

Short Communication

ACTIVITÉ ANTIPARASITAIRE D'ALCALOÏDES BISBENZYLISOQUINOLEIQUES. I: ACTIVITÉ IN VITRO SUR DES PROMASTIGOTES DE TROIS SOUCHES DE *LEISHMANIA*

A. FOURNET^a, V. MUÑOZ^a, A.M. MANJON^a, A. ANGELO^a, R. HOCQUEMILLER^b, D. CORTES^b, A. CAVE^b and J. BRUNETON^c

^aLaboratoire de Pharmacognosie, ORSTOM-IBBA, CP 824, La Paz (Bolivia) ^bLaboratoire de Pharmacognosie, UA 496 CNRS, Faculté de Pharmacie, 92296, Châtenay-Malabry, Cedex, et ^cLaboratoire de Pharmacognosie, Centre d'Etudes des Plantes Médicinales, Faculté de Pharmacie, 16 Bd Daviers, 49000 Angers (France)

(Accepted July 20, 1988)

Summary

Leishmaniasis caused by protozoan *Leishmania* spp., is an endemic parasitic disease in Central and South America. The chemotherapeutic agents against *Leishmania* spp. (pentavalent antimony compounds, pentamidine and amphotericin B) are toxic and expensive products. Basing on the Bolivian folk medicine, we tried to find new active principles. Fourteen isoquinoline alkaloids, especially bisbenzylisoquinoline alkaloids extracted from Annonaceae, Berberidaceae, Hernandiaceae and Menispermaceae, demonstrate highly effective activity against this protozoan. Among them glyocarpine, daphnandrine and obaberine seem to be of particular interest. The therapeutic effect was studied by biological assays on culture forms in vitro three strains of *Leishmania*, *L. donovani*, *L. braziliensis* (cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis), *L. mexicana amazonensis* (cutaneous) and *L. donovani* (visceral leishmaniasis).

Introduction

Les leishmanioses sont une des causes importantes de morbidité et de mortalité dans les pays en voie de développement (Mahmoud et al., 1977), en particulier en Amérique du Sud. La Bolivie est particulièrement touchée par cette parasitose du fait de la migration importante des populations d'origine altiplanique dans les zones tropicales (Yungas ou Alto-Beni). Les parasites, les leishmanies, sont des protozoaires de l'ordre des kinetoplastida dont on

décrit deux formes, la forme intracellulaire ou amastigote et la forme extracellulaire promastigote, qui n'apparaît que dans les cultures et chez l'insecte vecteur, le phlébotome (Gentilini et al., 1982).

Les traitements les plus couramment employés contre les leishmanioses (cutanée, cutanéomuqueuses et viscérale) sont les dérivés antimoniés pentavalents (Glucantime et Pentostam), l'amphotéricine B et la pentamidine. Ces traitements présentent l'inconvénient d'être souvent mal tolérés et difficilement administrables dans les zones d'endémies, qui ne bénéficient pas toujours d'infrastructures sanitaires appropriées.

Des nouvelles molécules ou des médicaments potentiels font actuellement l'objet de recherches, tels que l'itraconazole (Borelli, 1987), le ketoconazole (Berman, 1981; Berman et al., 1984; Weinbauch et al., 1984), les dérivés de l'inosine (Lafon et al., 1985), les dérivés de l'amino-8 quinoléine (Berman et Lee, 1983a), la formycine B (Carson et Kwang-Poo-Ghang, 1981; Berman et al., 1983b), la sinefungine (Paolantonacci et al., 1985) ou la carnitine et ses esters (Cooper et Coombs, 1985).

Il existe peu de travaux sur l'activité de produits d'origine naturelle sur les *Leishmania* sp. Parmi les produits d'origine naturelle utilisés, on peut citer la berbérine isolée de *Berberis aristida* L. (Berberidacées) en Inde dans le traitement de la leishmaniose cutanée (Munshi et al., 1972), et des quassinoides extraits de Simaroubacées dans la leishmaniose viscérale provoquée par *Leishmania donovani* (Robert-Gero et al., 1985).

Suite à des observations de l'un de nous lors d'enquêtes ethnopharmacologiques dans les zones d'endémies boliviennes (Yungas et Alto-Beni), sur l'emploi des plantes dans le traitement de diverses formes de leishmanioses par les indiens Chimane ou d'autres ethnies natives, nous avons remarqué l'utilisation fréquente en particulier dans le traitement des formes cutanées, sous forme de cataplasmes de broyats de feuilles, d'écorces ou de racines de plantes appartenant à la famille des Annonacées, des Berbéridacées, des Hernandiacees ou des Ménispermacées. Or ces familles sont caractérisées par la présence d'alcaloïdes isoquinoléiques, en particulier de bisbenzyl-tétrahydroisoquinoléines proches de la berbérine déjà citée pour son emploi dans le traitement de leishmaniose cutanée. Disposant d'alcaloïdes de ce type, isolés à partir de plantes en majorité récoltées en Bolivie ou sur le continent sud américain par des équipes ORSTOM, nous avons donc entrepris l'étude de l'activité in vitro de ces produits d'origine naturelle sur les promastigotes de trois souches de *Leishmania* ssp.

Dans le cadre de nos recherches, à l'IBBA, sur de nouvelles molécules actives sur les leishmanioses, nous avons choisi 14 alcaloïdes bisbenzyl-tétrahydroisoquinoléiques, représentant six types structuraux:

(1) Quatre bisbenzylisoquinoléines de type "tête à tête" à deux ponts éther en 7-8' et 11-12', la daphnandrine, la daphnoline isolées d'un *Albertisia papuana* (Ménispermacées) (Lavault et al., 1987), l'obabérine isolée de *Pseudoxandra sclerocarpa* Annonacées (Cortes et al., 1984) et de *Berberis boliviana* (Weber et al., 1988) et la gyrocarpine isolée de *Gyrocarpus americanus* (Hernandiacees) (Chalandre et al., 1986).

(2) Quatre bisbenzylisoquinoléines de type "tête à tête, queue à queue" à deux ponts éther en 8-7' et 11-12', la krukovine de *Curarea candicans* (Menispermacées) (Lavault et al., 1985), la limacine de *Caryomene olivascens* (Ménispermacées) (Lavault et al., 1986), et la phaeanthine de *Gyrocarpus americanus* (Chalandre et al., 1986).

(3) Une bisbenzylisoquinoléine "tête à tête, queue à queue" à un pont éther en 8-7' et à un pont biphényle, l'antioquine isolée d'une Annonacée colombienne, *Pseudoxandra sclerocarpa* (Cortes et al., 1985).

(4) Une bisbenzylisoquinoléine avec trois ponts éther, la cocsuline isolée d'*Albertisia papuana* (Lavault et al., 1987).

(5) Une bisbenzylisoquinoléine de type "tête à queue" à un pont éther, la malekulatine isolée d'*Hernandia peltata* (Hernandiacees) (Bruneton et al., 1983).

(6) Trois bisbenzylisoquinoléines de type "tête à queue" à deux ponts éther, la chondodendrine, la cycléanine, et l'isochondodendrine, isolées de trois Annonacées du genre *Isolona* (Hocquemiller et al., 1984) et de *Curarea candicans* (Menispermacées) (Lavault et al., 1985).

Nous avons étudié l'activité in vitro de ces quatorze alcaloïdes sur les promastigotes de trois souches de *Leishmania* ssp. endémiques de la Bolivie, la souche responsable de la "espundia", *Leishmania brasiliensis brasiliensis* (leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse), *Leishmania mexicana amazonensis* (responsable de leishmaniose cutanéomuqueuse et diffuse) et *Leishmania donovani* (responsable de leishmaniose viscérale).

Matériel et méthodes

Les alcaloïdes étudiés ont été isolés de source naturelle (voir ci-dessus).

Les souches de *Leishmania* sont les suivantes: *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, (Réf:MHOM/BR/75/M 2903) originaire du Brésil, *Leishmania mexicana amazonensis*, (Réf:MHOM/GF/84 CAY H142), isolée d'un malade en Guyane française, et *Leishmania donovani* (MHOM/IN/83/HS 70), originaire d'Inde.

Toutes ces souches ont été rétypifiées en isoenzymes à l'IBBA, par le Dr. P. Desjeux.

Les *Leishmania* sous forme promastigotes ont été cultivés à 28°C dans le milieu NNN liquide (Novy, Mac Neal et Nicolle) avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté.

Les alcaloïdes ont été dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) puis dans le milieu de culture, la concentration finale de DMSO n'excédant pas 0.5%; dans ces conditions, son emploi n'affecte pas la croissance des parasites.

Le milieu est ensuite filtré sur filtre Millipore de 0.22 μ M.

A 1 ml de milieu avec parasites, on ajoute 1 ml d'une solution d'alcaloïde dans le milieu pour obtenir une concentration finale de 50 μ g/ml, 25 μ g/ml et 10 μ g/ml.

Les promastigotes sont utilisés en phase de croissance exponentielle à la

TABLEAU 1

ACTIVITÉ IN VITRO DES ALCALOÏDES SUR LES PROMASTIGOTES DE LEISMANIA

(A = *L. brasiliensis brasiliensis*; B = *L. mexicana amazonensis*; C = *L. donovani*)

	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	A	% Inhib.	B	% Inhib.	C	% Inhib.
TÉMOINS							
Glucantime	0	16.6		13.3		17	
	50	16.1	9.13	11.2	15.8	17	2.9
	25	16.7	0	12.6	5.3	17	0
	10	16.9	0	12.7	4.5	17	0
Allopurinol	0	16.6		13.3		17	
	50	12.5	24.7	11.2	15.8	14	21.8
	25	13.3	19.9	12.6	5.3	15	15.5
	10	14.8	10.8	12.8	3.8	15	15.5
ALCALOÏDES							
Daphnandrine	0	5.8		7		7.2	
	50	0.2	96.6	0.2	97.1	0.4	94.4
	25	0.5	91.4	2.3	67.1	2	72.2
	10	4.3	25.9	2.9	58.6	4	44.4
Daphnoline	0	5.8		7		7.2	
	50	4.7	19	1.5	75.7	5.8	19.4
	25	4.8	17.4	6.9	1.4	6.4	11.1
	10	5.7	1.7	7.1	-1.4	6.9	4.2
Gyrocarpine	0	5.8		7		7.2	
	50	0.6	89.7	0.1	98.6	0.1	98.6
	25	1.8	69	1.1	84.3	2.9	59.7
	10	2	65.5	4.4	37.1	4.9	31.9
Obabérine	0	5.8		7		7.2	
	50	0.5	91.4	0.1	98.6	0.1	98.6
	25	0.7	87.9	4.2	40	2.5	65.3
	10	2.6	55.2	6.1	12.9	5.5	23.6
Berbamine	0	5.8		7		9.8	
	50	0.1	98.3	1.4	80	4.5	54.1
	25	0.6	89.7	1.8	74.3	5.7	41.8
	10	0.8	86.2	2.6	62.9	6	38.9
Krukovine	0	5.8		7		9.8	
	50	0.1	98.3	2.7	61.4	2.1	78.6
	25	0.1	98.3	2.9	58.6	2.1	78.6
	10	0.5	91.4	3.1	55.7	6.7	31.6
Limacine	0	5.8		7		7.2	
	50	0.2	96.6	0.2	97.1	0.1	98.6
	25	0.3	94.8	1.2	82.3	1.1	84.7
	10	2.6	55.2	2	71.4	3.4	52.8

TABLEAU 1 (suite)

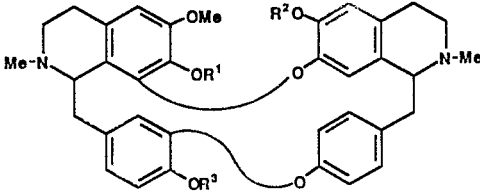
	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	A	% Inhib.	B	% Inhib.	C	% Inhib.
Pheanthine	0	5.8		7		7.2	
	50	0.6	89.7	2.2	68.6	5.1	29.2
	25	0.7	87.9	3.4	51.4	7	2.8
	10	1	82.8	3.9	44.3	7.4	-2.8
Antioquine	0	5.8		7		9.8	
	50	0.1	98.3	1.9	72.9	0.6	93.9
	25	0.7	87.9	2.7	61.4	3.3	66.3
	10	0.9	84.5	2.7	61.4	9.3	5.1
Cocsuline	0	5.8		7			
	50	0.5	91.4	0.9	87.1		
	25	1.7	70.7	2.6	62.9		
	10	2.5	56.9	4.1	41.4		
Chondodedrine	0	5.8		7		7.2	
	50	1	82.4	1.4	80	0.1	98.6
	25	1.6	72.4	4.6	34.3	1.6	77.8
	10	3.4	41.4	6.7	4.3	4.8	33.3
Cycléanine	0	5.8		7		9.8	
	50	0.3	94.8	4.8	31.4	0.1	99
	25	1.1	81	6.5	7.1	0.1	99
	10	3	48.3	6.9	1.4	3.5	64.3
Isochondodend.	0	5.8		7		7.2	
	50	0.4	93.1	1.6	77.1	0.1	98.6
	25	0.4	93.1	1.7	75.7	0.4	94.4
	10	1.4	75.9	1.8	74.2	2.5	65.3
Malékulatine	0	5.8		7		7.2	
	50	2	65.5	3.9	44.3	1.8	75
	25	5.7	1.7	4.9	30	5.8	19.4
	10	5.8	0	5.7	19.6	6	16.7

quantité de $2 \times 1,000,000/\text{ml}$ à $3 \times 1,000,000$ parasites/ml dans chaque tube. Chaque essai est réalisé en triple. Nous laissons incuber les parasites 72 h à 28°C . Après homogénéisation, un aliquot est prélevé dans chaque tube et le nombre de promastigotes est compté au bout de 3 jours, à l'aide d'une cellule de Thoma.

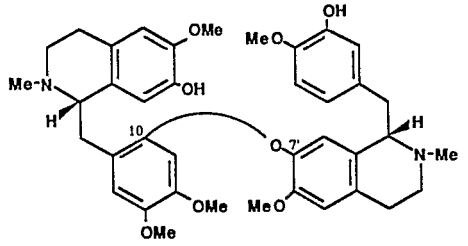
La croissance de chaque tube est déterminée et comparée avec les tubes témoin de cultures.

Résultats et discussion

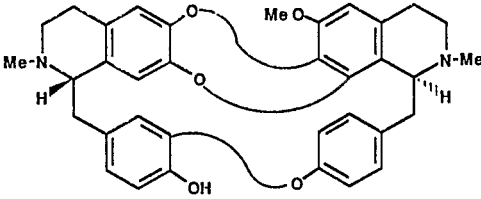
Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 1. Les résultats des comptages sont la moyenne des trois essais en millions de parasites. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin culture à 72 h.



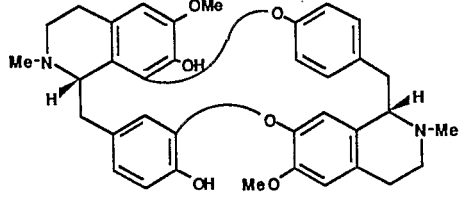
BERBAMINE, $R^1 = R^2 = \text{Me}$, $R^3 = \text{H}$, 1R, 1'S
 KRUKOVINE, $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, 1R, 1'R
 LIMACINE, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{Me}$, 1R, 1'R
 PHAEANTHINE, $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Me}$, 1R, 1'R



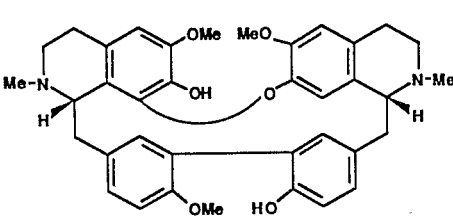
MALEKULATINE



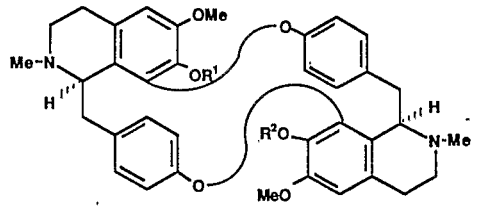
COCSULINE



CHONDODENDRINE



ANTIOQUINE



CYCLEANINE, $R^1 = R^2 = \text{Me}$
 ISOCHONDODENDRINE, $R^1 = R^2 = \text{H}$

Au vu des résultats, les bisbenzylisoquinoléines étudiées se classent en plusieurs catégories, selon leur pouvoir inhibiteur sur les trois souches de *Leishmania*.

(a) Les molécules actives sur les trois souches, comme la daphnandrine, la gyrocarpine et l'obabérine qui sont toutes trois des bisbenzylisoquinoléines "tête à tête" à deux ponts éther en 7-8' et 11-12'. Leur action inhibitrice est très faible à la dose de 10 µg/ml. Seules la gyrocarpine et l'obabérine inhibent à plus de 50% les promastigotes à 10 µg/ml de *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, et la daphnandrine à 10 µg/ml inhibe 58% des promastigotes de *L. mexicana amazonensis*.

La daphnoline, bien qu'appartenant à ce même type de bisbenzyltétrahydroisoquinoléine à 2 ponts éther et ne diffèrent de la daphnandrine que par un méthoxyle en 12, ne présente aucune activité significative sur les trois souches de *Leishmania*.

(b) Les molécules qui ont une activité sur les deux souches de leishmanioses cutanées, *Leishmania brasiliensis brasiliensis* et *L. mexicana amazonensis*, la berbamine, la krukovine, la limacine et la pheanthine qui sont des bisbenzylisoquinoléines avec deux ponts éther en 8-7' et 11-12'. La krukovine et la limacine se distinguent des deux autres avec une relative action inhibitrice sur *L. donovani*, respectivement 78% et 84% d'inhibition à 25 µg/ml.

La cocsuline, bisbenzylisoquinoléine avec trois ponts éther n'a pu être testée que sur *L. brasiliensis brasiliensis* et *L. Mexicana amazonensis* faute de quantité suffisante de produit pour étudier son activité sur *L. donovani*. Elle présente une bonne activité vis-à-vis de ces deux souches.

(c) Les molécules actives sur *L. brasiliensis brasiliensis* et *L. Donovani*, la chondodendrine, la cycléanine, deux bisbenzylisoquinoléines "tête à queue" à deux ponts éther en 8-12' et 12-6' pour la cycléanine, 8-12' et 11-7' pour la chondodendrine.

L'isochondodendrine, bisbenzylisoquinoléine à deux ponts éther "tête à queue", se différencie des deux autres par un pouvoir inhibiteur important, plus de 65% d'inhibition à 10 µg/ml sur les trois souches de *Leishmania*.

(d) L'antioquine, bisbenzylisoquinoléine à un pont éther en 8-7', et une liaison biphenyle, présente une remarquable activité sur *L. brasiliensis brasiliensis*, et une bonne activité sur *L. mexicana amazonensis* (61% d'inhibition à 10 µg/ml) et sur *L. donovani* (66% à 25 µg/ml).

(e) Seules la daphnoline et la malékulatine ne présentent aucune activité significative in vitro sur les promastigotes des trois souches de *Leishmania*.

Nous constatons qu'il est très difficile de rencontrer une molécule active à la fois sur toutes les souches de *Leishmania* (Marr et al., 1977) (Avila et al., 1986), aussi bien cutanées, cutanéomuqueuses que viscérales et que chaque souche se comporte différemment devant les médicaments.

Les produits utilisés contre les leishmanioses se répartissent en deux groupes:

(1) ceux qui présentent une toxicité sur les deux formes du parasite, les promastigotes et les amastigotes, et également une forte cytotoxicité sur les cellules hôtes (macrophages). C'est le cas de la pentamidine, de l'amphothéricine et des dérivés imidazole comme le kétoconazole et l'itraconazole (Al-Khateeb et al., 1977; Marr et al., 1977; Berman et Wyler, 1980; Avila et al., 1986), leur activité sur les promastigotes étant de l'ordre de 0,1 à 10 $\mu\text{g/ml}$;

(2) ceux caractérisés par une faible activité sur les promastigotes (plus de 100 $\mu\text{g/ml}$), une forte activité sur les amastigotes et une cytotoxicité sur les cellules hôte presque négligeable. Les dérivés antimoniés pentavalents (glucantime, pentostame) et l'allopurinol appartiennent à ce groupe.

Les bisbenzyltétrahydroisoquinoléines comme la gyrocarpine, la daphnandrine et l'obabérine se classent dans le premier groupe avec une activité de l'ordre de 10 $\mu\text{g/ml}$. Il serait intéressant d'étudier leur activité sur les amastigotes et de connaître leur cytotoxicité.

Enfin, il est à remarquer que les différentes souches de *Leishmania* réagissent de façon différente aux divers médicaments existants et qu'en particulier certaines sont résistantes à toute thérapeutique.

Remerciements

Nous remercions le Dr. Desjeux (IBBA-Institut Pasteur) qui a bien voulu nous fournir des souches de *Leishmania* typifiées en isoenzymes.

Bibliographie

- Al-Khateeb, G.H., Al-Jeboori, T.I. et Al-Janabi, K.A. (1977) *In vitro* efficacy of some drugs on promastigotes of *Leishmania donovani*. *Chemotherapy* 23, 267-275.
- Avila, J.L., Polegre, M.A., Avila, A. et Robins, R.K. (1986) Action of pyrolozopyrimidine derivatives on American Leishmaniasis ssp. promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83C, 285-289.
- Berman, J.D. et Wyler, D.J. (1980) An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 142, 83-86.
- Berman, J. (1981) Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophages cultures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 566-569.
- Berman, J.D. et Lee, L.S. (1983a) Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 753-759.
- Berman, J.D., Keenan, C.M., Lamb, S.R., Hanson, W.L. et Waits, V.B. (1983b) *Leishmania donovani*, oral efficacy and toxicity of formycin B in the infected hamster. *Experimental Parasitology*, 56, 215-221.
- Berman, J., Holz Jr., G.G. et Beach, D.H. (1984) Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 12, 1-13.
- Borelli, D. (1987) A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Reviews of Infectious Diseases* 9, Supp. 1, 57-63.
- Bruneton, J., Shamma, M., Minard, R.D., Freyer, A.J. et Guinaudeau, H. (1983) Novel biogenetic pathways from (+)-réticuline. Three dimeric alkaloids (+)-vanuatine, (+)-vateamine and (+)-malekulatine. *Journal of Organic Chemistry* 48, 3957-3960.

- Carson, D.A. et Kwang-Poo-Chang (1981) Phosphorylation and antileishmanial activity of formycin B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 100, 1377-1383.
- Chalandre, M.C., Bruneton, J., Cabalion, P. et Guinaudeau, H. (1986) Alcaloïdes de *Gyrocarpus americanus*. *Journal of Natural Products* 49, 101-105.
- Cooper, M.B. et Coombs, G.H. (1985) Carnitine and its esters in *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. *IRCS Medical Science*, 13, 1062-1063.
- Cortes, D., Saez, J., Hocquemiller, R., Cavé, A. et Cavé, Ad. (1985) Alcaloïdes des Annonacées. LIII. Alcaloïdes du *Pseudoxandra* aff. *lucida*, étude de l'antioquine et de ses dérivés. *Journal of Natural Products* 48, 76-85.
- Cortes, D., Saez, J., Hocquemiller, R. et Cavé, A. (1984) La sécantioquine, nouveau type de secobisbenzyltétrahydroisoquinoléine. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 298, Série II, 591-593.
- Gentilini, M., Duflo, M.B., Lagardere, B., Danis, M. et Richard-Lenoble, D. (1982) *Médecine tropicale*, Ed. Flammarion Médecine-Sciences.
- Hocquemiller, R., Cabalion, P., Fournet, A. et Cavé A. (1984) Alcaloïdes des Annonacées. XLIX. Alcaloïdes d'*Isolona hexaloba*, *I. zenkeri* et *I. pilosa*. *Planta Medica* 23-25.
- Lafon, S.W., Nelson, D.J., Berens, R.L. et Marr, J.J. (1985) Inosine analogs. Their metabolism in mouse cells L and in *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 9660-9665.
- Lavault, M., Fournet, A., Guinaudeau, H. et Bruneton, J. (1985) Bisbenzylisoquinoline N-oxide from *Curarea candicans*. *Journal of Chemical Research (M)*, 2786-2793.
- Lavault, M., Fournet, A., Guinaudeau, H. et Bruneton, J. (1986) Alcaloïdes de *Caryomene olivascens*. Nouvelles structures bisbenzylisoquinoléiques. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34, 1148-1152.
- Lavault, M., Bruneton, J., Cavé, Ad., Kai Cheong Chan, Deverre, J.R., Sévenet, T. et Guinaudeau, H. (1987) Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques de *Albertisia* cf. *A. papuana*. *Canadian Journal of Chemistry* 65, 343-347.
- Mahmoud, A.A.F. et Warren, K.P. (1977) Algorithms in the diagnostic and management of exotic diseases. XXIV. Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 136, 160-163.
- Marr, J.J. et Berens, R.L. (1977) Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in *Leishmania* species to the action of allopurinol. *The Journal of Infectious Diseases* 136, 724-732.
- Munshi, C.P., Vaidya, P.M., Buranpuri, J.J. et Gulati, O.D. (1972) Kala-azar in Gurajat. *Journal of the Indian Medical Association* 59, 287-293.
- Paolantonacci, P., Lawrence, F. et Robert-Gero, M. (1985) Differential effect of sinefungin and its analogs on the multiplication of three *Leishmania* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28, 528-531.
- Robert-Gero, M., Bachrach, U., Bhatnagar, S. et Polonsky, J. (1985). Inhibition in vitro de la croissance des promastigotes de *Leishmania donovani* par des quassinoides. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences* 300, Série II, 803-806.
- Trotter, E.R., Peters, W. et Robinson, B.L. (1980a) The experimental chemotherapy of leishmaniasis, VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. Major* and *L. mexicana amazonensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74, 299-319.
- Trotter, E.R., Peters, W. et Robinson, B.L. (1980b) The development of a rodent model for visceral infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74, 127-138.
- Weber, J.F., Fournet, A. et Bruneton, J. (1988) Alcaloïdes du *Berberis boliviana*. *Planta Medica* in press.
- Weinbauch, L. et Elon, J. (1984) The effect of ketoconazole and a combination of rifampicin/amphotericin B on cutaneous leishmaniasis in laboratory mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 389-390.