisés comme le sous-genre *Leishmania* tandis que les parasites se multipliant dans la partie postérieure (perispylaria puis remontant dans la partie antérieure) sont nommés *Viannia*.

Bien que le genre *Leishmania* soit composé de plusieurs espèces, qui d'un point de vue purement morphologique sont plus ou moins similaires, celles-ci sont capables de causer différentes formes cliniques de leishmaniose plus ou moins grave. On regroupe les espèces de *Leishmania* en " complexes " selon des critères biochimiques similaires (Tableau 1).

Sous-genre	<i>Leishmania</i>	Espèces
Complexe	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> ; <i>L. donovani</i> ; <i>L. infantum</i> ; <i>L. chagasi</i>
Complexe	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> ; <i>L. killicki</i>
Complexe	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
Complexe	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
Complexe	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. pifanoi</i> ; <i>L. garhami</i> ; <i>L. venezuelensis</i> Non pathogène pour l'homme
Ancien Monde		<i>L. gerbili</i> ; <i>L. arabica</i>
Nouveau Monde		<i>L. aristidesi</i> ; <i>L. enrietti</i> ; <i>L. hertigi</i> ; <i>L. deanei</i>
Sous-genre	<i>Vianna</i>	
Complexe	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. peruviana</i>
Complexe	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i> Classement non définitif
		<i>L. lainsoni</i>

Tableau 1 : taxonomie des leishmanies (OMS, 1990)

### 1.2.2. Les vecteurs

Les phlébotomes (Figure 2) sont des insectes diptères de la famille de *Psychodidae* et de la sous-famille des *Phlebotominae*. Ce sont des petits insectes (2 à 5 mm de long) dont l'activité maximale est crépusculaire. Il existe une relation entre la transmission des espèces de *Leishmania* et l'espèce du vecteur [8]. De plus, la distribution des vecteurs dépend aussi de la niche écologique où ils se situent (altitudes, climats, température et pluviométrie) [9].

Le genre *Phlebotomus* est responsable de la transmission des *Leishmania* de l'Ancien Monde tandis que l'on impute au genre *Lutzomya* la transmission des *Leishmania* du Nouveau Monde. Il existe 700 espèces de phlébotomes parmi lesquelles une trentaine seraient de possibles vecteurs [10].

Ces sont les femelles qui transmettent les parasites lors de leurs repas sanguins qui leurs sont nécessaires pour se reproduire.



Figure 2: Repas sanguin du phlébotome femelle [11].

### 1.2.3. Les hôtes

Les Leishmanioses sont majoritairement des zoonoses, c'est-à-dire des maladies transmises par des animaux. Les mammifères sauvages (rongeurs, marsupiaux, paresseux, primates ou canidés) sont des réservoirs primaires et ne montrent pas généralement les signes évidents de l'infection. Les mammifères domestiques (canidés) sont des réservoirs secondaires. Quand, par ses activités, l'Homme se met en contact avec le cycle primaire de transmission animal-vecteur, il devient un hôte accidentel. En Inde, il existe également des cas où l'Homme est un hôte obligatoire, on parle alors d'anthroponose stricte (Figure 3).

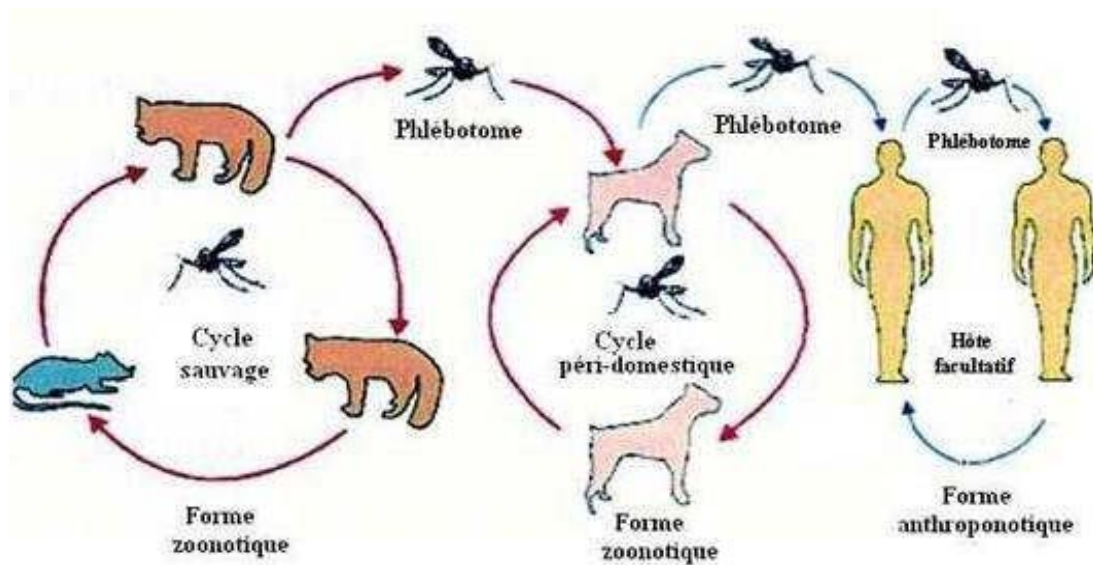


Figure 3 : Cycle épidémiologique de la leishmaniose [Unanleon].

### 1.3. **Biologie des Leishmania**

#### 1.3.1. **Organisation cellulaire de *Leishmania***

Appartenant à l'ordre des Kinetoplastidae, les *Leishmania* possèdent un kinétoplaste situé entre le flagelle et le noyau et qui contient deux types de molécules d'ADN, les maxi-cercles codant pour des ARN guides et ribosomiques et les mini-cercles intervenant dans l'insertion/délétion de l'uridine de l'ARN [12]. Elles possèdent également un noyau, un appareil de Golgi, un flagelle et une poche flagellaire. Dans la membrane plasmique sont présents des glycolipides, des protéines membranaires et des glycoinositol-phospholipides [13].

### 1.3.2. Le dimorphisme des *Leishmania*

Les *Leishmania* sont des parasites hétéroxènes, possédant deux hôtes différents. Elles présentent deux formes morphologiques caractéristiques au cours de leur cycle de vie : une forme dite promastigote que l'on retrouve au niveau du vecteur Phlébotome et une forme dite amastigote qui se développe au niveau des macrophages chez l'hôte mammifère [14]. (Figure 4)

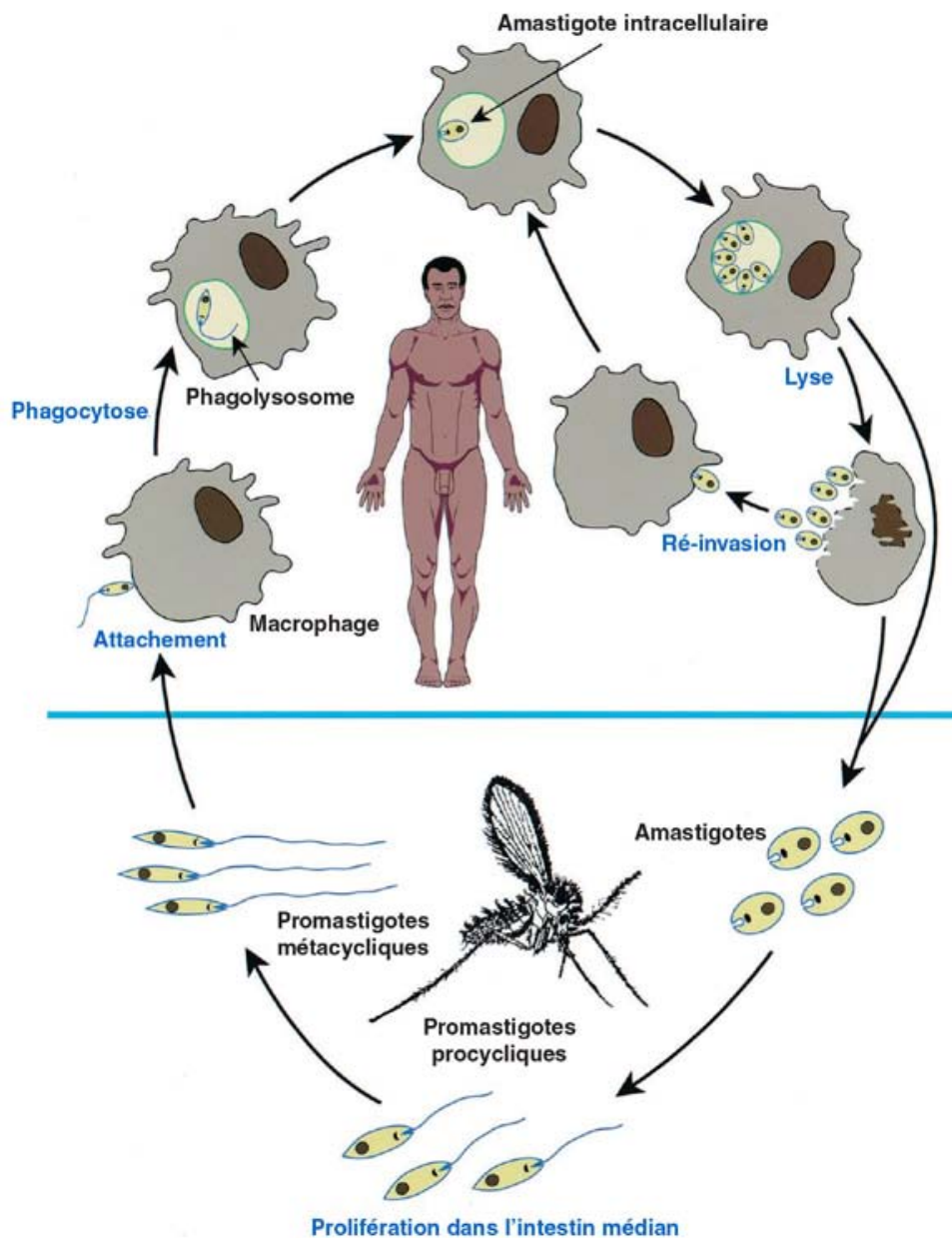


Figure 4 : Cycle biologique du parasite [15]



### 1.3.2.1. Les promastigotes

Sous cette forme, le parasite est mobile, extracellulaire et fusiforme, prolongé par un flagelle et peut mesurer de 5 à 20  $\mu\text{m}$ . La forme promastigote présente différents stades de développement dépendant du lieu et du temps passé dans le système digestif du vecteur. (Figure 6 a, page suivante)

Lors de son repas sanguin, la femelle Phlébotome peut ingérer des parasites présents dans des macrophages infectés. Les macrophages seront lysés au niveau du tractus digestif du vecteur et les amastigotes ainsi libérés vont pouvoir se différencier en promastigote au bout de 24 heures. Cette forme dite procyclique va s'attacher aux cellules épithéliales de la membrane péritrophique. Ce promastigote, qui à ce stade n'est pas infectieux, va prendre une forme plus fuselée appelée nectomonade. Vers le 3<sup>e</sup> jour après l'ingestion, les nectomonades vont se diviser par scissiparité et vont aller se fixer sur les microvillosités de l'intestin médian abdominal avant de remonter l'intestin médian thoracique.

Cette ascension du tube digestif et l'acidification du milieu font que les nectomonades, entre le 5 et 7<sup>e</sup> jour, vont arriver à maturité et réaliser leur métacyclogenèse, c'est-à-dire, devenir infectieux. Ils ne pourront donc plus se diviser et finiront de migrer vers le proboscis pour être injectés par l'insecte lors du prochain repas sanguin [2]. (Figure 5)

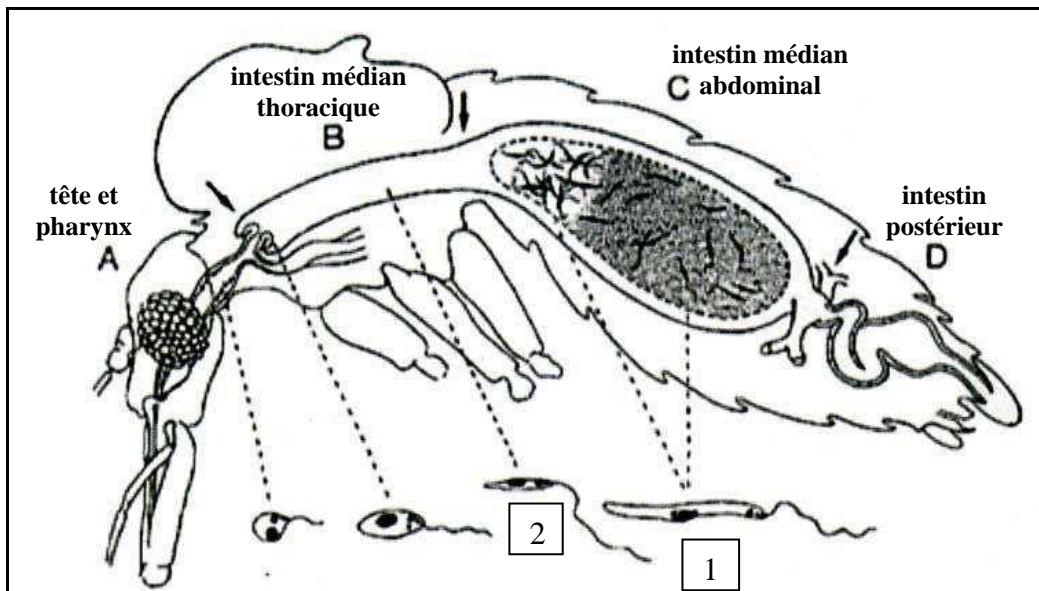


Figure 5 : Processus de différenciation au niveau de tube digestif chez le vecteur.

Le sang (zone grise en C) (1 : promastigote nectomonade, 2 : promastigote métacyclique) est entouré par la membrane péritrophique. [16]

### 1.3.2.2. Les amastigotes

Cette forme du parasite qui est sphérique (2 à 5 µm de diamètre en moyenne), est la forme intracellulaire que l'on retrouve chez l'hôte mammifère. (Figure 6 b)

Lors de l'introduction des promastigotes métacycliques, ceux-ci vont être phagocytés par les macrophages dermiques grâce à la présentation de molécules de surface qui vont alors déclencher son internalisation par le macrophage ; par exemple le lipophosphoglycane de *L. major* interagit avec des intégrines de surface du macrophage tandis que l'activité protéasique de la protéine gp 63 de *L. mexicana* favorise l'activation de la voie alterne du complément. Cette internalisation du parasite et les changements environnementaux qu'il subit (passage d'un milieu aérobie à anaérobie, d'un pH physiologique à un pH acide) vont induire la différenciation du parasite au stade amastigote.

En moins de 24 heures, les promastigotes vont se transformer en amastigotes à l'intérieur de la vacuole parasitophore mais il leur faudra 3 à 7 jours pour achever ce processus.

L'amastigote va donc être capable de résister aux hydrolases lysosomales grâce, par exemple, à des protéines, telle que la hsp 70, qui lui permettent de résister à la flambée oxydative déclenchée lors de son entrée dans le macrophage.

Une fois différenciés, les parasites se divisent par fission binaire jusqu'à provoquer l'éclatement du macrophage puis se répandent par phagocytose de macrophage à macrophage [14, 17]

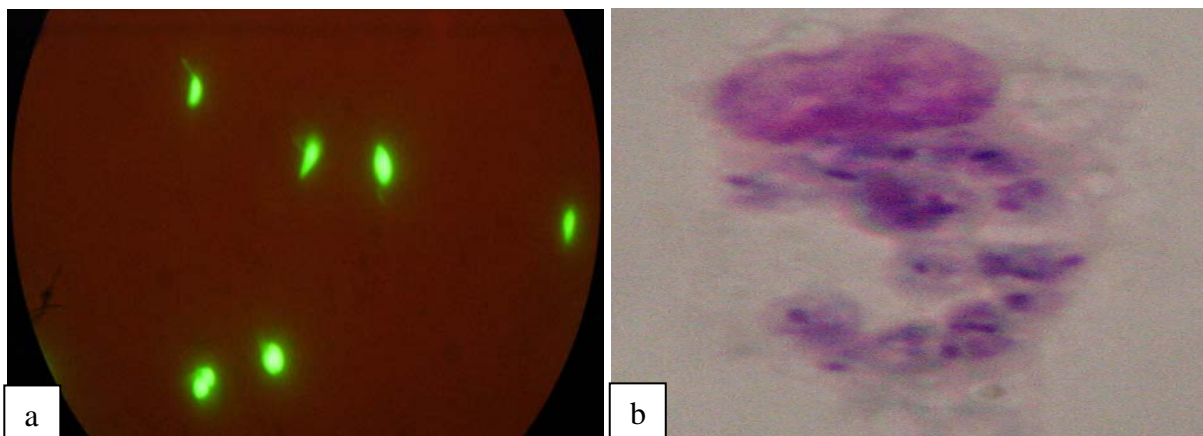


Figure 6 : stages cellulaires de *Leishmania*.

A gauche, formes promastigotes chez l'insecte (photo en microscopie optique après coloration au réactif de Kovacks).

A droite, formes amastigotes intramacrophagiques de *L. peruviana* (photo en microscopie optique après fixation au méthanol et coloration au Giemsa).

## 1.4. Distribution des Leishmanioses de la part le monde

### 1.4.1. Les chiffres

Cette maladie s'étend sur 88 pays, dont 72 se trouvent être des pays en voies de développement et 13 des pays dit sous-développés. Globalement, la population à risque représente 350 millions de personnes avec une prévalence de plus de 14 millions de personnes atteintes et quelques 2 millions de nouveaux cas par ans. L'UNICEF (2003-2004) précise que 60% sont des femmes.

L'O.M.S, déplore 500 000 cas de leishmaniose viscérale à travers 61 pays mais 90% des cas se trouvent confinés au Bangladesh, au nord-est du Brésil, en Inde (plus particulièrement dans l'état du Bihar), au Soudan et au Népal. 1 million à 1,5 millions de cas de leishmaniose cutanée sont reportés et 90% des cas se trouvent dans 8 pays, 6 de l'Ancien Monde (Afghanistan, Algérie, Arabie Saoudite, Iran, Iraq et la Syrie) et 2 du Nouveau Monde (Brésil et Pérou). La répartition de la leishmaniose mucocutanée est concentrée sur 3 pays du Nouveau Monde (Bolivie, Brésil et Pérou) qui a eux seuls présentent 90% des cas [18, 19]. (Figure 7).

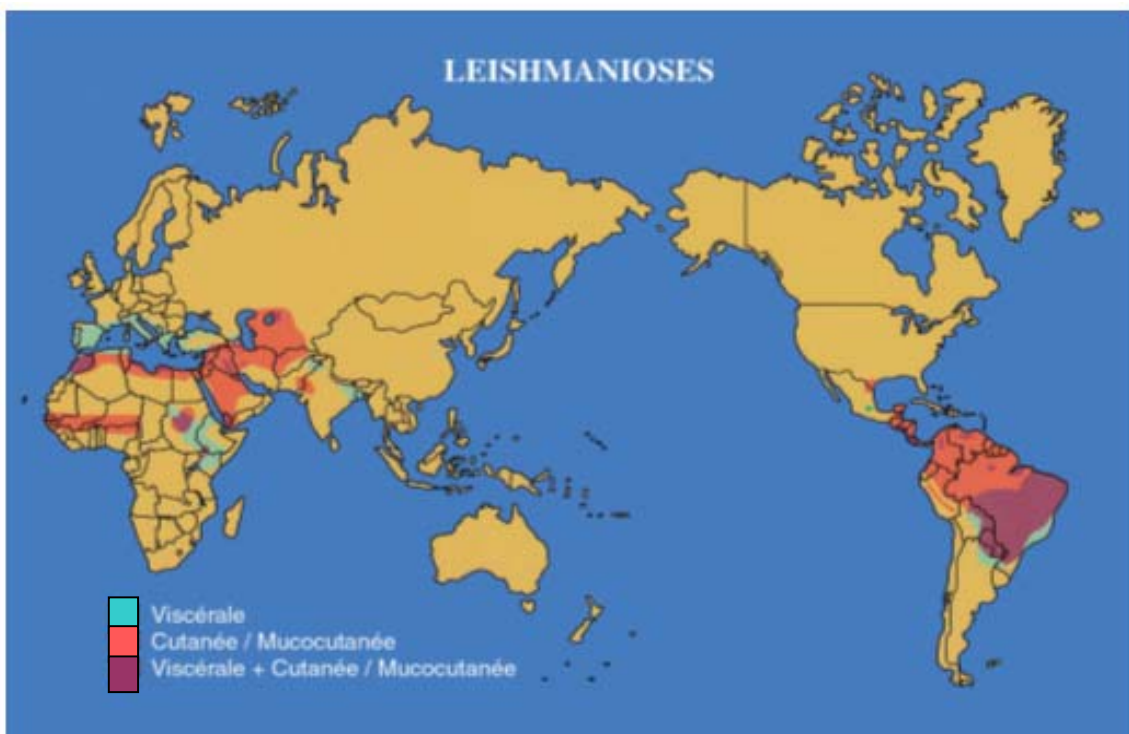


Figure 7 : Régions endémiques des leishmanioses cutanée, mucocutanée et viscérale [15].

### 1.4.2. Co-infection VIH/*Leishmania*

Depuis 1993, les régions endémiques de *Leishmania* se sont étendues considérablement. Cela est dû à deux facteurs déterminants qui sont le développement économique dans les zones à risque mais surtout l'augmentation de l'incidence des co-infections entre VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et les Leishmanioses, principalement la leishmaniose viscérale [20, 21]. En effet, la séropositivité au VIH provoque une immunodépression permettant d'avoir un terrain plus propice au développement des Leishmanioses. On retrouve également des états d'immunodépression dans le cadre des traitements par des immunosuppresseurs lors de transplantation, de traitement de cancer, de parasitose ou de malnutrition, ceci peut conduire à une réactivation de la maladie [22]. (Figure 8)



Figure 8 : Distribution des cas de co-infection VIH/*Leishmania* [23].

## 1.5. Réponses immunologiques chez l'hôte vertébré

Les Leishmanioses se caractérisent par un spectre clinique de phénotypes différents qui dépend de la réponse immune de la part de l'hôte pouvant aller de lésions à cicatrisation spontanée jusqu'à destruction des muqueuses.

Lors de l'infection, l'immunité innée naturelle va être activée mais rapidement la réponse immunitaire précoce non-adaptative va prendre le relais des cellules NK (naturelles-tueuses). S'en suit l'activation des lymphocytes T naïfs par la présentation de molécules du Complexe Majeur Histocompatibilité (CMH) par les cellules dendritiques. C'est à partir de ce moment là qu'une dichotomie apparaît au niveau de la réponse à médiation humorale : la survie du parasite apparaît avec la production d'interleukines 4, 10, et 13 (IL-4, IL-10 et IL-13) par les cellules Th2 alors qu'une protection est quant à elle définie par la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  et conduit à la mort du parasite. (Figure 9) [19, 24]

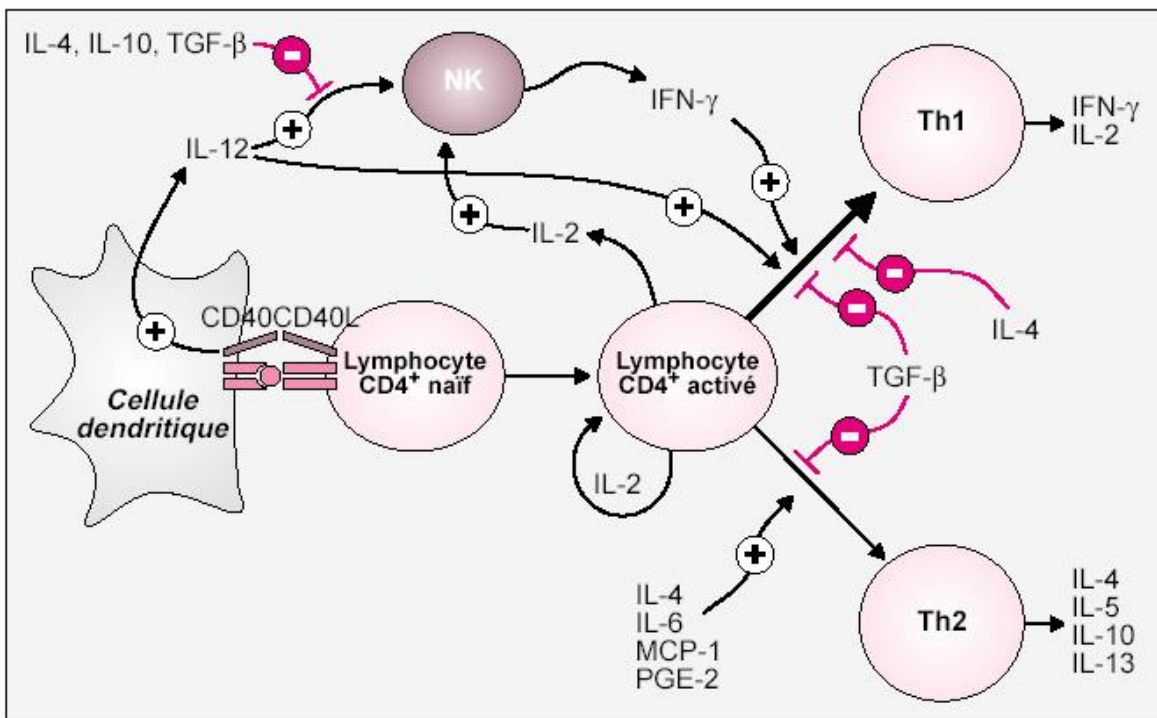


Figure 9: Différenciation des lymphocytes T CD4+.

Une fois activé, le lymphocyte CD4+ va se diriger soit vers la voie Th1 (en haut), soit vers la voie Th2 (en bas) [25].

La figure 10 présente un modèle simplifié de la réponse immunologique lors d'une infection par *Leishmania*.

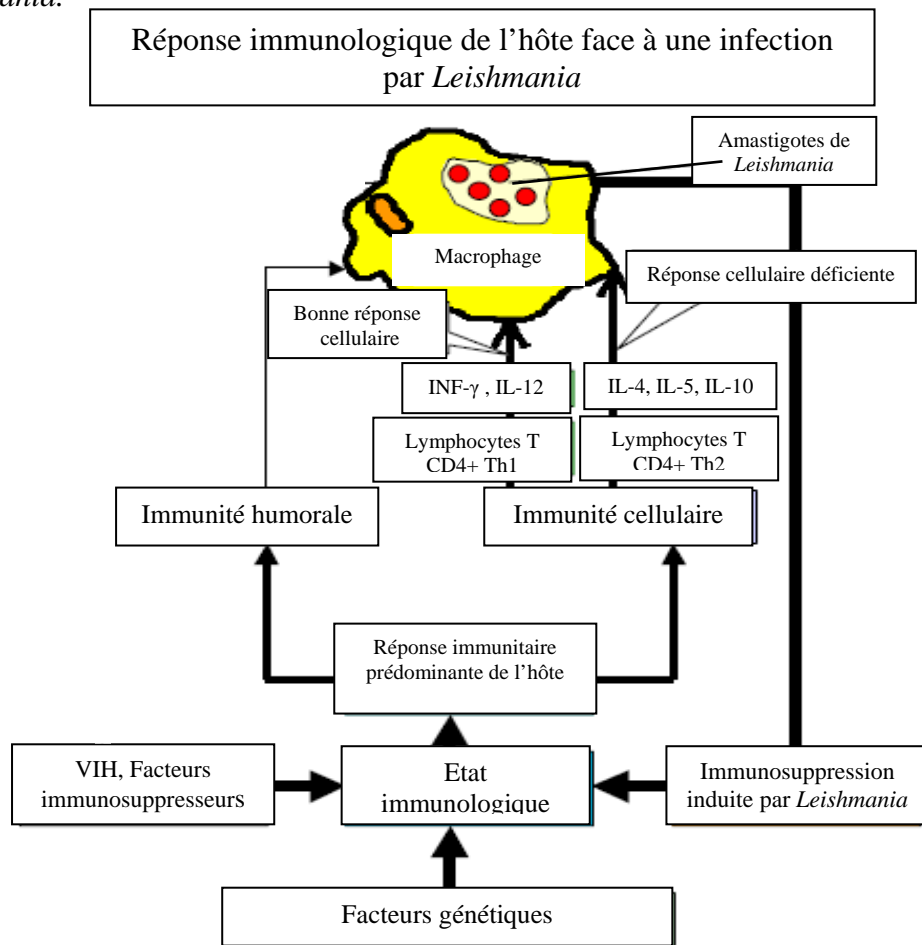


Figure 10 : Modèle de la relation infection-état immunologique[26].

## 1.6. Les formes clinique de la maladie chez l'Homme

Comme nous venons de le décrire, chez l'Homme, la réponse immunitaire est une clé importante pour le développement de la maladie. Les différences des cas cliniques sont associées aux différentes espèces de *Leishmania* et à l'état immunologique du patient [14]. Deux groupes de manifestations symptomatiques peuvent être décrits, l'un présentant la leishmaniose viscérale et l'autre regroupant les formes tégumentaires dans lesquelles le parasite reste localisé au niveau de la peau et des muqueuses ; celui-ci comprend les formes de leishmaniose cutanée, cutanée diffuse et mucocutanée.

### 1.6.1. Leishmaniose viscérale (LV)

Elle est appelée kala-azar ou " fièvre noire ", c'est elle qui représente la forme la plus grave de la maladie. En absence de traitement, la LV est mortelle. Lors de la piqûre par le phlébotome,

les parasites migrent via le système sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et le foie. Sa clinique se caractérise globalement par une inflammation du foie et de la rate, ce qui provoque une hépato-splénomégalie, une distension abdominale sévère, une perte de poids importante et une anémie.

La mort survient en général au bout de 6 mois à quelques années suivant la progression de l'infection [24]. (Figure 11)

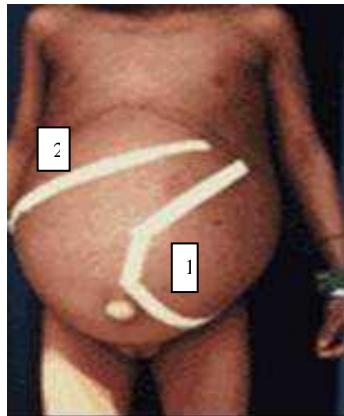


Figure 11 : Enfant atteint de leishmaniose viscérale  
((1) inflammation de la rate, (2) inflammation du foie)

### 1.6.2. Leishmaniose cutanée (LC)

Autrefois connu comme le " bouton d'Orient ", la LC peut provoquer des lésions cutanées présentant, sur le site de piqûre, une papule prurigineuse. S'en suit une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme qui conduit à une ulcération. Ces ulcères sont généralement circulaires avec des bords bien délimités qui ont une couleur violacée. Ils se recouvrent d'une mince croûte et évoluent vers une forme dite " humide " (comme l'" Uta ") ou " sèche ". Ces lésions sont généralement indolores mais laissent après cicatrisation, de profondes cicatrices non pigmentées [2, 19, 24, 27]. (Figure 12)



Figure 12: Lésion d'une LC (Dr. Abelardo Tejada. U.N.M.S.M. Lima, Pérou).

### **1.6.3. Leishmaniose cutanée diffuse (LCD)**

C'est une forme qui ne guérit pas spontanément, même après un traitement. Elle est caractérisée par la dissémination de lésions nodulaires qui sont riches en parasites et qui forment de large plaques infiltrées qui ressemblent fortement à des formes léproïdes. Cette forme de leishmaniose est présente généralement chez des personnes ayant une insuffisance immunitaire [2, 19, 24]. (Figure 13)



Figure 13: Lésion d'une LCD (Dr. Llanos-Cuentas. I.M.T-AvH. Lima, Pérou).

### **1.6.4. Leishmaniose mucocutanée ou cutanéomuqueuse (LCM)**

C'est une leishmaniose particulière à l'Amérique du Sud et Centrale. Elle est connue comme " espundia ". En général, l'affection évolue en deux temps : une apparition d'ulcères cutanés totalement identiques à ceux présentés lors d'une LC finissant par cicatriser entre 6 mois et 1 an, suivie ou concomitante d'une seconde infection de la muqueuse nasale. Celle-ci pourra conduire à une destruction partielle ou étendue des muqueuses du nez, de la bouche ou de la gorge. Ses lésions nécrosées pourront donc être surinfectées par des affections bactériennes pouvant engendrer de grandes difformités faciales et plaçant les malades au centre de discriminations socioculturelles importantes [2, 19, 24, 28]. (Figure 14)



Figure 14 : Lésions mucocutanées (Dr M. T. Ruiz. Hospital Antonio Lorena. Cusco, Pérou).



## **1.7. Traitement des Leishmanioses**

### **1.7.1. Traitement de première intention**

Les traitements de premières intentions font appel à des sels d'antimoine : le **N-méthyl glucamine** (Glucantime®) et le **stibogluconate de sodium** (Pentostan®) dont les teneurs en antimoine pentavalent ( $Sb^V$ ) sont respectivement de 8,5% (85 mg/mL) et 10% (100 mg/mL). Les principaux problèmes liés à ces traitements sont le prix (de 100 à 150 US\$) et leur accès. Ils se présentent en effet sous forme d'ampoules injectables et nécessitent un promoteur de santé pour les administrer. Au Pérou, la dose prescrite de  $Sb^V$  est de 20 mg/Kg/jour, la même que préconise l'O.M.S. A cette dose, le  $Sb^V$  peut provoquer des problèmes de santé comme la cardio-toxicité et la néphro-toxicité. Du fait de cette toxicité, il est recommandé d'évaluer l'état cardiaque, rénal et hépatique du patient avant et durant le traitement. Le traitement est proscrit pour les femmes enceintes. De plus, certaines souches de *Leishmania* responsables de leishmaniose cutanée et mucocutanée ont démontré des résistances à ces médicaments [29]. Ces produits ont une action inhibitrice sur la formation de l'ATP et nécessitent une conversion intracellulaire en  $Sb^{III}$  (antimoine trivalent) pour être actif. Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite, enzyme présente seulement chez le parasite [30].

### **1.7.2. Traitement de seconde intention**

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'**amphotéricine B** ou de la **pentamidine**. Pour le moment, aucune résistance n'a été rapportée lors de l'utilisation d'amphotéricine B. C'est un puissant antifongique capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux mais aussi capable de stimuler la production d'IL en agissant sur les récepteurs Toll-like [31].

La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasitaire et se fixe sur l'ARN de transfert. Il semblerait que la cible de la pentamidine soit un composant de la mitochondrie [32, 33]. Cependant, en Inde, la pentamidine n'est plus efficace. Cela suggère que les parasites sont devenus résistants [34].

Ces médicaments présentent une toxicité supérieure à celle des sels d'antimoine et nécessitent une prise en charge hospitalière. Le traitement coûte entre 60 et 70 US\$ sans prendre en compte le coût de l'hospitalisation. Le traitement par **AmBisome**, amphotéricine B

liposomale, moins toxique, ne présente quasiment pas d'effet secondaire mais coûte trop cher dans les pays en développement (1500 US\$ ou plus) [18].

### 1.7.3. Nouveaux traitements

De nouveaux produits ont montré récemment des résultats très intéressants, notamment la **miltéfosine** dont le mode d'action n'est pas encore totalement déterminé mais qui laisse supposer une action sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine [35]. L'avantage de ce médicament est qu'il permet un traitement oral (2,5 mg/kg/jour) avec des effets secondaires négligeables et présente des taux de réussite allant de 71% (Bolivie) jusqu'à au-delà de 90% (Colombie 94%, Inde 98%) [36, 37]. Néanmoins, il a été démontré que la miltéfosine n'était pas active contre les *L. (V.) braziliensis* et *L. (V.) guyanensis* [38].

Généralement, la miltéfosine est employée contre les LV. Le coût d'un traitement par miltéfosine avoisine les 150 US\$, ce qui en fait encore un médicament difficile d'accès aux populations les plus pauvres [18].

La **sitamaquine** qui est un analogue de la primaquine, est administrée par voie orale. Des essais cliniques en phase II ont démontré différents résultats contre la LV. Au Brésil, il a été démontré que le composé n'avait aucune efficacité et était néphrotoxique pour des doses supérieures à 2,5 mg/kg/jour alors qu'au Kenya ou en Inde le taux d'efficacité était supérieur à 83% [36, 39, 40].

L'**imiquimod** est une quinoline qui induit la production d'oxyde nitrique. Il est normalement utilisé contre les verrues génitales sous forme de crème. Une activité antileishmanienne a été démontrée " *in vivo* " sur des modèles de souris [41]. Ce médicament a été testé topiquement en combinaison avec des sels d'antimoine et a démontré un gain de temps de cicatrisation pour les patients atteints de LC [36]. De plus, un essai clinique en phase I a été complété au sein de l'institut Von Humboldt à Lima par le docteur Llanos-Cuentas. Cette phase I a montré que pour des patients atteints de leishmaniose cutanée qui n'ont pas répondu au traitement classique d'antimoniaux, une combinaison avec l'imiquimod augmentait le taux de guérison des infections dues à *L. (V) braziliensis* et *L. (V) peruviana* [42, 43].

La **paromomycine**, un antibiotique aminoglycosidique, a démontré son efficacité en combinaison avec des antimoine par voie parentérale [44]. De plus, des formulations sous forme de crème mélangée avec la gentamicine ont démontré un taux d'efficacité de 64% en Colombie [35].

La Figure 15 présente l'ensemble des molécules utilisées pour lutter contre les Leishmanioses.

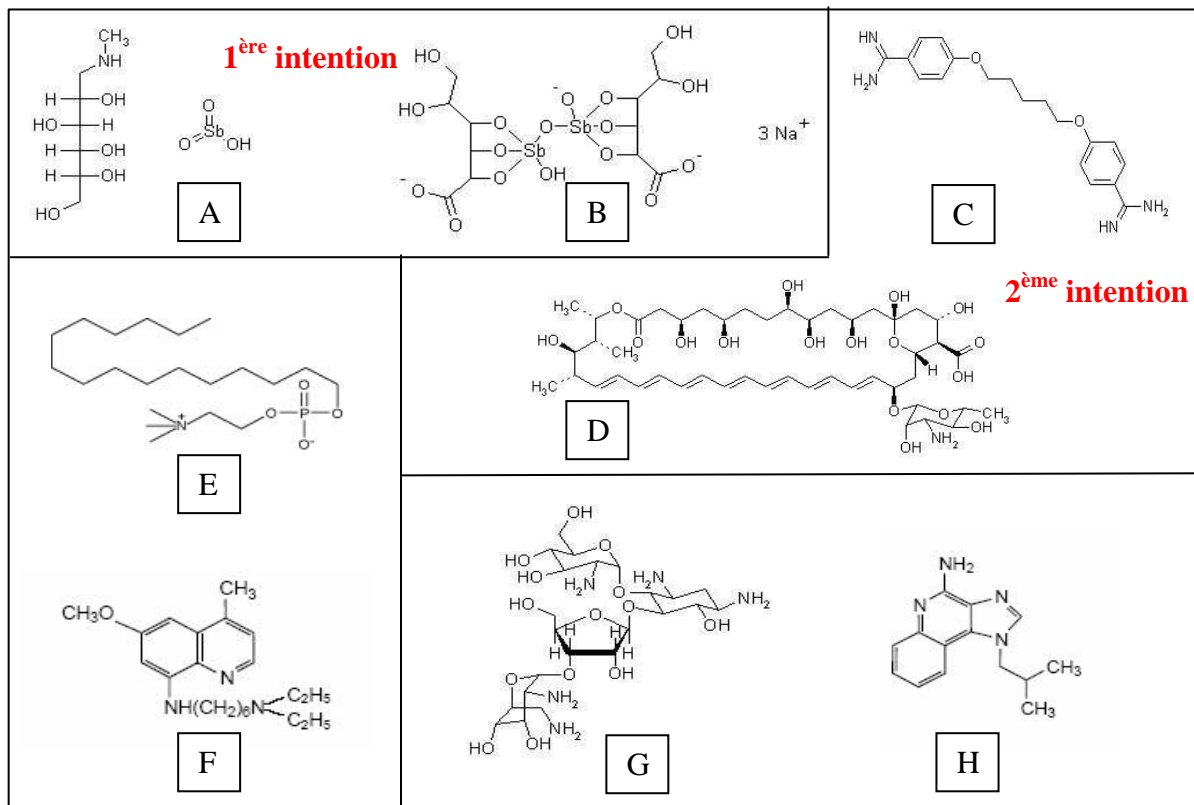


Figure 15 : Structures des différents médicaments utilisés actuellement :  
 A : Glucantime® ; B : Stibogluconate de Sodium ; C : Pentamidine iséthionate ; D : Amphotéricine B ; E : Miltéfosine ; F : Sitamaquine ; G : Paromomycine ; H : Imiquimod.

Les Leishmanioses sont des **parasitoses** transmises par un **vecteur**, réparties sur **88 pays** de la zone tropicale à sub-tropicale. Leur incidence annuelle est de **2 millions** de cas incluant les **4 formes de Leishmanioses**. L'**état immunologique** du malade et la **variabilité des espèces de *Leishmania*** sont à l'origine de **différentes expressions** cliniques de la maladie.

D'importants problèmes de logistique limitent l'**accès au traitement** dû à l'éloignement des centres de santé, l'**absence** ou le peu de moyen de **transport** et un traitement **coûteux** qui ne permet pas un suivi complet.

Dans ces conditions, la progression de la maladie et l'apparition de **pharmaco résistance** font augmenter la **morbidité et la mortalité**[45].

Il est donc nécessaire de chercher des **moyens de lutte** adéquate afin de permettre un **accès** plus simple aux **médicaments** pour les personnes infectées.

## II. Problématique

J'ai effectué la partie pratique de ma thèse au Pérou, dans le laboratoire de parasitologie cellulaire du LID (Laboratorio de Investigacion y Desarrollo) dirigé par le Pr. Jorge Arevalo ; au sein de l'UPCH (Universidad Peruana Cayetano Heredia) dans le cadre d'une convention avec l'UMR-152 (IRD/UPS Toulouse III) " Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox ".

Le thème de ma thèse s'est articulé autour d'un des projets de l'UMR qui est la recherche de substances d'origine naturelle à activités biologiques afin de lutter contre les maladies parasitaires telles que le paludisme ou les Leishmanioses.

Les différentes cultures de l'Amazonie et la considérable diversité de substances naturelles issues de la biodiversité tropicale d'Amérique du Sud peuvent être mises à profit pour caractériser des nouvelles molécules présentant des propriétés antiparasitaires intéressantes. En effet, la grande diversité de plantes existantes et la connaissance de leurs effets par les communautés natives font de l'Amazonie un réservoir infini de molécules pouvant servir de tête de file à l'élaboration de nouveaux médicaments [46]. Le Pérou est un pays où la biodiversité végétale, en termes d'endémicité, atteint 210 espèces pour 10000 km<sup>2</sup>. (Figure 16).

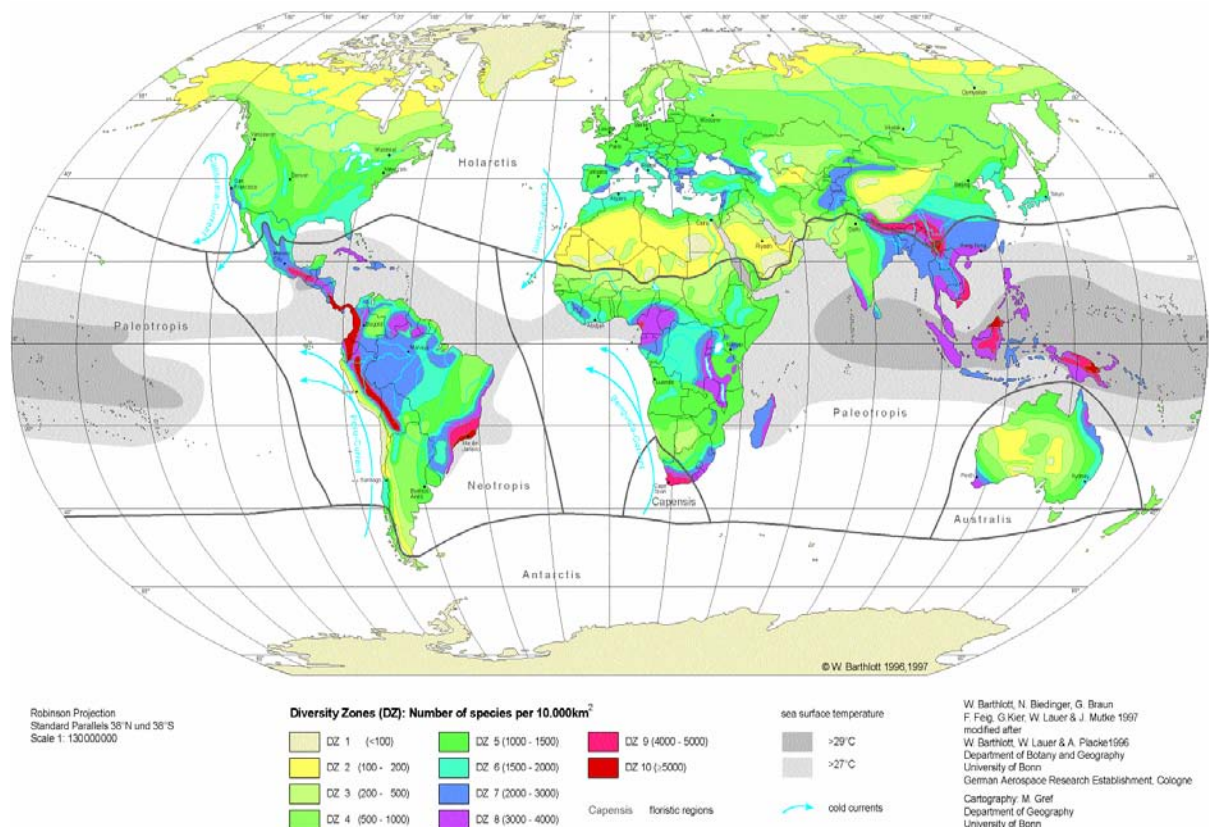


Figure 16 : Carte de la biodiversité du nombre d'espèces de plantes vasculaires [47]

La recherche de molécules bioactives ou de métabolites secondaires à travers des produits naturels commence par une étude de terrain en zone endémique de Leishmaniose afin de pouvoir collecter des plantes utilisées en médecine traditionnelle, susceptibles de présenter une activité antiparasitaire.

Cette étude ethnopharmacologique c'est faite en collaboration avec deux ethnies amazoniennes péruviennes situées l'une au nord-est de la cordillère des Andes et l'autre au centre-est dans la cordillère centrale afin d'avoir un plus large panel de plantes candidates. (Figure 17)



Figure 17 : terrains d'études ethnopharmacologiques.

La seconde partie de l'étude s'effectue en laboratoire, où la recherche de molécules bioactives dans l'extrait brut de plantes se fait par fractionnement bioguidé en suivant l'activité antiparasitaire.

Les premiers essais de criblage d'activité antileishmanienne ont été effectués sur des cultures d'amastigotes axéniques. Afin de déterminer la cytotoxicité des composés actifs, des essais

sur différentes cellules à différentes concentrations ont aussi été menés. Cela nous a permis de déterminer les doses à utiliser afin de mesurer leur action sur la réduction du taux d'infections de macrophages péritonéaux de souris infectées par différentes espèces de *Leishmania* endémiques du Pérou : *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* et *L. (V.) peruviana*.

## **2.1. Terrain d'étude : le Pérou**

Au Pérou, la Leishmaniose représente un important problème de santé publique du fait de sa portée tant au niveau psychologique et socioculturel qu'au niveau économique [26, 28]. En effet, la surface d'endémie de la maladie occupe 74% du territoire et touche 12 départements, c'est la deuxième maladie endémique de type tropicale et la troisième cause de mortalité par des maladies transmissibles après le paludisme et la tuberculose [48].

C'est un pays où, pour le moment, aucun cas de leishmaniose viscérale n'a été détecté mais où il existe un risque d'entrée par le Brésil et la Bolivie. Seules les 3 formes tégumentaires sont présentes dans le pays.

### **2.1.1. Distribution géographique des Leishmanioses**

#### **2.1.1.1. Espèces de *Leishmania***

Au Pérou, il existe au moins 4 espèces dans la région amazonienne. *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* et *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni* sont responsables de leishmaniose cutanée ou mucocutanée qui est connue comme leishmaniose "selvatique" ou "espundia" laquelle est la plus importante dans la zone.

La leishmaniose cutanée andine ou "Uta" est causée par *L. (V.) peruviana* qui est une forme endémique se trouvant généralement à une altitude comprise entre 800 et 3000 m, mais des cas peuvent être présents jusqu'à 600 m. Cette espèce se retrouve jusqu'à la latitude 13° Sud et ne se transmet pas dans la zone amazonienne [26, 49]. (Figure 18)

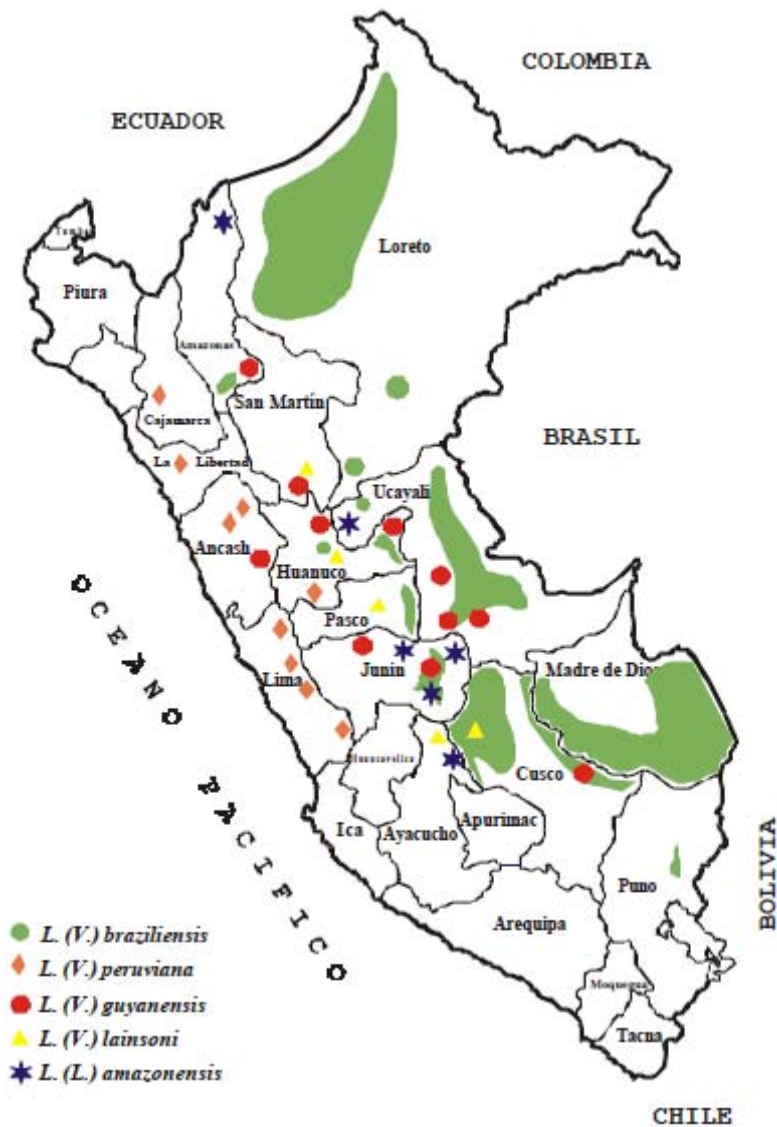


Figure 18: Distribution géographique des Espèces de Leishmania au Pérou [50].

### 2.1.1.2. Espèces de *Lutzomya*

La variété d'espèces de *Lutzomya* est très grande dans les aires endémiques. Dans les secteurs andins, l'espèce prédominante est *Lutzomya peruensis* ; cette espèce est considérée comme un vecteur "d'Uta" avec *Lu. verrucarum* et *Lu. ayacuchensis* (Figure 18). Ce sont des vecteurs généralement anthropophiles et endophiles. Il a été démontré que *Lu. peruensis* et *Lu. verrucarum* ont la même fréquence de distribution durant l'année mais *Lu. peruensis* domine pendant les trois mois de saison pluvieuse [51]. (Figure 19)

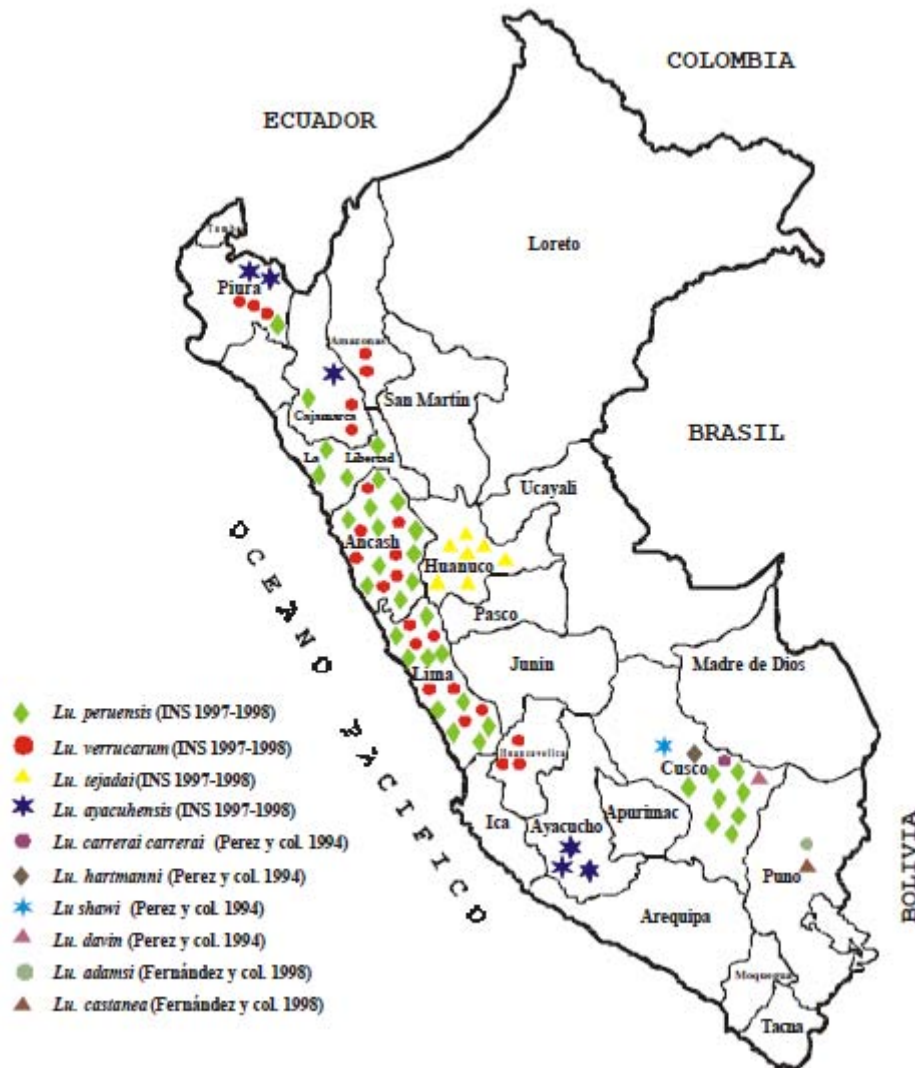


Figure 19: Distribution géographique des Espèces de *Lutzomya* au Pérou [48].

Les mêmes espèces de Phlébotomes qui s'attaquent à l'Homme (espèces anthropophiles) peuvent aussi présenter une grande affinité pour le Chien, ce schéma se présente dans une transmission intra domiciliaire en ayant comme source d'infection le Chien et/ou l'Homme.

### 2.1.1.3. Espèces réservoirs

Une vaste variété d'animaux sauvages et domestiques ont été impliqués comme réservoirs des espèces de *Leishmania* du Nouveau Monde. En général, il existe une relation étroite entre les vecteurs d'une espèce d'un parasite déterminé et leurs animaux réservoirs. Dans quelques cas,



les mêmes espèces de Phlébotomes et de Mammifères servent comme vecteurs et réservoirs d'une espèce de *Leishmania* donnée, à travers un cadre géographique avec d'autres parasites. Dans les secteurs andins, le chien domestique (*Canis familiaris*), un opossum (*Didelphis albiventris*) et une variété de petits rongeurs qui inclut le rat (*Rattus rattus*), *Akodón mollis* et *Phyllotis andinum*, entre autres, sont naturellement infectés. Des parasites isolés de l'Homme et de *Rattus rattus* appartiennent à la même espèce. Quant à ce qui est des réservoirs dans les secteurs forestiers, rien n'a été encore confirmé [52].

## 2.1.2. Situation épidémiologique

### 2.1.2.1. Leishmaniose cutanée

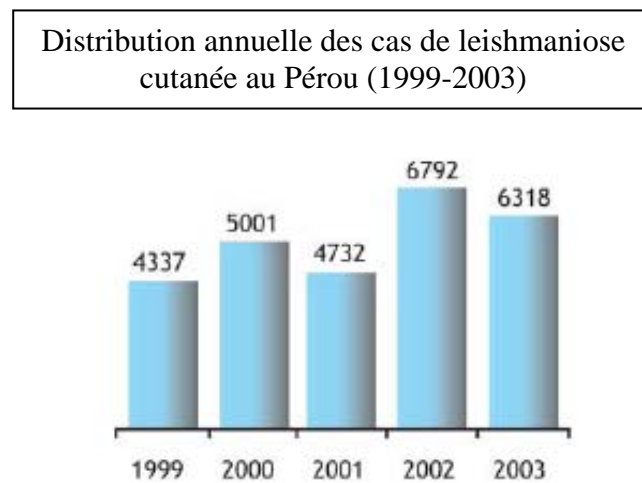


Figure 20 : graphique représentant la situation épidémiologique de la Leishmaniose cutanée au Pérou.

Les cartes ci-dessous présentent l'incidence accumulée des cas de leishmanioses cutanées et mucocutanées pour l'année 2003.

Les vallées inter-andines occidentales et la forêt amazonienne représentent les aires de plus grand risque pour les leishmanioses cutanées (Figure 21). Au niveau des cas de leishmaniose mucocutanée, la majorité proviennent de la forêt amazonienne. (Figure 23) Le Pérou présente plus de cas de leishmaniose cutanée que mucocutanée. (Figure 20 et Figure 22)

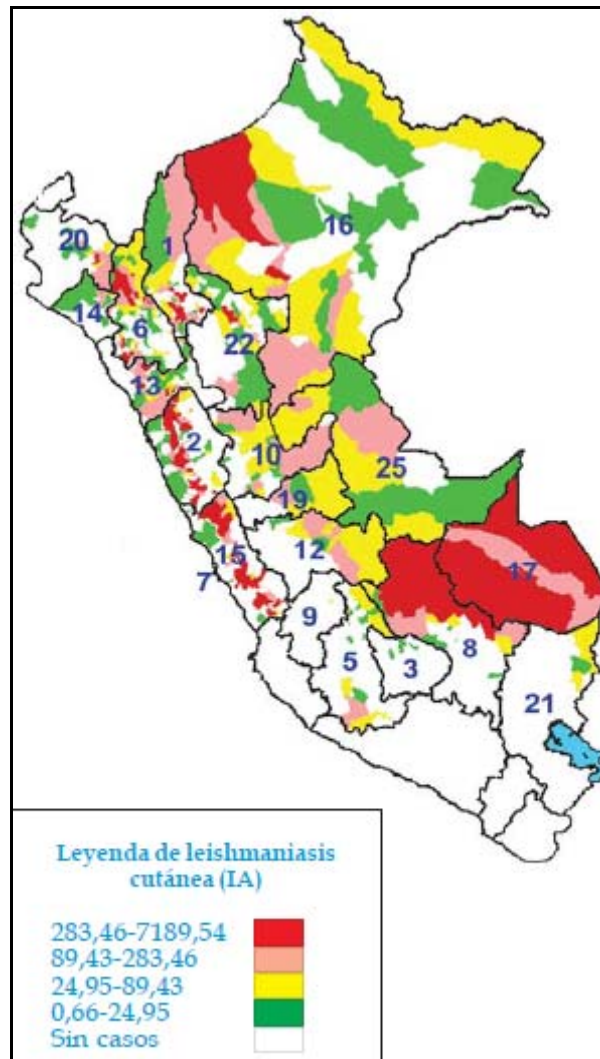


Figure 21 : distribution des cas de leishmaniose cutanée [53].

#### 2.1.2.2. Leishmaniose mucocutanée

Distribution annuelle des cas de leishmaniose mucocutanée au Pérou (1999-2003)

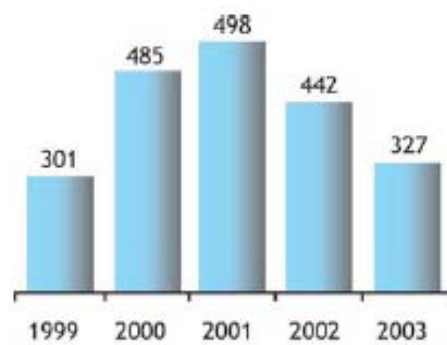


Figure 22 : graphique représentant la situation épidémiologique de la Leishmaniose mucocutanée au Pérou.

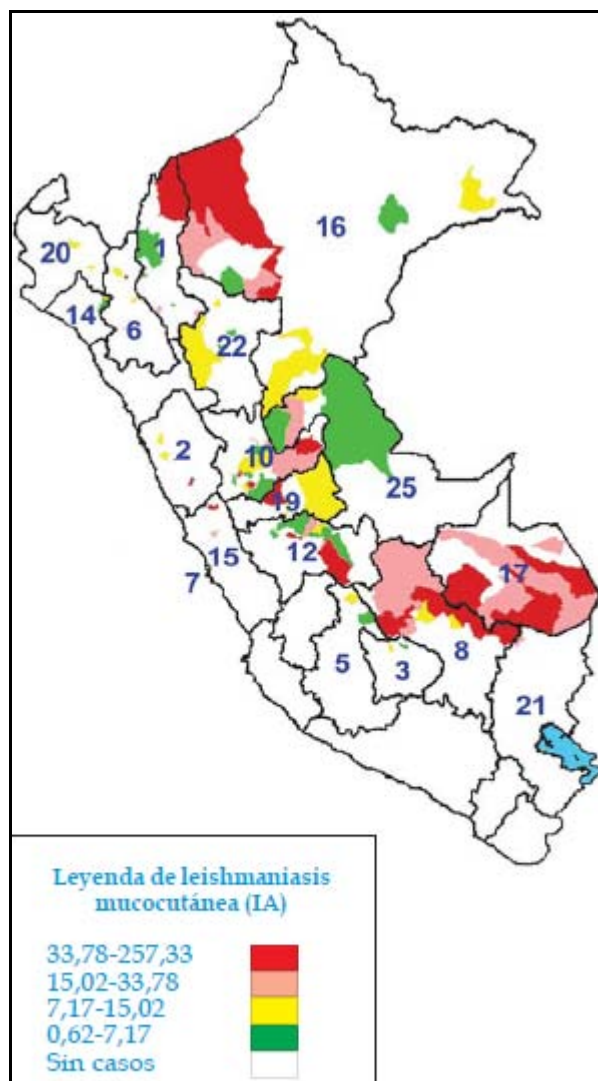


Figure 23 : distribution des cas de leishmaniose mucocutanée [53].

### 2.1.3. Terrains de collectes

Les deux communautés étudiées se trouvent en zone endémique de leishmaniose cutanée et mucocutanée, dans des biotopes différents permettant une recherche plus ample de nouvelles plantes bioactives. Aucun travail ethnopharmacologique n'avait été fait jusqu'à présent sur ces deux communautés natives.

#### 2.1.3.1. L'ethnie Chayahuita

Un premier travail de compilation des plantes utilisées contre la Leishmaniose et le paludisme a été fait sur la même ethnie mais dans une communauté différente et sur les 4 classes de maladies représentées dans la cosmovision Shawi avec quelques témoignages illustratifs d'usages de plantes [54, 55]. Il était donc intéressant d'approcher cette communauté qui est capable de déterminer avec plus ou moins de précision, une leishmaniose cutanée et

mucocutanée et donc de faire une étude ethnopharmacologique sur les plantes utilisées. La géographie du site est illustrée sur la Figure 24.



Figure 24 : Vue des contreforts andins depuis la communauté Chayahuita de Soledad

### **2.1.3.2. L'ethnie Yanesha**

Chez les Yanesha, seuls des travaux sur le système agricole et le mode de nutrition sont répertoriés [56, 57]. Il apparaît que dans cette communauté, la leishmaniose mucocutanée n'est pas connue mais qu'en revanche, la leishmaniose cutanée ou " Uta " est décrite comme étant une maladie à part entière, en langage Yanesha : *Mareñets*. La Figure 25 représente le biotope caractéristique où vit une partie de la communauté.



Figure 25 : Vue depuis le haut de la communauté du secteur Azulis

## 2.2. Objectifs

Les traitements actuels disponibles pour lutter contre les Leishmanioses sont inadaptés, toxiques, coûteux, nécessitent des applications répétitives d'injectables et ne sont pas effectifs dans tous les cas.

Au niveau mondial, les antimoniés pentavalents restent les molécules de référence pour le traitement des leishmanioses tégumentaires mais au Pérou le taux de guérison avoisine une moyenne de 50 à 70% des cas dépendant surtout du lieu de contagion et de l'espèce de *Leishmania*.

La Leishmaniose étant considérée comme une maladie "orpheline", peu ou pas d'entreprises pharmaceutiques ne prennent en considération cette recherche de nouvelles molécules du fait de la trop petite incidence de cette maladie dans les pays du Nord.

La grande biodiversité, le manque de travail ethnopharmacologique et l'endémicité des leishmanioses tégumentaires font du Pérou un excellent terrain de recherche.

Aujourd'hui, la majorité des études faites sur l'évaluation de composés dérivés de produits de synthèses ou de plantes médicinales face aux infections causées par les espèces de *Leishmania*, sont réalisées sur le modèle de souris. En effet, les macrophages péritonéaux de souris sont utilisés dans le modèle " *in vivo* ", et servent à l'évaluation de composés lors d'infection intracellulaire. Il existe néanmoins des modèles où ce sont des cellules en cultures qui servent à l'évaluation.

Il existe différents types de lignées de macrophages qui servent lors des modèles d'infection afin d'obtenir des amastigotes intracellulaires : macrophages dérivés de sang périphérique, de moelle osseuse et des lignées cellulaires [58, 59]. Encore aujourd'hui, il n'existe pas un modèle standard d'infection. Pour autant, lors de toute expérimentation avec des animaux, on se doit d'appliquer la règle des 3 R : « réduction, raffinement et remplacement » [60]. Pour remplacer l'usage d'animaux, nous avons décidé d'utiliser la lignée cellulaire Thp-1 pour valider ce modèle avec une souche de *L. (V.) peruviana*.

**Notre étude avait pour buts :**

La **détermination de nouvelles plantes d'intérêt** pour lutter contre la Leishmaniose afin de rechercher de nouveaux composés leishmanicides dans les plantes péruviennes.

L'étude de la **relation structure-activité** de composés synthétiques ayant déjà démontré des activités antiparasitaires afin de prédire une baisse de leurs toxicités et d'augmenter leurs biodisponibilités.

La mise en place d'un **nouveau modèle de criblage** de composés synthétiques ou naturels permettant une réduction de l'utilisation d'animaux de laboratoires.

## **III. Matériels et méthodes**

### **3.1. Préparation du matériel biologique**

#### **3.1.1. Parasites**

##### **3.1.1.1. Promastigotes**

###### **3.1.1.1.1. Principe**

Les promastigotes sont cultivés en milieu bi-phasique, sont fusiformes, possèdent un flagelle et leur phénotype est celui que l'on retrouve au niveau de l'intestin du vecteur.

Cette culture permettra de disposer de promastigotes qui pourront se transformer en amastigotes avant infection sur macrophages.

###### **3.1.1.1.2. Méthodologie**

Les différentes souches de *Leishmania* [*Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* (MHOM/PE/--/LCA08), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/PE/--/Per 006) et *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (clone 1 MHOM/BR/76/LTB-12)] sont maintenues en milieu bi-phasique sang-agar + solution saline (0,89% NaCl) à pH 7,4 à 24°C. Tous les 4 jours, les promastigotes sont repiqués en milieu bi-phasique.

Le mélange sang-agar est préparé à partir de 4 gr de Blood agar (Merck cod. 110886) dissouts dans 85 mL d'eau bi-distillée puis stérilisés. On ajoute ensuite 15 ml de sang défibriné de lapin, 1 mL de pénicilline/streptomycine 100X et 1 mL de 5-fluorocytosine à 1%.

##### **3.1.1.2. Amastigotes axéniques**

###### **3.1.1.2.1. Principe**

La détermination des activités leishmanicides de composés sur cultures axéniques d'amastigotes de *Leishmania* repose sur un modèle se rapprochant des conditions nécessaires au parasite pour sa réplication chez l'hôte lors de l'infection. En effet, l'état amastigote est rencontré, au niveau intracellulaire, dans les phagolysosomes des macrophages. Les

conditions, ainsi utilisées, *in vitro* permettent d'avoir à disposition la forme du parasite infectante chez l'hôte afin de cribler un plus grand nombre de molécules à activité leishmanicide.

#### **3.1.1.2.2. Méthodologie**

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* (clone 1 MHOM/BR/76/LTB-12) est maintenue sous forme axénique par repiquage tous les 4 jours à 32°C ±1°C et 5% (CO<sub>2</sub>). Le milieu utilisé est le MAA/20 à pH 5,8 (Milieu de croissance Axénique pour Amastigotes) supplémenté à 20% de sérum bovin fœtal (SBF) (DE 14-801F, BioWhitaker Cambrex) [61].

La culture s'effectue en flacon de 25 cm<sup>2</sup>.

#### **3.1.2. Macrophages péritonéaux de souris Balb/c**

L'extraction des macrophages de la cavité péritonéale de souris femelle Balb/c âgée de 6 à 8 semaines s'effectuent à l'aide d'une seringue de 6 mL (par souris) remplie de Milieu 199 (Invitrogen) froid supplémenté à 10% de (SBF) à pH 7,4 [62]. (Voir Annexe II)

La concentration cellulaire est évaluée à l'aide de la méthode colorimétrique du Neutral Red (Sigma) [63]. Cette technique tient compte du fait que seuls les macrophages sont capables de phagocytter le Neutral Red, ce qui nous permet de les différencier des autres cellules extraites du péritoine de la souris. Elle consiste à laisser en contact durant 15 min à température ambiante, 95 µL des macrophages péritonéaux extraits avec 5 µL d'une solution de Neutral Red (0,4%). Un aliquot de 10 µL est prélevé et les macrophages sont comptés à l'aide d'un hémacytomètre. (Voir Annexe I)

Environ 7.10<sup>4</sup> macrophages par puits sont alors déposés à l'aide d'une pipette multicanal sur des lamelles de verre de 4 mm x 4 mm préalablement déposées dans les puits des plaques. Les macrophages sont ensuite incubés 24 h à 37°C et 5% (CO<sub>2</sub>) afin de permettre leur adhésion sur les lamelles de verre [64]. Les macrophages sont ensuite lavés deux fois avec du Milieu 199 (Invitrogen) supplémenté à 10% de (SBF) à pH 7,4 à 37°C.

#### **3.1.3. Cellules Thp-1**

Les cellules en culture sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% (CO<sub>2</sub>). Elles sont ensuite centrifugées à 200 g durant 10 min à 4°C et sont resuspendues dans 3 mL de RPMI 1640 à 10% de SBF et à pH 7,2. Après comptage par hémacytomètre, 2.10<sup>4</sup> cellules sont



ajoutées dans des plaques de 96 puits et différenciées à l'aide de PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) à une concentration de 40 ng/mL [65]. Elles sont laissées durant 48 h dans l'incubateur à 37°C et 5% (CO<sub>2</sub>). Les cellules sont alors lavées deux fois avec du milieu RPMI 1640 à 10% de SBF et à pH 7,2.

## **3.2. Essais biologiques**

### **3.2.1. Toxicité**

#### **3.2.1.1. Evaluation des composés sur macrophages péritonéaux de souris Balb/c et/ou cellules Thp-1 différenciées**

##### ***3.2.1.1.1. Principe***

La cytotoxicité est évaluée à l'aide de la méthode d'exclusion du bleu de Trypan permettant de vérifier l'intégrité de la membrane du macrophage.

##### ***3.2.1.1.2. Méthodologie***

Les macrophages péritonéaux de souris Balb/c et/ou cellules Thp-1 différenciées, préalablement adhérents sur lamelle de verre (voir ci-dessus), sont mis en présence des composés à tester à 37°C et 5% (CO<sub>2</sub>). Les différentes concentrations des composés (100, 10, 1 et 0,1 µg/mL) dilués dans du Milieu 199 (Invitrogen) supplémenté à 10% de (SBF) à pH 7,4 sont mis en contact durant 48 h avec les macrophages. La molécule de référence est l'amphotéricine B (A 2411 Sigma)

##### ***3.2.1.1.3. Evaluation de la toxicité des composés***

Le nombre de cellules vivantes est déterminé à l'aide d'un hémacytomètre (voir Annexe I), en utilisant une solution de bleu de Trypan (0,4 %) [64]. La dose toxique (Dt<sub>50</sub>) est calculée de la manière suivante :

$$\frac{(\text{Nombre de cellules vivantes du contrôle} - \text{Nombre de cellules vivantes avec composés})}{\text{Nombre de cellules vivantes du contrôle}} \times 100 = \% \text{ de toxicité}$$

La dose toxique (Dt<sub>50</sub>) des composés est calculée par interpolation linéaire en fonction des % de toxicité.

### **3.2.1.2. Evaluation des composés sur des cellules VERO, LLC MK2 et Thp-1**

Il s'agit de déterminer la cytotoxicité des composés sur des cellules VERO (lignée épithéliale de rein de singe vert) (ATCC), LLC\_MK2 (lignée épithéliale de rein de singe) et Thp-1 (lignée monocytaire humaine) (ATCC).

#### **3.2.1.2.1. Principe**

L'évaluation de la cytotoxicité des composés sur lignées cellulaires nous renseigne sur la capacité des composés à bloquer les mécanismes de réplifications de ces cellules.

#### **3.2.1.2.2. Méthodologie**

Après comptage sur hémacytomètre (voir Annexe I), les cellules sont distribuées dans une plaque de 96 puits à une concentration de  $5 \cdot 10^4$  cellules par puits. Les parasites sont mis en présence de composés à évaluer à concentration décroissante durant 48 h dans un incubateur à  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  et 5% ( $\text{CO}_2$ ). La molécule de référence utilisée est l'amphotéricine B (A 2411 Sigma).

Après 48 h d'incubation, du MTT (bromure de 3(4.5-diMéthylThiazol-2-yl)-2.5-diphényl Tétrazolium, Sigma) est rajouté (25  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) dans chaque puit durant une période de 4 h. La réaction est arrêtée par ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution 50/50 (v/v) d'acide acétique (1%) et éthanol (96%) contenant du SDS à 20% (m/v). Les densités optiques (DO) sont lues après 30 minutes d'incubation à température ambiante sur un lecteur de microplaques-ELISA (modèle 3550, Bio-Rad) à 595 nm.

#### **3.2.1.2.3. Calcul de la $\text{Ci}_{50}$**

La  $\text{Ci}_{50}$  (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) est déterminée en fonction du pourcentage d'inhibition de la viabilité de la cellule aux concentrations de composés donnés.

$$\frac{(\text{DO contrôle} - \text{DO composés})}{\text{DO contrôle}} \times 100 = \% \text{ d'inhibition}$$

La  $\text{Ci}_{50}$  est calculée par Probit.

## 3.2.2. Activité leishmanicide

### 3.2.2.1. Amastigotes axéniques

#### 3.2.2.1.1. *Principe*

L'activité leishmanicide des composés, sur la forme amastigote du parasite, s'effectue à l'aide d'un test colorimétrique MTT permettant de détecter la viabilité parasitaire.

L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale parasitaire permet de réduire le MTT en formazan, transformant le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus dosables par spectrophotométrie. Les DO observées sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes par puits [66].

#### 3.2.2.1.2. *Méthodologie*

Après comptage sur hémacytomètre (voir Annexe I), les parasites sont distribués sur une plaque de 96 puits à une concentration de  $2 \cdot 10^5$  cellules par puits. Les parasites sont mis en présence de composés à évaluer à concentration décroissante durant 72 h dans un incubateur à  $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  et 5% ( $\text{CO}_2$ ). La molécule de référence utilisée est l'amphotéricine B (A 2411 Sigma).

A la fin des 72 h d'incubation, du MTT est rajouté (10  $\mu\text{L}$  de MTT, 10 mg/mL) dans chaque puit durant une période de 4 h. La réaction est arrêtée par ajout de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution d'isopropanol 50% (v/v) et SDS 10% (m/v), à pH 5,4. Les densités optiques (DO) sont lues après 30 minutes d'incubation à température ambiante sur un lecteur de microplaques-ELISA (modèle 3550, Bio-Rad) à 595 nm.

#### 3.2.2.1.3. *Calcul de la $Ci_{50}$*

La  $Ci_{50}$  (concentration qui inhibe 50% de la croissance parasitaire) est déterminée en fonction du pourcentage d'inhibition de la viabilité du parasite à une concentration de composés donnée.

$$\frac{(\text{DO contrôle} - \text{DO composés})}{\text{DO contrôle}} \times 100 = \% \text{ d'inhibition}$$

La  $Ci_{50}$  est calculée par Probit.

### **3.2.2.2. Macrophages infectés**

#### **3.2.2.2.1. *Principe***

L'activité leishmanicide des composés sur le modèle intracellulaire est quantifiée par la méthode de coloration au Giemsa des parasites phagocytés par les macrophages. Cette technique permet d'évaluer la charge parasitaire des macrophages et donc la réduction du taux d'infection en présence des composés testés, en comptant le nombre d'amastigotes par macrophages infectés.

#### **3.2.2.2.2. *Méthodologie***

Les macrophages péritonéaux de souris Balb/c vont être infectés par des amastigotes axéniques de différentes souches de *Leishmania* avec un ratio de 3:1 durant 4 h.

#### **3.2.2.2.3. *Infection des macrophages***

Après lavage des macrophages, les amastigotes axéniques sont distribués à un ratio de 3 parasites pour 1 macrophage et sont incubés 4 h à 32°C et 5% (CO<sub>2</sub>), conditions permettant la phagocytose du parasite par le macrophage. Un lavage avec du Milieu 199 (Invitrogen) supplémenté à 10% de (SBF) à pH 7,4 à 32°C et 5% (CO<sub>2</sub>) permet de détacher les parasites non internalisés. 100 µL de Milieu 199 (Invitrogen) supplémenté à 10% de (SBF) à pH 7,4 à 32°C et 5% (CO<sub>2</sub>) sont ajoutés par puits durant 24 h.

#### **3.2.2.2.4. *Composés à tester***

Les composés sont déposés 24 h après l'infection durant 48 h et incubés à 32°C et 5% (CO<sub>2</sub>). Les concentrations des composés testés tiennent compte de leur cytotoxicité sur les macrophages péritonéaux de souris (voir ci-après). Quatre concentrations sont évaluées par composé. La molécule de référence est l'amphotéricine B (A 2411 Sigma).

### 3.2.2.2.5. Coloration au Giemsa

Après 48 h d'incubation des composés, le milieu est enlevé et les macrophages, adhérents aux lamelles de verre, sont fixés durant 5 min avec du méthanol absolu et sont ensuite colorés durant 8 minutes par une solution de Giemsa (GS1L-1L, Sigma) diluée à 1/10 dans de l'eau distillée. Une fois sèches, les lamelles sont collées sur des lames porte-objet en verre à l'aide d'Entellan (Merck).

### 3.2.2.2.6. Evaluation l'activité leishmanicide des composés

L'activité anti-leishmanienne des composés est déduite du nombre d'amastigotes intracellulaires et du nombre de macrophages infectés représentant la charge parasitaire. 100 macrophages par puits sont évalués au microscope à 1000X. Le comptage de 300 macrophages, par concentration de composés, permet d'estimer le pourcentage de réduction d'infection (%Ri) qui sert à calculer la  $Ri_{50}$  (concentration qui représente 50% d'inhibition de l'infection) [67].

Le pourcentage de réduction d'infection (%Ri) est calculé de la manière suivante :

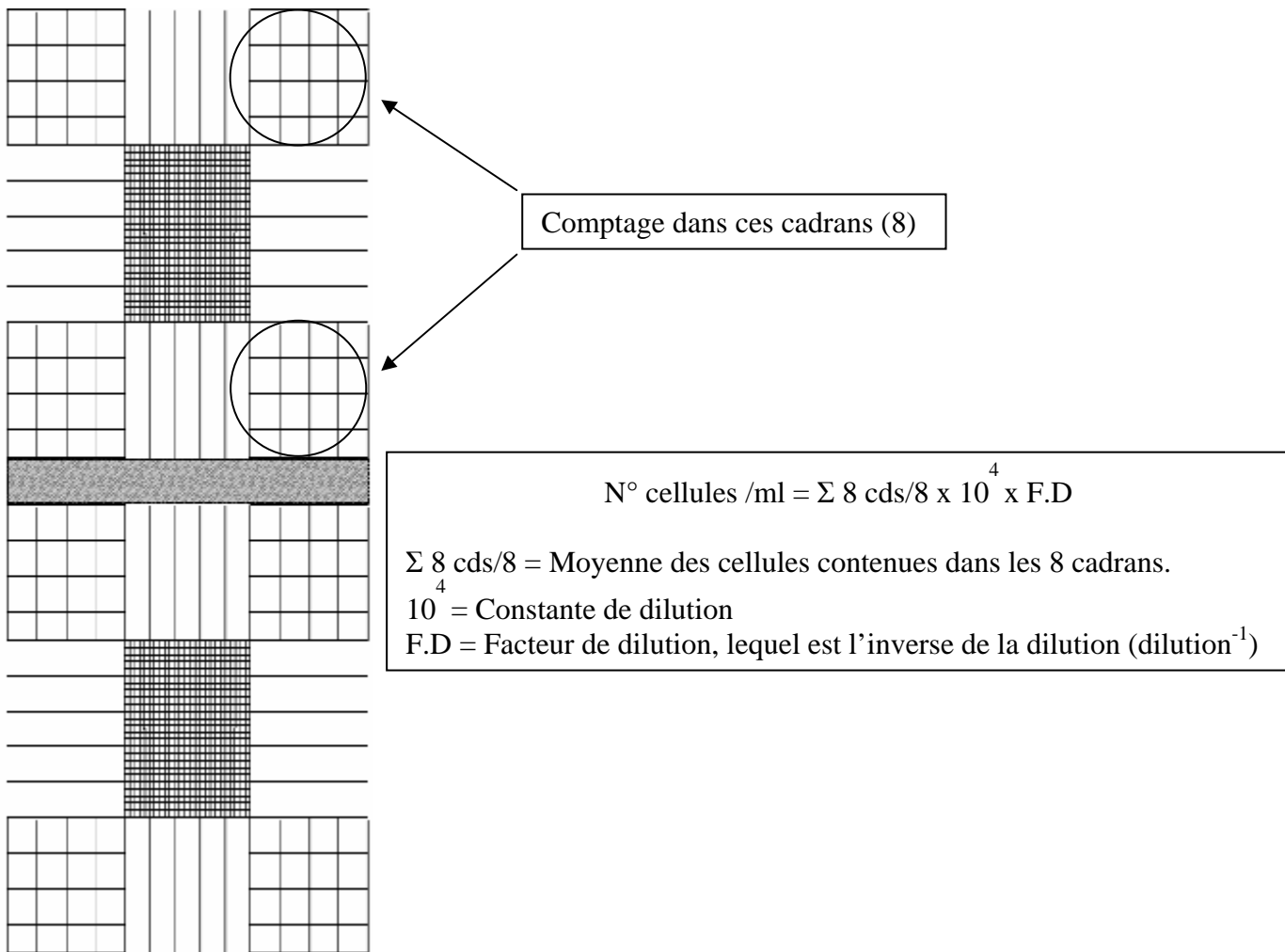
~~Charge parasitaire = nombre de macrophages infectés × nombre d'amastigotes par macrophages~~

$$\left[ 100 - \left( \frac{\text{Charge parasitaire des macrophages traités}}{\text{Charge parasitaire des macrophages non traités}} \right) \right] \times 100 = \% Ri$$

La dose inhibitrice de 50% de la charge parasitaire ( $Ri_{50}$ ) est calculée par Probit.

### 3.3. Annexes

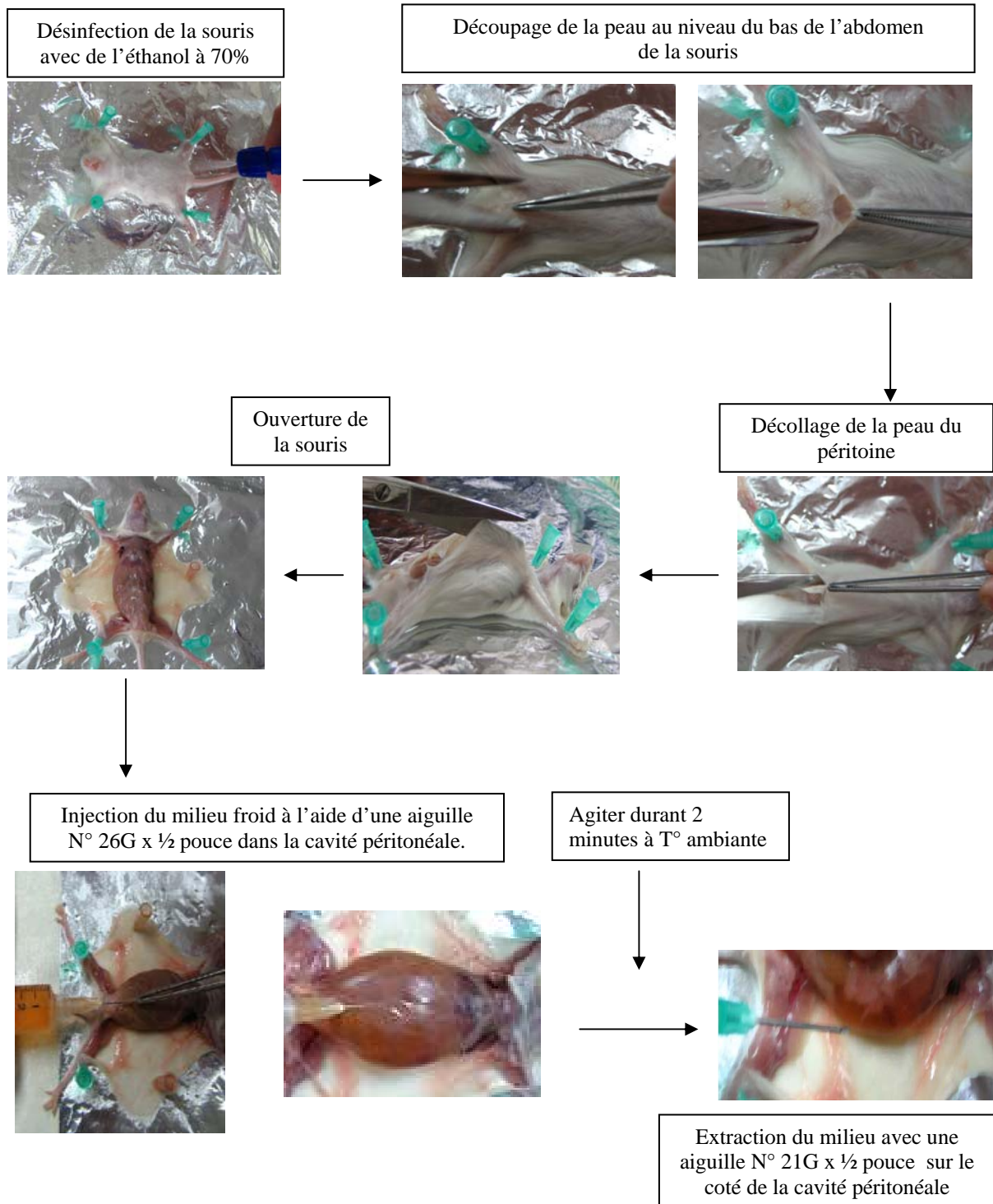
#### 3.3.1. Technique de comptage à l'hémacytomètre (Annexe I)



Nettoyer l'hémacytomètre avec de l'éthanol à 70% et le sécher avec un papier éponge.

Mettre 10  $\mu\text{L}$  de chaque coté de l'hémacytomètre et compter au microscope optique avec un objectif de 40X.

### 3.3.2. Extraction de macrophages péritonéaux de souris (Annexe II)



## IV. Résultats

### 4.1. Article 1

Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group.

**Y. Estevez, D. Castillo, M. Tangoa Pisango, J. Arevalo, R. Rojas, J. Alban, E. Deharo, G. Bourdy, M. Sauvain**

L'article présente l'activité de 27 extraits éthanoliques issues de 27 espèces différentes de plantes dont 19 sont utilisées par les Chayahuita pour traiter des affections cutanées dont la Leishmaniose.

Ce groupe ethnique se situe sur les derniers contreforts orientaux de la cordillère des Andes se jetant dans la plaine forestière amazonienne au nord du Pérou (latitude : 5°39' 0S, longitude : 76°42' 0W). C'est une région de forêt tropicale, humide, propice aux développements de leishmaniose cutanée et mucocutanée véhiculées par différentes espèces de *Lutzomias* (phlébotomes) dépendantes des facteurs écologiques et des différents réservoirs naturels [50].

De par le fait d'être dans une zone endémique, les membres de la communauté ont développé une Pharmacopée traditionnelle à base de plantes de leur environnement leur permettant de traiter ou de réduire les symptômes liés à cette parasitose [68].

L'étude ethnopharmacologique et chimio-taxonomique de plantes utilisées permet une recherche de composés actifs qui pourraient être de nouvelles têtes de séries pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques afin de remplacer les traitements existants [69].

La collecte de plantes s'est effectuée dans la communauté de Soledad avec l'aide d'informateurs. Elle était orientée sur des plantes utilisées pour traiter des affections cutanées, c'est-à-dire à visée leishmanicide (contre la "*Uta*" terme local désignant la leishmaniose cutanée), contre les abcès et cicatrisantes. Pour chaque plante, a été attribué un numéro d'identification, prenant en compte son nom vernaculaire et son mode de préparation (l'échantillon a été déposé au Muséum d'histoire naturelle de Lima de l'UNMSM (Universidad Nacional Mayor San Marcos).



Suivant les données des informateurs, différentes parties des plantes (écorce, feuilles, racines ou tige) ont été collectées. Elles ont ensuite été séchées, broyées puis macérées dans un solvant (éthanol 95%) durant 10 jours à température ambiante (favorisant l'extraction des composés polaires). Les extraits ont ensuite été filtrés, concentrés et préparés dans du DMSO à une concentration finale de 10 mg/mL nous permettant de ne pas dépasser le seuil de 1% de DMSO lors des essais biologiques.

Les tests biologiques ont été effectués sur des cultures axéniques de promastigotes et d'amastigotes du clone 1 de la souche de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) [61]. Ces modèles " *in vitro* " nous ont permis d'évaluer l'activité des extraits sur les deux états distincts du parasite grâce aux test du MTT qui permet de vérifier leurs viabilités [66]. Les molécules de références utilisées furent le Glucantime ® et l'Amphotéricine B ®.

Trois des douze extraits de plantes utilisées contre la Leishmaniose présentent une très bonne activité ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) sur notre modèle. De ces trois plantes, deux sont de la famille des Piperaceae du genre des *Piper*, espèce connue comme contenant des chalcones responsables de l'activité antileishmanienne [70-72]. La troisième plante, de la famille des Apocynaceae du genre *Tabernaemontana*, présente des alcaloïdes indoliques responsables de l'activité sur certaines souches de *Leishmania* [73]. Ils sont aussi décrits comme étant d'une grande cytotoxicité ce qui pourrait expliquer nos résultats [74].

Au cours de cette étude ethnopharmacologique, nous avons démontré que seulement 3 plantes utilisées par les Chayahuita pour traiter la Leishmaniose présentent une bonne activité *in vitro*. Tenant compte que les lésions présentes lors d'une leishmaniose cutanée peuvent cicatriser seules et qu'une surinfection par des bactéries ou des mycoses aux niveaux des plaies est fréquente, il est possible que ces plantes agissent donc plus comme des antibactériens ou antifongiques qui permettraient une cicatrisation plus rapide que comme de vrais leishmanicides.

Des études complémentaires sont en cours dans le laboratoire pour confirmer si les molécules présentes dans les extraits appartiennent aux classes de composés chimiques déjà décrites.

## **4.2. Article 2**

Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts

Valadeau Céline, Pabon Adriana, Deharo Eric, Albán–Castillo Joaquina, **Estevez Yannick**, Lores Fransis Augusto, Rojas Rosario, Gamboa Dionicia, Sauvain Michel, Castillo Denis, Bourdy Geneviève

L'article décrit l'activité de 80 extraits éthanoliques issus de plantes de la Pharmacopée traditionnelle Yanesha, utilisées pour lutter contre des affections relatives à la Leishmaniose et au paludisme.

Cette ethnie péruvienne, localisée dans la "Selva Central", se situe à l'Est de la capitale Lima, sur le versant oriental des Andes et plus précisément sur le pourtour du parc national Yanachaga-Chemillen dont le biotope s'étend de 300 à 1800 m d'altitude. La leishmaniose cutanée et le paludisme sont endémiques dans cette zone agricole et forestière.

De plus, cette communauté native de la forêt amazonienne a l'avantage d'avoir une forêt primaire à proximité, plus ou moins intacte, permettant d'avoir accès à des espèces de plantes non encore étudiées. Aucun travail ethnopharmacologique répertorié à ce jour n'avait été mené auprès de cette ethnie.

La collecte des plantes s'est faite sur trois communautés différentes présentant divers sites écologiques : Tsachopen, 1770 m d'altitude ; Loma Linda, 300 m d'altitude et San Pedro de Pichanaz, 800 m d'altitude. Cette collecte a été possible grâce aux accords passés entre les différents acteurs des communautés et à l'obtention du permis de collecte délivré par l'INRENA (Institut National des Ressources Naturelles) et le ministère de l'agriculture. La récolte des échantillons s'est orientée vers des plantes servant à traiter des affections cutanées (ou leishmanicide) ainsi que des plantes susceptibles de soigner les symptômes présents lors de crise de paludisme (fièvre, maux de tête, frissons associés ou non à des douleurs du foie et diarrhée).

La collecte des données s'est appuyée sur deux études différentes : d'une part, une étude ethnobotanique consistant à ramasser les plantes en répertoriant leurs noms et usages et, d'autre part, une étude ethnomédicinale enregistrant lors d'enquêtes le concept de la maladie,

son diagnostic et son traitement. Deux exemplaires de chaque plante ont été remis : l'un au Muséum d'histoire naturelle de Lima de l'UNMSM et l'autre à l'herbier du jardin botanique du Missouri à Oxapampa (HOXA).

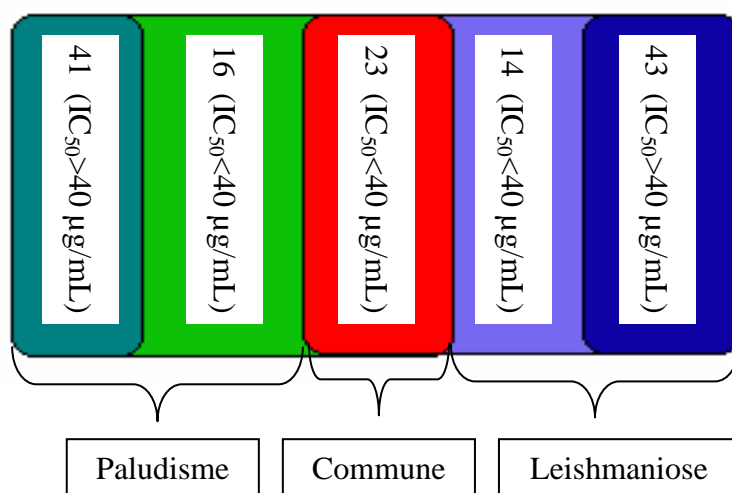
Le même protocole d'extractions pour les échantillons précédents fut appliqué et 80 extraits éthanoliques passèrent aux criblages biologiques.

Deux tests biologiques permettant de vérifier la viabilité des parasites ont été appliqués :

L'un sur une culture axénique d'amastigotes du clone 1 de la souche de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) révélée à l'aide de MTT ; ayant comme molécule de référence l'Amphotéricine B [61, 66].

L'autre sur une souche de *Plasmodium falciparum* (FCR3) résistante à la chloroquine. La molécule de référence étant la chloroquine [75].

L'ensemble des résultats biologiques a montré que 23 plantes avaient une activité croisée sur les deux types de parasites ( $IC_{50} < 40 \mu\text{g/mL}$ ). Ce sont des plantes appartenant principalement aux familles de Piperaceae (5), Zingiberaceae (3), Bignoniaceae (2), Verbenaceae (2) et Araceae (2).



Pour se prémunir contre le paludisme, les Yanasha utilisent deux modes de traitement avec des plantes, l'un préventif et l'autre curatif. Des 13 plantes préconisées pour lutter contre le paludisme, seulement 3 espèces (*Jacaranda copaia*, *Verbena littoralis* et *Carica papaya*) présentent une activité sur le modèle "in vitro".

*Jacaranda copaia* contient des triterpènes et des dérivés de quinone comme la jacaranone qui pourrait être responsable de la toxicité sur les parasites [62, 76]. *Carica papaya* est, pour sa

part, un remède connu contre le paludisme et est utilisée généralement en association avec d'autres plantes [75, 77]. Elle contient de la carpaïne (alcaloïde pipéridinique). Aucune utilisation de *Verbena littoralis* contre une parasitose n'a été décrite jusqu'à aujourd'hui. L'extrait présente aussi une activité leishmanicide.

Cinq extraits de plantes présentent une  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  sur notre modèle. L'une est de la famille des Monimiaceae du genre *Siparuna* dont l'utilisation est très répandue dans les pharmacopées traditionnelles d'Amérique du Sud [78-81]. De ce genre, ont été isolés des isoquinoline et des dérivés de sesquiterpènes tels que la *nor*-boldine (alcaloïde) et un flavanone (composé phénolique) à activité antipaludique.

Deux plantes de la famille des Piperaceae du genre des *Piper* contiennent des chalcones (composés phénoliques), des amides et des acides aromatiques prénylés responsables de l'activité anti protozoaire [82-84].

Les deux dernières appartiennent à la famille des Zingiberaceae et au genre *Renealmia*. Il a été démontré que des plantes du même genre contiennent des diterpènes labdanes pouvant inhiber la croissance de *Plasmodium* [85].

C'est pourtant la première fois qu'est reportée une activité antipaludique chez *Siparuna aspera* et *Piper aduncum*.

En ce qui concerne la Leishmaniose, les Yanasha différencient deux types "d'*Uta*", une sèche et une humide. En comparant les données et en visualisant les cicatrices d'anciennes infections, il a été déduit que les Yanasha étaient certainement capables de différencier une leishmaniose cutanée ("*Uta de agua*") d'une dermatose possiblement due à des infections fongiques ou bactériennes ("*Uta seca*").

Des 12 plantes préconisées, 11 ont été extraites et il s'est avéré que 4 plantes présentaient une activité moyenne ( $50 \mu\text{g/mL} > CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ ). Le mode d'administration consiste à déposer du latex frais des feuilles ou de la tige sur la plaie (*Acalypha macrostachya*, *Euphorbia heterophylla*, *Vismia sp.* et *Irlbalchia alata*). Ce mode d'application doit jouer un rôle important sur l'activité.

Deux plantes, *Jacaranda copaia* et une plante du genre *Munnozia*, ont démontré une bonne activité ( $CI_{50} \pm 15 \mu\text{g/mL}$ ). Il a été démontré qu'une plante du même genre contient des sesquiterpènes lactone dont la Dehydrozaluzanin-C présentant une très bonne activité leishmanicide [86].

Deux plantes, *Pityrogramma calomelanos* et *Dieffenbachia williamsii*, ne présentèrent aucune activité sur le modèle.

Trois plantes présentaient une très bonne activité ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) :

*Carica papaya*.

Une lamiacée du genre *Hyptis* dont le genre est généralement connu pour soigner des problèmes cutanés liés à des infections fongiques ou à des dermatoses [81]. Des diterpènes abietan, isolés du même genre, ont montré des propriétés antiplasmodiques [87].

Une Verbenaceae, du genre *Lantana*, qui n'a jamais été décrite comme présentant une activité antiparasitaire.

En dehors des plantes préconisées par cette ethnie pour lutter contre la Leishmaniose, 6 autres plantes ont présenté de très bonnes activités ( $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) :

*Piper dennisii*.

Une plante du genre *Calea* présente des activités contre des promastigotes de *L.major* grâce à des chromanones alors que des acétophénones étaient peu actives contre des Trypanosomatidae [88, 89].

L'application de feuilles des plantes du genre *Cestrum* en cataplasmes pour lutter contre le paludisme a déjà été reporté mais aucun composé n'a démontré d'activité leishmanicide ou antipaludique [90]. Il est démontré que ce genre contient des saponines qui pourraient être responsables de l'activité [91, 92].

Les trois autres plantes sont de la famille des Zingiberaceae, l'une du genre *Hedychium* et les autres du genre *Renealmia*. Ces genres contiennent des labdanes, diterpènes responsables d'une activité apoptotique sur divers types cellulaires, et des aryle-heptanoïdes leishmanicides [93, 94].

Cette double étude ethnobotanique et ethnomédicale a permis de prouver, une fois de plus, l'utilité du travail de terrain afin de découvrir de nouvelles plantes à activités antiparasitaires.

### 4.3. Article 3

Antileishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-*N*-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives

Asunción Burguete, Yannick Estevez, Denis Castillo, Germán González, Raquel Villar, Beatriz Solano, Esther Vicente, Silvia Pérez Silanes, Ignacio Aldana, Antonio Monge, Michel Sauvain, Eric Deharo

L'article décrit l'activité leishmanicide de 13 dérivés synthétiques de quinoxaline oxydée au niveau des 2 atomes d'azote, qui avaient montré des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires [95]. (Figure 26)

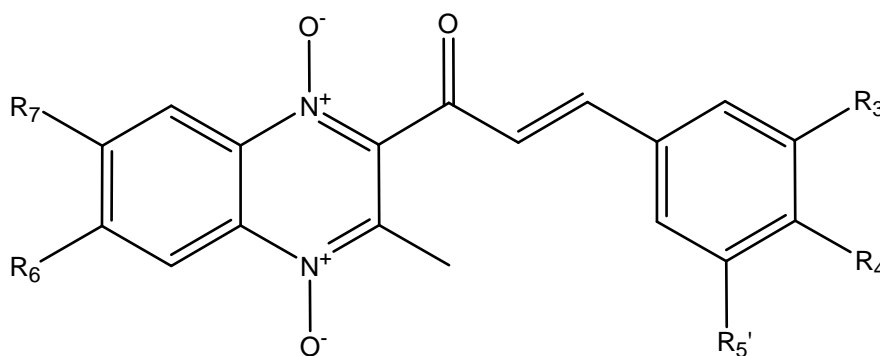


Figure 26 : formule des dérivés synthétiques de quinoxaline étudiés

Ces dérivés ont déjà montré des activités antiprotozoaires intéressantes contre *Trypanosoma cruzi* [96, 97] et *Plasmodium falciparum* [98-100] mais aucune n'a été décrite contre *Leishmania*. Il était donc intéressant d'évaluer ces composés sur le modèle de *Leishmania* du laboratoire.

La synthèse de ces dérivés a été effectuée au CIFA (Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada) ou Centre de recherche en pharmaco-biologie appliquée de l'université de Navarre de Pampelune en Espagne.

A partir des tests *in vitro* sur des cultures axéniques d'amastigotes du clone 1 de la souche de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012), nous avons pu déterminer les concentrations inhibitrices (Ci<sub>50</sub>) de ces composés grâce au test du MTT [61, 66]. Cela nous a permis de sélectionner les composés les plus actifs afin d'évaluer leur activité sur des macrophages

péritonéaux de souris Balb/c infectés avec cette même souche de parasite. Nous avons déterminé ainsi la concentration inhibant 50 % de l'infection ( $CI_{50}$  (Ri)) [67, 101]. Une étude complémentaire de cytotoxicité sur ces mêmes macrophages nous a permis de déterminer un indice de sélectivité (IS) des composés les plus actifs. Nous avons également déterminé les coefficients de distribution (Log P), calculé *in silico*.

L'étude des résultats nous a permis de démontrer que la présence d'au moins un méthoxyle était nécessaire sur le radical  $R_3'$  pour avoir une activité leishmanicide. En effet, seuls les composés de la série **3**, qui présentaient un groupe méthylènedioxy en  $R_3'$  et  $R_4'$ , étaient inactifs ( $CI_{50} > 100 \mu M$ ).

La présence d'un méthoxyle en  $R_3'$  et d'un hydroxyle en  $R_4'$  dans les composés de la série **4** ont permis de garder une activité sur les amastigotes axéniques mais les composés ont perdu leurs activités leishmanicides quant à la réduction de l'infection des macrophages par des amastigotes.

Par contre, les composés de la série **4** ont présenté peu ou pas de toxicité vis-à-vis des macrophages car ils avaient l'IS les plus importants (20 et 25).

Les composés de la série **2**, qui ont un méthoxyle sur chaque radical  $R_3'$ ,  $R_4'$  et  $R_5'$ , ont présenté les meilleures activités sur le test d'amastigotes axéniques, le composé le plus actif étant celui avec un fluor (**2d**) sur le radical  $R_7$  tandis que sur les amastigotes intracellulaires, c'est le composé sans radicaux en  $R_7$  et  $R_6$  (**2a**) qui a présenté la meilleure activité.

Le composé (**2e**) avec un méthyle sur chaque radical  $R_7$  et  $R_6$  présentait la valeur de Log P la plus haute, ce qui en faisait le composé le plus lipophile de la série **2**. Il a été intéressant de remarquer qu'il y a une relation entre les résultats expérimentaux et la lipophilie des composés. Les composés les plus actifs sont les composés les moins lipophiles, sauf le composé (**2e**).

Les résultats nous ont montré que des quinoxalines oxydées sur les 2 atomes d'azote pourraient être prises en compte pour poursuivre des tests ultérieurs biochimiques afin de comprendre le mode d'action de ces composés. Le composé (**2e**) restant le composé le plus actif et le moins toxique, il sera donc nécessaire de poursuivre les tests sur un modèle *in vivo*.

#### **4.4. Article 4**

*Leishmania (Viannia) peruviana* (MHOM/PE/LCA08): Comparison of THP-1 cell and murine macrophage susceptibility to axenic amastigotes for the screening of leishmanicidal compounds.

Germán González, Denis Castillo, **Yannick Estevez**, Thomas Grentzinger, Eric Deharo

Des travaux antérieurs ont montré l'intérêt des cellules Thp-1 dans l'évaluation de molécules contre les Leishmanioses du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde [58, 102]. Cependant, aucune donnée n'était disponible à ce jour sur la susceptibilité des Thp-1 vis-à-vis de *L. peruviana*, espèce rencontrée au Pérou, responsable de leishmanioses cutanées mais aussi à l'origine de cas de leishmanioses mucocutanées.

Nous avons donc comparé la susceptibilité de cellules monocytaires cancéreuses Thp-1 et de macrophages péritonéaux de souris Balb/c vis-à-vis d'amastigotes de *L. peruviana*.

Pour cela, nous avons évalué le pourcentage de viabilité des cellules infectées, la charge parasitaire (nombre de parasites x nombre de macrophages infectés) lors de l'infection et la réponse à une molécule de référence (l'Amphotéricine B) tant au niveau de l'efficacité pour réduire l'infection qu'au niveau toxique sur ces cellules.

Les cellules Thp-1 ont été transformées en macrophages activés à l'aide de 40 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) durant 48 h tandis que les macrophages ont été extraits de la cavité péritonéale de souris Balb/c [62, 65].

Par la méthode d'exclusion du bleu de trypan, nous avons pu déterminer la viabilité des deux types cellulaires entre 24 h après infection (a.i) et 120 h a.i, qu'elles soient infectées ou non par *L. peruviana*.

Nous avons ainsi montré que la viabilité des macrophages non-infectés ne présentait pas de différence significative alors que lors de l'infection, avec un ratio adéquat, la viabilité décroissait à partir de 72 h a.i pour les cellules Thp-1. À 96 h a.i. et 120 h a.i, la viabilité était, tant au niveau des macrophages que des cellules Thp-1, significativement différente par rapport à la viabilité à 24 h a.i.



La charge parasitaire fut évaluée de 0 a.i. à 120 h a.i. après l'infection. Cette expérience nous a permis de vérifier que la charge parasitaire augmentait malgré le petit nombre de parasites présents lors de l'infection (2 parasites par macrophage et 10 parasites par cellule Thp-1 transformée). De plus, nous avons observé que 72 h a.i., il y avait un pic au niveau de la charge parasitaire chez les cellules Thp-1 et que celle-ci retombait 96 h a.i., ce qui pourrait donc expliquer la chute observée au niveau de la viabilité après 96 h.

Finalement, nous avons comparé la concentration d'amphotéricine B inhibant 50 % de l'infection ( $CI_{50}$  (Ri)) de 72 h a.i. à 120 h a.i. et avons montré que la  $CI_{50}$  (Ri) est la même 72 h a.i. (0.1  $\mu$ M) pour les deux types cellulaires [67].

À 96 h a.i. et 120 h a.i., la réduction de l'infection était 5 fois supérieure par rapport à 72 h a.i. au niveau des macrophages de souris et quasiment la même au niveau des cellules Thp-1. A partir de ces données expérimentales, il est impossible d'affirmer que seule l'activité de l'amphotéricine B a augmenté. De plus, la cytotoxicité de l'amphotéricine B sur les deux types de macrophages après 48 h d'exposition, est la même que celle déjà publiée [103, 104].

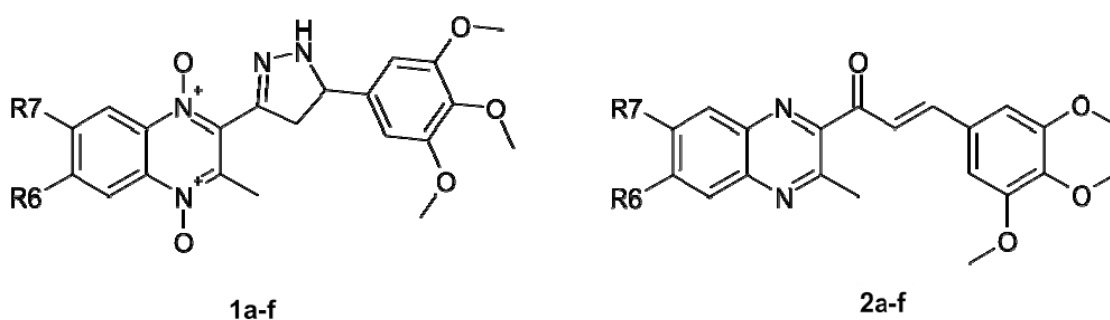
À la lumière des résultats obtenus, nous avons déduit que l'évaluation des composés est meilleure à 72 h a.i, en raison de la diminution de viabilité et de la chute de la charge parasitaire à 72 h a.i.

Dans ces conditions, les cellules Thp-1 transformées en macrophages activés puis infectées par *L. (V.) peruviana* (MHOM/PE/LCA08) sont un bon modèle pour évaluer de nouveaux composés antiparasitaires.

#### 4.5. Données additionnelles :

Le premier criblage de dérivés de quinoxaline effectué par notre groupe (voir article 3) ayant montré des résultats intéressants, nous avons voulu poursuivre le travail sur deux nouvelles séries.

La première série comprenait une di-oxydation aux niveaux des deux atomes d'azote et un cycle pyrazole (série **1**). La seconde série correspondait à la série précédente mais sans la di-oxydation des atomes d'azote (série **2**). (figure 27)



R6/R7= H/H (a); H/F (b); H/Cl (c); H/CH<sub>3</sub> (d); H/OCH<sub>3</sub> (e); CH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub> (f)

Figure 27 : structures chimiques des composées de la série **1** et **2**.

Nous avons donc testé ces deux nouvelles séries sur :

- \* lignées cellulaires cancéreuses: Vero, LLc-MK2 et Thp-1,
- \* macrophages péritonéaux de souris (*ex vivo*),
- \* Trypanosomatidae : *L. peruviana* (sur le stade amastigote intracellulaire) et *Trypanosoma cruzi* (stade trypomastigote) [105, 106].

Un seul composé de la série **1** a présenté une activité modérée sur *T.cruzi* (**1f**), alors que les autres composés de cette série ont présenté une activité de modérée à bonne contre les amastigotes intracellulaires de *L. peruviana* **1a-e**. Ce composé présente aussi la plus grande toxicité de la série **1** sur les autres cellules. (Figure 2)

**1d** est le composé le plus intéressant car c'est le plus actif contre les amastigotes intracellulaires et aussi le moins toxique sur les lignées cellulaires Vero et LLc-MK2. Malgré sa relative toxicité sur les cellules Thp-1, il présente un indice de sélectivité (IS) de l'ordre de 12 contre les macrophages péritonéaux de souris.

Les molécules les plus actives sur *T.cruzi* sont celles de la série **2**. En effet, les composés **2a**, **2b**, **2d** et **2e** présentent une bonne activité contre ce parasite ; le composé **2e** est le plus actif mais aussi le plus toxique. Il présente une très bonne activité contre *L. peruviana* de même que le composé **2b** qui est 20 fois moins toxique sur les macrophages péritonéaux de souris. Le composé **2f** est le plus intéressant car il présente une bonne activité contre *L. peruviana* et une toxicité qui est sélective sur la lignée cellulaire des monocytes humains (Thp-1) (Tableau 2).

Composés	R7	R6	M.P.M	Thp-1	VERO	LLc-Mk2	<i>L. peruviana</i>	<i>T.cruzi</i>
1a	-	-	116,2	98,1	93,8	134,0	27,5	>25
1b	F	-	130,2	40,0	112,0	78,2	13,7	>25
<b>1d</b>	<b>CH3</b>	-	<b>113,9</b>	<b>53,2</b>	<b>&gt;235,6</b>	<b>&gt;235,6</b>	<b>8,9</b>	<b>&gt;25</b>
1e	O-CH3	-	136,6	107,8	>227,0	>227,0	28,5	>25
1f	CH3	CH3	63,2	28,9	61,6	75,3	ND	22,8
2a	-	-	9,3	2,7	7,9	11,9	9,4	18,3
<b>2b</b>	<b>F</b>	-	<b>279,5</b>	<b>15,2</b>	<b>21,3</b>	<b>16,3</b>	<b>2,8</b>	<b>14,3</b>
2c	Cl	-	332,5	19,7	117,7	99,4	21,4	>25
2d	CH3	-	61,8	4,4	16,5	22,0	11,9	16,5
2e	O-CH3	-	11,3	1,4	7,6	10,1	1,2	11,5
<b>2f</b>	<b>CH3</b>	<b>CH3</b>	<b>287,9</b>	<b>38,0</b>	<b>&gt;254,8</b>	<b>&gt;254,8</b>	<b>12,7</b>	<b>&gt;25</b>
Amp B			5,5	>50	24,4	ND	0,10	ND

Tableau 2 : Tableau des activités biologiques des composés testés.

Thp-1: cellules de monocyte humain, Vero et LLc-Mk2: cellules de reins de singes, MPM: macrophages péritonéaux de souris, *L. peruviana* : amastigotes intracellulaires et *T. cruzi* : trypomastigotes .

Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{M}$  et représentent l'inhibition de 50% de la viabilité de ces cellules.

ND: Non Déterminée.

L'amphotéricine B (Amp B) est utilisée comme molécule de référence.

Les composés de la série **1** présentent un  $\text{miLog } P < 1$ , ce qui signifie que ces molécules sont plus hydrophiles que celles de la série **2** avec des  $\text{miLog } P > 3,5$ . Le composé **1f**, présentant un méthyle en position  $R_6$  et  $R_7$ , est le composé le plus lipophile de la série **1** [96].

La présence d'un atome électronégatif en  $R_7$ , comme le fluor (**1b**), a augmenté la toxicité de 2 fois sur les cellules Thp-1 et LLc-MK2 alors que la présence d'un méthoxyle (**1e**), diminue la toxicité mais provoque la perte de l'activité.

La présence d'un seul substituant, sur le radical  $R_7$ , conduit à l'absence d'activité contre *T. cruzi* et une toxicité plus ou moins grande contre les autres cellules.

Lorsque les positions  $R_6$  et  $R_7$  sont occupées par un méthyle (**1f**), la toxicité est marquée sur l'ensemble des cellules testées y compris sur *T. cruzi*.

Un autre descripteur important est le pourcentage d'absorption qui dépend de l'aire de la surface polaire des composés. En effet, la différence entre les deux séries nous a permis de considérer ce descripteur comme étant un des éléments essentiels qui pourrait expliquer cette différence d'activité au niveau de *T. cruzi*.

Les activités de la série 2 sont corrélées aux descripteurs n-RT (nombre de liaisons libres de rotations) et  $\pi$  (caractérisant la lipophilie d'un substituant). La très bonne activité du composé **2e**, dont le radical en position R<sub>7</sub> est un méthoxyle, pourrait être expliquée par le fait que celui-ci possède un nombre de liaisons libres de rotation (7) supérieur à celui des autres composés de la série 2 (6), ce qui lui permettrait un meilleur agencement spatial.

La présence d'un fluor en position R<sub>7</sub> (**2b**), a déplacé la toxicité (par rapport à **2a**) aux niveaux des cellules en réplication (Thp-1, Vero, LLC-Mk2 et protozoaires) tout en protégeant totalement les macrophages de souris. Son mécanisme d'action est donc fortement corrélé à la réplication cellulaire. L'augmentation de l'encombrement stérique au niveau du cycle benzénique, en ajoutant un méthyle en position R<sub>6</sub> (**2f**), a montré une activité spécifique contre les cellules Thp-1 et *L. peruviana* (Tableau 3).

ID	%ABS	TPSA (Å)	n-RT	Molecular weight	miLogP	Lipophilicity ( $\Sigma\pi$ ) <sup>b</sup>	N H-bond donors	N H-bond acceptors	Lipinski's violations
rule		≤140		<500	<5		≤5	≤10	≤1
1a	73,47	103.0	5	410,43	-0,06	0.0	1	9	0
1b	73,47	103.0	5	428,42	0,08	0.14	1	9	0
<b>1d</b>	<b>73,47</b>	<b>103.0</b>	<b>5</b>	<b>424,46</b>	<b>0,37</b>	<b>0.42</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>0</b>
1e	70,29	112.2	6	440,46	-0,03	0.03	1	10	0
1f	73,47	103.0	5	438,49	0,74	0.80	1	9	0
2a	84,68	70.5	6	364,4	3,70	0.00	0	6	0
<b>2b</b>	<b>84,68</b>	<b>70.5</b>	<b>6</b>	<b>382,39</b>	<b>3,84</b>	<b>0.14</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
2c	84,68	70.5	6	398,85	4,35	0.65	0	6	0
2d	84,68	70.5	6	378,43	4,12	0.42	0	6	0
2e	81,50	79.7	7	394,43	3,73	0.03	0	7	0
<b>2f</b>	<b>84,68</b>	<b>70.5</b>	<b>6</b>	<b>392,46</b>	<b>4,50</b>	<b>0.80</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

Tableau 3 : Tableau des propriétés physico-chimiques.

%ABS, pourcentage d'absorption, calculé avec:  $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$ ; TPSA, aire de la surface topologique polaire; n-RT, nombre de liaisons libres de rotations; miLogP, logarithme du coefficient de partition des composés entre le *n*-octanol et l'eau. <sup>b</sup> Descripteur  $\pi$  caractérise la lipophilie d'un substituant défini comme la différence entre le LogP du composé substitué et le LogP du composé non-substitué.

Dans cette série (**2a-f**), nous avons pu remarquer que l'activité antiparasitaire corrélait avec le descripteur  $\pi$ . En effet, les composés les moins lipophiles, **2e** et **2b**, sont les plus antiparasitaires mais aussi les plus toxiques, alors que les composés **2c** et **2f**, les plus lipophiles, sont les plus sélectifs (sur *L. peruviana*).

La présence de radicaux en position R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> des composés de la série **2**, avec des substituants plus ou moins électronégatifs, pourrait expliquer l'activité antiparasitaire.

Nous avons poursuivi l'étude de relation structure-activité par une approche virtuelle du criblage des composés de la série **2** par arrimage (docking) sur différentes protéines. Nous avons tout d'abord cherché les protéines cristallisées inhibées par des quinoxalines [107]. Nous avons trouvé trois cibles potentielles de *T. cruzi*. Deux sont décrites comme étant des protéines essentielles du parasite (arginine kinase, code PDB : 2j1q et une glucokinase code PDB : 2q2r) [108, 109]. La troisième protéine, une poly-ADP (Ribose-polymérase) ou PARP-1, a dû être modélisée car la structure cristallographique n'existait pas chez *T. cruzi*. Cette modélisation a donné un score de 65% d'homologie avec le domaine catalytique de la protéine humaine (CatPARP-1).

Le calcul de l'énergie libre de Gibbs a été effectué sur les sites actifs des protéines. Nous avons ainsi évalué les énergies d'arrimage des différents complexes protéines-quinoxaline. (Tableau 4)

Enzyme	Energie totale (en Kcal/mol) pour les composés 2a-f					
	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2c</b>	<b>2d</b>	<b>2e</b>	<b>2f</b>
CatPARP-1	-4.80	-4.78	-5.48	-5.27	-4.95	-5.60
Arginine Kinase	-3.99	-3.96	-4.34	-4.28	-4.02	-3.77
Glucokinase	-4.05	-4.03	-3.84	-3.81	-3.60	-4.44

Tableau 4 : Energie libre de Gibbs calculé par Autodock.

La plus basse énergie démontre la meilleure affinité entre le ligand et la protéine. Nous pouvons donc remarquer que l'affinité entre la CatPARP-1 et les composés de la série **2** est la meilleure. Nous avons tenté de déterminer si les interactions d'arrimage de nos quinoxalines avec cette protéine étaient les mêmes que décrites auparavant [110]. Les interactions analogues à celles décrites dans la littérature sont des liaisons hydrogène avec le résidu de Gly 863 (Gly446 chez *T. cruzi*) et des interactions hydrophobes de liaison  $\pi$ - $\pi$  entre Tyr907 et Tyr869 (Tyr490 et Tyr479 chez *T. cruzi*) [111]. Nous avons donc pris l'exemple du composé **2b** afin de comparer ces interactions sur l'arrimage. (Figure 28 et 29 )

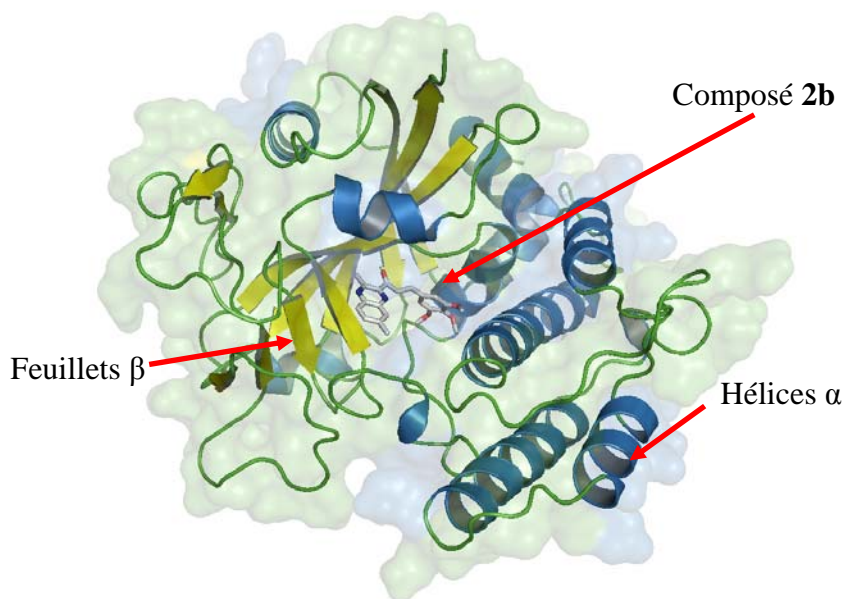


Figure 28: Modélisation de la structure secondaire de CatPARP-1 avec le composé **2b**.

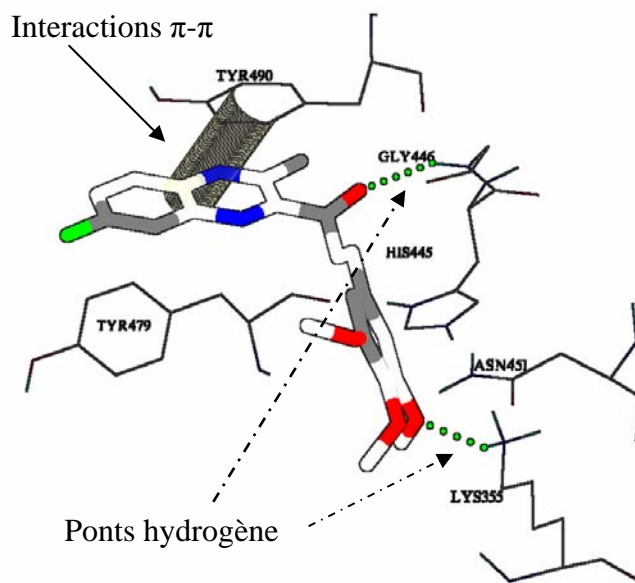


Figure 29 : Principales interactions entre CatPARP-1 et le composé **2b**.

Nous avons pu démontrer que les structures des dérivés de quinoxalines di-oxydées ou non sur les atomes d'azote exempts de cycle pyrazole doivent présenter au niveau du cycle aromatique positionné à droite de la fonction quinoxaline au moins un méthoxyle et un alcool pour être actif sur les amastigotes axéniques. La présence de trois méthoxyles sur cet anneau, rendant les composés plus lipophile, faciliterait le passage à travers des membranes plasmiques.

De plus, il est apparu que l'activité antiparasitaire était corrélée avec la lipophilie. Plus les composés étaient lipophiles et plus l'activité était sélective. En effet, les composés dont le  $\text{Log P} < 4$ , présentent une très bonne activité mais non sélective, alors que les composés avec un  $\text{Log P} > 4,2$  présentent une très bonne sélectivité sur *L. peruviana*.

Néanmoins, la lipophilie n'expliquant pas tout, l'importance de l'électronégativité des atomes en position  $R_7$  et  $R_6$  peut nous aider à comprendre les activités. En effet, les radicaux les plus électronégatifs (fluor et méthoxyle) ont montré les activités les plus fortes mais aussi les moins sélectives.

Afin d'augmenter la sélectivité, nous suggérons donc un composé avec un radical électronégatif en  $R_7$  (fluor), et un méthyle en  $R_6$  afin d'augmenter la lipophilie pour garder la sélectivité du composé sur *L. peruviana*. Le composé devra aussi garder l'accepteur de Michael qui permettra une possible liaison covalente avec des groupements nucléophiles des protéines.

## V. Discussions et perspectives

### 5.1. Etude sur les extraits de plantes

L'utilisation de plantes comme médicaments dans les pays en voie de développement reste prédominante. De plus, plus de 40% des médicaments proviennent ou sont dérivés de la nature [112].

Le Pérou est un pays présentant de nombreux écosystèmes et où différentes études ethnobotaniques ont permis de mettre en évidence l'utilisation d'un grand nombre de plantes en médecines traditionnelles [113-115]. Généralement, les deux écosystèmes les plus étudiés sont l'écosystème andin et l'écosystème amazonien pour leurs biodiversités. Des travaux antérieurs aux nôtres avaient démontré que des plantes récoltées dans des communautés andines ou amazoniennes pour leurs effets antimicrobiens, antibactériens et cicatrisants pouvaient présenter de très bonnes activités [116-120]. Peu de travaux avaient répertorié l'utilisation de plantes à visée antiprotozoaire [64, 121].

Comme cela avait été fait avec la communauté Aguaruna, nous avons pu démontrer que le travail d'investigation sur le terrain, dans des communautés amazoniennes péruviennes où la Leishmaniose est endémique, permettait de trouver de nouvelles espèces de plantes prometteuses [122]. En effet, dans la communauté Chayahuita comme chez les Yanasha, plusieurs nouvelles plantes à activité antiparasitaire ont été mises en évidence. Le fait que ces deux communautés se situent dans des biotopes différents à permis d'élargir le terrain de recherche.

Deux plantes appartenant à la famille des Verbenaceae *Lantana sp.* et *Verbena littoralis* et une à la famille des Zingiberaceae, *Hedychium coronarium* ne présentent pas de données bibliographiques, elles pourraient donc faire l'objet d'études complémentaires tant au niveau chimique que biologique afin d'isoler de nouveaux composés.

En ce qui concerne *Hyptis lacustris*, *Cestrum racemosum*, *Calea montana*, *Munnozia hastifolia*, *Renealmia alpinia*, *Renealmia thyrsoides*, *Siparuna aspera* et les plantes du genre *Piper*, elles feront l'objet d'un bioguidage afin de rechercher les composés actifs antiparasitaires contenus dans ces plantes. (Tableau 5)



ethnie	espèces	famille	Ci50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	molécule active contre <i>Leishmania sp.</i>
Yanesha	<i>Calea montana</i> Klatt	Asteraceae	10 $\pm$ 5,6	chromanones
Yanesha	<i>Munnozia hastifolia</i> (Poepp.) H. Rob. & Brettell	Asteraceae	14,1 $\pm$ 0,5	sesquiterpènes lactone
Yanesha	<i>Begonia parviflora</i> Poepp. & Endl.	Begoniaceae	18,1 $\pm$ 8,2	non connu
Yanesha	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don	Bignoniaceae	16,5 $\pm$ 4,5	triterpenes et des dérivés de quinone
Yanesha	<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	11 $\pm$ 1,2	non connu
Yanesha	<i>Hedyosmum lechleri</i> Solms	Chloranthaceae	17,9 $\pm$ 5,1	sesquiterpènes lactone
Yanesha	<i>Hyptis lacustris</i> A. St.-Hil. ex Benth.	Lamiaceae	10 $\pm$ 7,2	non connu
Yanesha	<i>Phoradendron crassifolium</i> (Pohl ex DC.) Eichler	Loranthaceae	14,2 $\pm$ 4,1	non connu
Chayahuita	<i>Piper hispidum</i> var. <i>hispidum</i> Sw.	Piperaceae	5	chalcone, amide
Chayahuita	<i>Piper strigosum</i> Trel.	Piperaceae	7,8	chalcone, amide
Yanesha	<i>Piper spl.</i>	Piperaceae	19,9 $\pm$ 5,9	chalcone, amide
Yanesha	<i>Piper dennisii</i> Trel.	Piperaceae	10 $\pm$ 1,5	chalcone, amide
Yanesha	<i>Cestrum racemosum</i> Ruiz & Pav.	Solanaceae	9,8 $\pm$ 2,6	non connu
Yanesha	<i>Solanum peruvianum</i> L.	Solanaceae	14,2 $\pm$ 4,2	défensine
Yanesha	<i>Lantana</i> sp.	Verbenaceae	10 $\pm$ 2,1	non connu
Yanesha	<i>Hedychium coronarium</i> J. König	Zingiberaceae	10 $\pm$ 2,6	Aryle-heptanoïde
Yanesha	<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas	Zingiberaceae	9 $\pm$ 0,6	Aryle-heptanoïde
Yanesha	<i>Renealmia thyrsoides</i> (Ruiz & Pavon) Poepp. & Endl.	Zingiberaceae	10 $\pm$ 0,8	aryle-heptanoïde

Tableau 5 : Tableau résumant les meilleurs extraits de plantes sur amastigotes axéniques de *L. amazonensis*

Nous pouvons voir ici un résumé des plantes les plus actives quant à leur activité sur le modèle d'amastigotes axénique du clone 1 de la souche de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012).

Si l'on regarde les molécules déjà décrites comme étant actives contre des espèces de *Leishmania*, il serait possible, dans le cas des plantes de la famille des Piperaceae, d'utiliser la technique de LC-(DAD)-(-)-(APCI) mise au point par un groupe de notre laboratoire de l'UMR-152 à Toulouse [123]. Elle consiste à injecter dans une CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) un extrait brut qui, après ionisation négative par une interface d'ionisation chimique à pression atmosphériques (APCI : Atmospheric pressure chemical ionization) à température ambiante, est analysé sur un spectromètre de masse à trappe d'ions. Cette technique d'analyse, basée sur les informations données par les spectres Ultraviolets (UV) et ceux enregistrés par Spectrométrie de masse Multiple ( $MS^n$ ), permet de déterminer les structures chimiques directement depuis l'analyse des fragments. Cela permettrait un gain de temps au niveau de la détermination des structures actives de types flavonoïdes tels que des flavanones ou des chalcones (connues pour leurs propriétés antiparasitaires).

## 5.2. Étude sur des dérivés de quinoxalines

Les dérivés de quinoxalines sont des composés de synthèse connus et utilisés depuis les années 1940 pour leur activité antibactérienne. Aujourd'hui, leurs propriétés biologiques sont très diversifiées (antifongiques, antiviraux, anticancéreux, insecticides) [124].

Le C.I.F.A (Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada) de l'université de Pampelune (Espagne) est expert dans la synthèse de ces dérivés. Depuis 2003, une collaboration existe avec notre laboratoire pour l'étude antiprotozoaire des composés synthétisés.

Aucun article jusqu'à ce jour ne reportait l'activité leishmanicide de ces dérivés de quinoxalines. Il a donc été intéressant d'évaluer ces composés sur les modèles du laboratoire et d'étudier les relations structures-activités de ces composés. Lors d'un premier criblage, nous avons étudié des composés qui avaient démontré des activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Il aurait été intéressant de pouvoir évaluer des composés pour lesquels la position en R<sub>7</sub> aurait été occupée par les mêmes substituants que R<sub>6</sub> (la position R<sub>6</sub> n'étant occupée que par un H) mais la synthèse plus ou moins complexe de certains composés ne l'a pas permis.

L'étude de la relation structure-activité effectuée en s'intéressant à certaines propriétés physico-chimiques tels que le pourcentage d'absorption, le nombre de liaison libre de rotation ou les composés présentant les caractéristiques adéquates de la règle de Lipinski (comme leurs propriétés lipophiles), nous a permis de déterminer des relations existantes entre les résultats biologiques et ces propriétés.

Les composés **2b** et **2f** des quinoxalines non oxydées, présentaient les résultats les plus intéressants et méritaient d'approfondir leur mode d'action par une étude d'arrimage. Nous avons utilisé les différences existantes entre les parasites et l'Homme afin de rechercher des cibles potentielles pour des molécules avec une très haute sélectivité [1].

La comparaison des 3 génomes de Trypanosomatidae (*T. brucei*, *T. cruzi* et *L. major*) en terme de contenu des gènes et d'architecture du génome a démontré qu'environ 6200 gènes étaient conservés [125]. La recherche de cibles potentielles biologiques de composés antiparasitaires, par exemple sur des enzymes, est motivée par le fait que les parasites ont des enzymes spécifiques indispensables à la survie du parasite, comme par exemple l'ornithine décarboxylase qui permet au parasite le contrôle de la formation de la putrescine qui est sa réserve majeur de polyamine chez *leishmania sp.* [126, 127]. Cette enzyme est aussi présente

chez l'Homme mais la constante d'affinité et un " turn-over " plus rapide (10 fois supérieur avec du DMFO chez *T.brucei*) en font une très bonne cible [1].

Selon les données de la littérature, certaines quinoxalines ont des propriétés inhibitrices de la PARP-2 de souris [128, 129]. Il a été démontré que le domaine catalytique, tant au niveau de la PARP-1 humaine que de la PARP-2 de souris était identique. De plus, la comparaison de la triade protéique catalytique (H-Y-E) du site de fixation de la Nicotinamide Adénosine dinucléotide (NAD) a démontré une conservation au niveau des protéines de la PARP de *T. cruzi* et *T. brucei* [130].

Une base de données de cibles protéiques de *T. brucei* est disponible sur internet, référencant les cibles suivant un degré d'intérêt thérapeutique et de spécificité [107]. Nous avons donc voulu savoir si nos composés antiparasitaires étaient des inhibiteurs de protéines spécifiques (glucokinase, arginine-kinase et CatPARP-1). Nous avons pu conclure que la PARP-1 pourrait être une cible possible de nos quinoxalines.

Afin de poursuivre l'étude fonctionnelle de ces composés, il serait donc intéressant de marquer ces derniers par une étiquette chimique telle qu'un azide ( $N_3$ ) ou une liaison acétylénique sur l'un des deux cycles aromatiques sous réserve que l'activité pharmacologique soit conservée [131]. Ces étiquettes permettraient la ligation avec un fluorophore, porteur de l'étiquette complémentaire conduisant à la détection de composé marqué. Cette approche générale pourrait permettre : i) l'identification des cibles cellulaires par protéomique chimique, ii) la localisation cellulaire du composé (étude de bio-transport *in cellulo*), iii) une étude de métabolisation avec détection directe sur extraits cellulaires (figure 30).



Figure 30 : Schéma de ligation agent pharmacologique-fluorophore par chimie " clic "[132].

Cette ligation est très chimio-sélective et totalement régio-sélective. Par ailleurs, les fonctions chimiques telles que  $N_3$  et triple liaison permettent un maintien de l'activité pharmacologique.

Il est à noter que nos inhibiteurs sont très électro-appauvris, particulièrement sous forme N oxydé. Ils sont donc susceptibles de former des liaisons covalentes avec des protéines présentant des résidus thiols (CYS), amines (LYS) ou alcools (SER/THR).

L'étiquetage faciliterait grandement une étude des cibles par protéomique chimique (détection du complexe cible-quinoxaline-fluorophore par une électrophorèse 2d puis identification de la/des cible(s) par spectroscopie de masse). Exemple de molécule étiquetée. (figure 31)

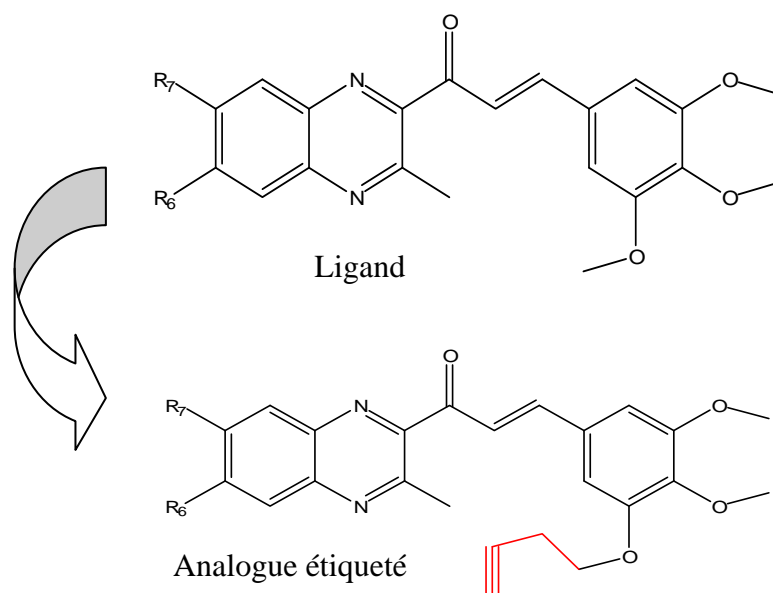


Figure 31 : Conception d'un analogue étiqueté structurellement très proche du ligand de référence.

C'est une étude qui pourrait se faire au niveau du laboratoire de l'UMR-152 à Toulouse.

## VI. Conclusion

La nécessité de trouver de nouvelles molécules leishmanicides reste une priorité de santé publique pour les pays du Sud où sévit cette maladie.

A l'heure actuelle, le Pérou est un pays encore riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles encore bien vivant. Dans les zones d'endémie de Leishmaniose, ces pharmacopées traditionnelles comportent des traitements pour soigner cette pathologie et il est donc toujours d'actualité de penser que de nouvelles molécules antiparasitaires puissent continuer à être isolées des plantes amazoniennes. D'une part, notre travail avec les communautés amérindiennes, Chayahuita et Yanasha, nous a permis de nous centrer sur ce groupe de plantes connues et utilisées. Ce travail de terrain a été validé grâce à des modèles scientifiquement reconnus démontrant l'utilité, encore une fois, de la recherche ethnopharmacologique. D'autre part, ce genre de travail permet de sauvegarder une connaissance en voie de disparition<sup>1</sup>.

Les études chimiques de plantes récoltées pourront peut-être mettre à jour de nouvelles structures et donc faciliter la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouvelles têtes de liste de pharmacophores.

En ce qui concerne les composés de synthèse, l'étude relation structure-activité nous a permis de corréler les résultats biologiques avec des facteurs structurels connus comme descripteurs moléculaires. Cette étude est très importante si l'on veut améliorer l'effet biologique de ces composés. Nous avons pu mettre en évidence les structures les plus efficaces, ce qui permettra la synthèse de molécules potentiellement plus actives en les rendant moins toxiques et en améliorant leur biodisponibilité. L'étude *in vivo* viendra confirmer ou infirmer ces premiers résultats biologiques.

L'ensemble de ces travaux repose sur un modèle biologique utilisant des animaux de laboratoire et par soucis éthique nous avons mis au point un autre modèle pour le substituer. Nous avons démontré que le remplacement des macrophages extraits de rongeurs par des cellules monocytaires était valide pour le criblage de composés leishmanicides. En effet, les

---

<sup>1</sup> Ce travail d'inventaire a permis l'édition d'un livre «YATO' RAMUESH : PLANTAS MEDICINALES YANESHAS » permettant d'enregistrer cette connaissance orale, et qui se présente comme un retour d'information aux communautés concernées.

cellules de la lignée Thp-1 peuvent être transformées en macrophages activés et être infectées avec une souche de *L. peruviana* (MHOM/PE/LCAO8). Pour l'instant, cette étude a été menée sur une seule souche de *L. peruviana*, il serait intéressant de comparer différentes souches isolées de patients ou de hamster afin de renforcer la validation du modèle.

## VII. Bibliographie

1. Myler, P.J. and N. Fasel, *Leishmania : after the genome*. british ed. 2008: Caiser Academic Press.
2. Dedet, J.P., *Les Leishmanioses*. france ed. 1999: Ellipses Paris.
3. Lainson, R., et al., *Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of Leishmania from armadillos (Dasypus novemcinctus), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Para State*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1979. **73**(2): p. 239-42.
4. Lainson, R., et al., *Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. Trypanosoma cruzi infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1979. **73**(2): p. 193-204.
5. Lainson, R., P.D. Ready, and J.J. Shaw, *Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of Leishmania peruviana, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, Lutzomyia longipalpis*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1979. **206**(1164): p. 307-18.
6. Barker, D.C. and J. Butcher, *The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the Leishmania mexicana and L. braziliensis complexes*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1983. **77**(3): p. 285-97.
7. Mendoza-Leon, A., et al., *Molecular markers for species identification in the Leishmania subgenus Viannia*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96 Suppl 1**: p. S65-70.
8. Sacks, D.L., *Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence*. Cell Microbiol, 2001. **3**(4): p. 189-96.
9. Ashford, R.W., *Leishmaniasis Reservoirs and Their signifiacne and control*. Clinics in Dermatology, 1996. **14**: p. 523-532.
10. Killick-Kendrick, R., *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review*. Med Vet Entomol, 1990. **4**(1): p. 1-24.
11. <http://www.mimig.ucla.edu/faculty/campbell/lecture4ppt.pdf>. [cited].
12. Gott, J.M., *Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10583-4.
13. McConville, M.J., et al., *Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage*. Embo J, 1992. **11**(10): p. 3593-600.
14. Ouellette, M., et al., *[Studies on the parasite Leishmania in the post-genomic era]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(10): p. 900-9.
15. Handman, E., *Leishmaniasis: current status of vaccine development*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 229-43.
16. Schlein, Y., *Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission*. Parasitol Today, 1993. **9**(7): p. 255-8.
17. Killick-Kendrick, R. and D.H. Molyneux, *Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1981. **75**(1): p. 152-4.
18. W.H.O. *Lutte contre la leishmaniose*. in *SOIXANTIEME ASSEMBLEE MONDIALE DE LA SANTE*. 2007.
19. Reithinger, R., et al., *Cutaneous leishmaniasis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(9): p. 581-96.
20. Alvar, J., et al., *Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 298-319.



21. Desjeux, P., *Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 77-9.
22. Dye, C. and B.G. Williams, *Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited*. Proc Biol Sci, 1993. **254**(1339): p. 33-9.
23. [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index1.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html). [cited.
24. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. **64**: p. 1-109.
25. Filippi, C., et al., *L'immunité contre les leishmanies*. médecine/sciences, 2001. **17**: p. 1120-1128.
26. INS, *Módulos Técnicos series de Documentos Monográfico*. 2000, Ministerio de Salud-Oficina General de Epidemiología: Lima. p. 1-80.
27. Grevelink, S.A. and E.A. Lerner, *Leishmaniasis*. J Am Acad Dermatol, 1996. **34**(2 Pt 1): p. 257-72.
28. [http://video.who.int/streaming/Kala-Azar\\_Peru\\_esp.wmv](http://video.who.int/streaming/Kala-Azar_Peru_esp.wmv). [cited.
29. Grogl, M., T.N. Thomason, and E.D. Franke, *Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **47**(1): p. 117-26.
30. Baiocco, P., et al., *Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis*. J Med Chem, 2009. **52**(8): p. 2603-12.
31. Sau, K., et al., *The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37561-8.
32. Basselin, M., et al., *Resistance to pentamidine in Leishmania mexicana involves exclusion of the drug from the mitochondrion*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 3731-8.
33. Mukherjee, A., et al., *Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **145**(1): p. 1-10.
34. Sundar, S., et al., *Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(3): p. 193-6.
35. Croft, S.L. and G.H. Coombs, *Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. Trends Parasitol, 2003. **19**(11): p. 502-8.
36. Berman, J., *Clinical status of agents being developed for leishmaniasis*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. **14**(11): p. 1337-46.
37. Soto, J., et al., *Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, 2008. **78**(2): p. 210-1.
38. Yardley, V., et al., *The sensitivity of clinical isolates of Leishmania from Peru and Nepal to miltefosine*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**: p. 272-275.
39. Wasunna, M.K., et al., *A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(5): p. 871-6.
40. Jha, T.K., et al., *A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(6): p. 1005-11.
41. Buates, S. and G. Matlashewski, *Identification of genes induced by a macrophage activator, S-28463, using gene expression array analysis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1137-42.
42. Arevalo, I., et al., *Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(11): p. 1847-51.

43. Miranda-Verastegui, C., et al., *Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(10): p. 1395-403.
44. Berman, J., *Current treatment approaches to leishmaniasis*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(5): p. 397-401.
45. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 111-26.
46. Aponte, J.C., et al., *A Multipronged Approach to the Study of Peruvian Ethnomedicinal Plants: A Legacy of the ICBG-Peru Project ( big up tri, open)*. J Nat Prod, 2009. **72**(3): p. 524-526.
47. Kier, G., et al., *A global assessment of endemism and species richness across island and mainland regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.
48. Sánchez-Saldaña, L., et al., *Leishmaniasis*. Dermatología Peruana, 2004. **14**(2): p. 83-98.
49. Lucas, C.M., et al., *Leishmania (Viannia) lainsoni: first isolation in Peru*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(5): p. 533-7.
50. Lucas, C.M., et al., *Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(2): p. 312-7.
51. Perez, E., et al., *Natural Leishmania infection of Lutzomyia spp. in Peru*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88**(2): p. 161-4.
52. Llanos-Cuentas, E.A., et al., *Natural infections of Leishmania peruviana in animals in the Peruvian Andes*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999. **93**: p. 15-20.
53. *Protocolos de Vigilancia Epidemiológica*. 2004, Oficina General de Epidemiología - Ministerio de Salud: Lima.
54. Kvist, L.P., et al., *Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis*. J Ethnopharmacol, 2006. **106**(3): p. 390-402.
55. OCHOA, N., *Introducción a la Fitoterapia Chayahuita*. Amazonía Peruana, 1999. **26**: p. 119-142 p.
56. Hamlin, C.C. and J. Salick, *YANESHA AGRICULTURE IN THE UPPER PERUVIAN AMAZON: PERSISTENCE AND CHANGE FIFTEEN YEARS DOWN THE 'ROAD'*. Economic Botany, 2003. **57**(2): p. 163-180.
57. Salick, J., *Toward an Integration of Evolutionary Ecology and Economic Botany: Personal Perspectives on Plant/People Interactions*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995. **82**(1): p. 25-33.
58. Gebre-Hiwot, A., et al., *An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1*. Acta Trop, 1992. **51**(3-4): p. 237-45.
59. Maia, C., et al., *Infectivity of five different types of macrophages by Leishmania infantum*. Acta Trop, 2007. **103**(2): p. 150-5.
60. Barassi, N., F. Benavides, and A. Ceccarelli, *[Ethics in the use of experimental animals]*. Medicina (B Aires), 1996. **56**(5 Pt 1): p. 531-2.
61. Sereno, D. and J.L. Lemesre, *Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(5): p. 972-6.
62. Sauvain, M., et al., *In vitro and in vivo leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids*. Phytotherapy Leishmanicidal, 1993. **7**: p. 167-171.
63. Fautz, R., B. Husein, and C. Hechenberger, *Application of the neutral red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes: rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS)*. Mutat Res, 1991. **253**(2): p. 173-9.

64. Castillo, D., et al., *Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with Himatanthus sucuuba (Apocynaceae)*. J Ethnopharmacol, 2007. **112**(2): p. 410-4.
65. Park, E.K., et al., *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli*. Inflammation Research, 2007. **56**: p. 45–50.
66. Sereno, D. and J.L. Lemesre, *Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of Leishmania amazonensis in vitro*. Parasitol Res, 1997. **83**(4): p. 401-3.
67. Delorenzi, J.C., et al., *Antileishmanial activity of an indole alkaloid from Peschiera australis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1349-54.
68. Dedet, J.P., R. Pradinaud, and F. Gay, *Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1989. **83**(5): p. 616-20.
69. Fournet, A., A.A. Barrios, and V. Munoz, *Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants*. J Ethnopharmacol, 1994. **41**(1-2): p. 19-37.
70. Chen, M., et al., *Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(12): p. 2550-6.
71. Hermoso, A., et al., *Antileishmanial activities of dihydrochalcones from piper elongatum and synthetic related compounds. Structural requirements for activity*. Bioorg Med Chem, 2003. **11**(18): p. 3975-80.
72. Torres-Santos, E.C., et al., *Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from Piper aduncum on Leishmania amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(5): p. 1234-41.
73. Soares, D.C., et al., *Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from Tabernaemontana catharinensis*. Parasitol Int, 2007. **56**(2): p. 135-9.
74. Munoz, V., et al., *Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from Peschiera van heurkii (syn. Tabernaemontana van heurkii)*. Planta Med, 1994. **60**(5): p. 455-9.
75. Bertani, S., et al., *Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies*. J Ethnopharmacol, 2005. **98**(1-2): p. 45-54.
76. Chan-Bacab, M.J. and L.M. Pena-Rodriguez, *Plant natural products with leishmanicidal activity*. Nat Prod Rep, 2001. **18**(6): p. 674-88.
77. Vigneron, M., et al., *Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study*. J Ethnopharmacol, 2005. **98**(3): p. 351-60.
78. Jenett-Siems, K., et al., *Sipaucins A-C, sesquiterpenoids from Siparuna pauciflora*. Phytochemistry, 2003. **63**(4): p. 377-81.
79. Jenett-Siems, K., et al., *In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants*. Trop Med Int Health, 1999. **4**(9): p. 611-5.
80. Jenett-Siems, K., et al., *Sipandinolide: a butenolide including a novel type of carbon skeleton from Siparuna andina*. Planta Med, 2000. **66**(4): p. 384-5.
81. Grenand, P., et al., *Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles, Palikur, Wayãpi*, ed. IRD. 2004, Paris. 816 pp.
82. Flores, N., et al., *Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity*. J Nat Prod, 2008. **71**(9): p. 1538-43.
83. Flores, N., et al., *Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species*. Phytochemistry, 2009. **70**(5): p. 621-7.
84. Portet, B., et al., *Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from Piper hostmannianum var. berbicense*. Phytochemistry, 2007. **68**(9): p. 1312-20.
85. Kenmogne, M., et al., *Five labdane diterpenoids from the seeds of Aframomum zambesiacum*. Phytochemistry, 2006. **67**(5): p. 433-8.

86. Fournet, A., et al., *Antiprotozoal activity of Dehydrozaluzein-C, a sesquiterpene lactone isolated from Munnozia maronii (Asteraceae)*. *Phytotherapy Research*, 1993. **7**: p. 111-115.
87. Chukwujekwu, J.C., et al., *Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of Hyptis suaveolens*. *J Ethnopharmacol*, 2005. **102**(2): p. 295-7.
88. do Nascimento, A.M., et al., *Chromanones with leishmanicidal activity from Calea uniflora*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2007. **62**: p. 353-356.
89. do Nascimento, A.M., et al., *Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from Calea uniflora (Heliantheae, Asteraceae)*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004. **56**: p. 663-644.
90. Bourdy, G., L.R. Chavez de Michel, and A. Roca-Coulthard, *Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno-Guarani (Bolivian Chaco)*. *J Ethnopharmacol*, 2004. **91**(2-3): p. 189-208.
91. Fouad, M.A., et al., *Cesdiurins I-III, steroidal saponins from Cestrum diurnum L*. *Nat Med (Tokyo)*, 2008. **62**(2): p. 168-73.
92. Germonprez, N., et al., *In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from Maesa balansae and some chemical derivatives*. *J Med Chem*, 2005. **48**(1): p. 32-7.
93. Kunnumakkara, A.B., et al., *Coronaridin D, a labdane diterpene, inhibits both constitutive and inducible nuclear factor-kappa B pathway activation, leading to potentiation of apoptosis, inhibition of invasion, and suppression of osteoclastogenesis*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(10): p. 3306-17.
94. Das, R., et al., *Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in Leishmania donovani*. *Apoptosis*, 2008. **13**(7): p. 867-82.
95. Burguete, A., et al., *Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(23): p. 6439-43.
96. Aguirre, G., et al., *Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of Trypanosoma cruzi. Structure-activity relationships*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**(14): p. 3835-9.
97. Urquiola, C., et al., *Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N1,N4-dioxide derivatives by complexation with vanadium*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(16): p. 5503-9.
98. Marin, A., et al., *Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives*. *Exp Parasitol*, 2008. **118**(1): p. 25-31.
99. Vicente, E., et al., *Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents*. *Eur J Med Chem*, 2008. **43**(9): p. 1903-10.
100. Zarranz, B., et al., *Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives*. *Arzneimittelforschung*, 2005. **55**(12): p. 754-61.
101. Monzote Fidalgo, L., et al., *Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004. **99**(3): p. 329-30.
102. Ogunkolade, B.W., et al., *Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of Leishmania*. *Acta Trop*, 1990. **47**(3): p. 171-6.

103. Rogers, P.D., et al., *Heat-induced superaggregation of amphotericin B attenuates its ability to induce cytokine and chemokine production in the human monocytic cell line THP-1*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. **51**: p. 405–408.
104. Sau, K., et al., *The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(39): p. 37561–37568.
105. Aponte, J.C., et al., *Synthesis, cytotoxicity, and anti-Trypanosoma cruzi activity of new chalcones*. J Med Chem, 2008. **51**(19): p. 6230-4.
106. Gonzalez, G., et al., *Leishmania (Viannia) peruviana (MHOM/PE/LCA08): Comparison of THP-1 cell and murine macrophage susceptibility to axenic amastigotes for the screening of leishmanicidal compounds*. Exp Parasitol, 2009. **122**: p. 353-256.
107. <http://www.tryptargets.org/index.html>. [cited.
108. Caceres, A.J., et al., *Molecular and biochemical characterization of novel glucokinases from Trypanosoma cruzi and Leishmania spp.* Mol Biochem Parasitol, 2007. **156**(2): p. 235-45.
109. Pereira, C.A., et al., *Trypanosoma cruzi arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1495-501.
110. Costantino, G., et al., *Modeling of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors. Docking of ligands and quantitative structure-activity relationship analysis*. J Med Chem, 2001. **44**(23): p. 3786-94.
111. Ruf, A., et al., *Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7481-5.
112. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. J Nat Prod, 2007. **70**(3): p. 461-77.
113. Hammond, G.B., et al., *A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru*. J Ethnopharmacol, 1998. **61**(1): p. 17-30.
114. Sanz-Biset, J., et al., *A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon)*. J Ethnopharmacol, 2009. **122**(2): p. 333-62.
115. De-la-Cruz, H., G. Vilcapoma, and P.A. Zevallos, *Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru*. J Ethnopharmacol, 2007. **111**(2): p. 284-94.
116. Villegas, L.F., et al., *Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru*. J Ethnopharmacol, 1997. **55**(3): p. 193-200.
117. Kloucek, P., et al., *Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District*. J Ethnopharmacol, 2005. **99**(2): p. 309-12.
118. Kloucek, P., et al., *Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon*. J Ethnopharmacol, 2007. **111**(2): p. 427-9.
119. Neto, C.C., et al., *Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas*. J Ethnopharmacol, 2002. **79**(1): p. 133-8.
120. Rojas, R., et al., *Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants*. J Ethnopharmacol, 2003. **88**(2-3): p. 199-204.
121. Roumy, V., et al., *Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity*. J Ethnopharmacol, 2007. **112**(3): p. 482-9.
122. Lewis, W.H., et al., *Peruvian Medicinal Plant Sources Of New Pharmaceuticals (International Cooperative Biodiversity Group-Peru)*. Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy), 1999. **37**: p. 69-83.

123. Portet, B., et al., *Analysis of minor flavonoids in Piper hostmannianum var. berbicense using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1210**(1): p. 45-54.
124. Carta, A., P. Corona, and M. Loriga, *Quinoxaline 1,4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities*. Curr Med Chem, 2005. **12**(19): p. 2259-72.
125. El-Sayed, N.M., et al., *Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa*. Science, 2005. **309**(5733): p. 404-9.
126. Myler, P.J., *Searching the Tritryp genomes for drug targets*. Adv Exp Med Biol, 2008. **625**: p. 133-40.
127. Wang, C.C., *Parasite enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **27**(1): p. 1-9.
128. Ishida, J., et al., *Discovery of potent and selective PARP-1 and PARP-2 inhibitors : SBDD analysis via a combination of X-ray structural study and homology modeling*. Bioorg. Med. Chem., 2006. **14**: p. 1378–1390.
129. Iwashita, A., et al., *Discovery of quinazolinone and quinoxaline derivatives as potent and selective poly(ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitors*. FEBS Letters, 2005: p. 1389-1393.
130. Fernandez Villamil, S.H., et al., *TcPARP : A DNA damage-dependent poly(ADP-ribose)polymerase from Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology, 2008. **38**: p. 277-287.
131. Kolb, H.C. and K.B. Sharpless, *The growing impact of click chemistry on drug discovery*. DDT, 2003. **8**(24): p. 1128-1137.
132. [www.enscp.fr/IMG/jpg/clicCG25\\_.jpg](http://www.enscp.fr/IMG/jpg/clicCG25_.jpg). [cited.

## **Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité.**

Les Leishmanioses du nouveau monde sont des parasitoses aux conséquences socio-économiques lourdes. En effet les traitements disponibles requièrent pour la plus part des administrations parentérales et sont coûteux pour les populations concernées. La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternative thérapeutiques, nous nous sommes intéressés d'une part aux pharmacopées traditionnelles de populations vivant en zone d'endémie (deux ethnies de l'Amazonie péruvienne : Chayahuita et Yanasha) et d'autre part, nous avons également étudiés l'activité de drogues synthétisées sur la base de molécules ayant un certain degré d'activité antiparasitaire. Nous avons également contribué à l'amélioration éthique de nos modèles biologiques afin d'optimiser le criblage de composés leishmanicides potentiels en développant un modèle remplaçant l'utilisation de souris pour l'extraction de macrophages par des cellules Thp1.

**Mots clés : Leishmaniose, Pérou, Ethnopharmacologie, Quinoxalines**

---

### **Leishmanicidal activity of plants from the Peruvian traditional pharmacopeia and the molecules of synthesis; study structure-activity relationship.**

New world Leishmaniasis are parasitosis with heavy socio-economic consequences. Nowadays the commercially available treatments require parenteral administrations and are not affordable for the concerned populations. The search for new active molecules is thus urgently needed. To contribute to the research effort of therapeutic alternative, we were interested in traditional pharmacopeia of populations living in endemic zone (two ethnic groups of Peruvian Amazonia: the Chayahuita and the Yanasha) and we also studied the activity of synthesized drugs, starting from molecules having some already known activity. We also contributed to the ethic improvement of our biological models in order to optimize the screening of potential leishmanicidal compounds, by developing a model replacing the use of mouse for the extraction of macrophages by Thp1 cells.

---