

Short communication

ACTIVITÉ ANTIPARASITAIRE D'ALCALOÏDES
BISBENZYLISOQUINOLÉIQUES. II: ACTIVITÉ *IN VITRO* SUR DES
EPIMASTIGOTES DE TROIS SOUCHES TYPIFIÉES DE
TRYPANOSOMA CRUZI

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

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

(Accepted July 20, 1988)

Summary

Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is an endemic parasitic disease in Central and South America. The chemotherapeutic agents against *Trypanosoma cruzi* (imidazol compounds, lampit and benzimidazol) are not very convenient products. Since it is known that protozoan *Trypanosoma* are close to *Leishmania* we studied the action of 14 bisbenzylisoquinoline alkaloids, *in vitro*, on three strains of *T. cruzi* (Tulahuen, C8C11, and 1979 CL1). As in the case of *Leishmania*, gyrocarpine, daphnandrine and obaberine showed an interesting activity and we judge them to be worthy of *in vivo* assays.

Introduction

La maladie de Chagas est une trypanosomiase humaine, endémique au continent américain, qui atteint entre 10 à 12 millions de personnes (Molyneux et Ashford, 1983). En Bolivie, sur six millions d'habitants, deux millions de personnes en seraient affectées (Valencia Telleria, 1979).

La maladie est provoquée par *Trypanosoma cruzi*, un protozoaire de l'ordre des kinetoplastida, dont trois formes sont décrites, une forme extracellulaire de culture, l'épimastigote, une forme dans le sang circulant, le trypomastigote et une forme intra-cellulaire, l'amastigote (Ribeiro-Dos-Santos et al., 1981).

La maladie présente une phase aiguë qui dure 1 à 2 mois et qui est caractérisée par une parasitémie patente, et une phase chronique, où la parasitémie est sub-patente. Cette dernière forme peut se manifester par des troubles cardiaques et des problèmes digestifs avec dilatations pathologiques du tube digestif (mégacolon, mégaresophage).

Les thérapies existantes ne traitent que la phase aiguë de la maladie. Elles sont souvent inefficaces, toxiques et non dépourvues d'effets secondaires importants.

Les médicaments commercialisés contre la maladie de Chagas, sont le nifurtimox (nitro-5 furanne) et le benznidazole (nitro-2 imidazole) (Gutteridge, 1985).

D'autres molécules ou médicaments potentiels sont en cours d'étude, tel que l'itraconazole (McCabe et al., 1986), l'allopurinol (Avila et Avila, 1981), la formycine B (McCabe et al., 1985), les dérivés pyrazolopyrimidine (Avila et al., 1987), la swaisonine (Villalta et Kierszenbaum, 1985), et la hachymicine (Tachibana et al., 1985).

Il existe peu de travaux sur l'utilisation de produits d'origine naturelle comme agents thérapeutiques potentiels sur *Trypanosoma cruzi*. On peut citer une quinone, la β -lapachone (Gojman et Stoppani, 1985a), un triterpène quinoïde la tingénone (Gojman et al., 1985b), et des alcaloïdes du type harmane (Cavin et al., 1987).

Il n'existe pas à notre connaissance d'emploi de plantes comme moyen thérapeutique dans les zones d'endémie en Bolivie. Cela est peut-être dû au fait que la maladie ne présente que peu de signes cliniques. En raison des relations entre les *Leishmania* et le *Trypanosoma cruzi*, ayant mis en évidence des activités intéressantes de diverses bisbenzyltétrahydroisoquinoléines (Fournet et al., 1988), nous avons décidé de tester l'activité de ces alcaloïdes sur diverses souches de *Trypanosoma cruzi*.

L'activité in vitro de ces quatorze alcaloïdes a été étudiée sur trois souches typifiées isoenzymatiquement d'épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, TULAHUEN, C8CL1 et 1979CL1 (Tibayrenc et al., 1986).

Matériel et Méthodes

Les alcaloïdes sont utilisés sous forme de base dont la pureté analytique a été vérifiée.

Les souches de *Trypanosoma cruzi* sont les suivantes: Tulahuén, C8CL1, et 1979CL1. Toutes ces souches ont été typifiées en isoenzymes et clonées par le Dr. F. Breniere à l'IBBA.

Les épimastigotes sont cultivés en milieu LIT (Liver Infusion Tryptose) dans une étuve à 28°C.

Les alcaloïdes sont dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) puis dans le milieu de culture, la concentration finale de DMSO ne dépassant pas 0.5%. Dans ces conditions son emploi ne nuit pas à la croissance des parasites. Le milieu est ensuite filtré sur filtres Millipore de 0.22 μ M. A 1 ml

de milieu avec parasites, on ajoute 1 ml d'une solution d'alcaloïde pour obtenir une concentration finale en alcaloïde base de 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$.

Les épimastigotes sont en phase de croissance exponentielle à la concentration de 3 à 6 000 000 de parasites par ml dans chaque tube. Chaque essai est réalisé en triple.

On laisse incuber les parasites avec ou sans produit à tester 72 h à 28°C. Au bout de trois jours, après homogénéisation, un aliquot de chaque tube est prélevé et le nombre d'épimastigotes est compté 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 sont consignés dans le tableau.

La concentration des parasites est la moyenne des comptages des trois essais exprimée en 1 000 000 de parasites par ml.

Le pourcentage d'inhibition est calculé en fonction des témoins culture.

Au vu des résultats (Tableau 1), très peu d'alcaloïdes sont actifs sur les trois souches, seules la daphnandrine, la gyrocarpine et l'obabérine inhibent complètement les parasites à 50 $\mu\text{g/ml}$, cette activité ne se retrouve pas à 10 $\mu\text{g/ml}$, sauf pour la daphnandrine à 10 $\mu\text{g/ml}$ sur 1979 CL1 (71% d'inhibition).

Aux doses inférieures, seule la daphnandrine a un pouvoir inhibiteur de plus de 50% à la dose de 25 $\mu\text{g/ml}$ sur les trois souches.

Ces trois alcaloïdes sont du même type structural, des bisbenzyltétrahydroisoquinoléines à deux ponts éther en 7-8' et 11-12', mais le quatrième alcaloïde testé, la daphnoline qui ne diffère que d'un méthoxy en 12 par rapport à la daphnandrine n'a aucune activité. Au contraire elle paraît stimuler la croissance de la souche de *T. cruzi* C8CL1 à 25 $\mu\text{g/ml}$ et à 10 $\mu\text{g/ml}$.

Les alcaloïdes à deux ponts éther en 8-7' et 11-12' ne présentent aucune activité sauf sur la souche 1979 CL1, pour la limacine et la phaeanthine qui inhibent cette souche à plus de 50% à 10 $\mu\text{g/ml}$.

L'antioquine a une activité comparable à la limacine et la phaeanthine sur la souche de *T. cruzi* 1979 CL1, de même que la bisbenzylisoquinoléine tripontée la cocsuline.

Des bisbenzylisoquinoléines de type "tête à queue", la chondodendrine est active à 50 $\mu\text{g/ml}$ (78% d'inhibition) sur la souche Tulahuen, l'isochondodendrine inhibe à 60% la souche 1979 CL1 à 10 $\mu\text{g/ml}$, la cycléanine est active sur la souche C8CL1 à 58% à 10 $\mu\text{g/ml}$ et la malekulatine ne présente aucune activité.

A partir de ces résultats on remarque une activité apparemment liée à la structure à deux ponts éther en 7-8' et en 11-12', mais cette relation devra

TABLEAU 1

ACTIVITÉ IN VITRO SUR LES ÉPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI

| | Conc. ($\mu\text{g/ml}$) | Tulahuen | % Inhib. | C8CL1 | % Inhib. | 1979 CL1 | % Inhib. |
|-------------------|----------------------------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|
| TÉMOINS | | | | | | | |
| Nifurtimox | 0 | 3.5 | | | | | |
| | 50 | 0.6 | 82.9 | | | | |
| | 25 | 1.4 | 60 | | | | |
| | 10 | 1.5 | 57.1 | | | | |
| Benznidazol | 0 | 3.5 | | | | | |
| | 50 | 0.8 | 77.1 | | | | |
| | 25 | 1.5 | 57.1 | | | | |
| | 10 | 2.7 | 22.9 | | | | |
| ALCALOIDES | | | | | | | |
| Daphnandrine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 0.1 | 98.9 | 0.3 | 98.2 | 0.1 | 98.5 |
| | 25 | 2 | 77.3 | 4.1 | 75 | 1.1 | 83.3 |
| | 10 | 5.4 | 38.6 | 7.6 | 53.7 | 1.9 | 71.2 |
| Daphnoline | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 7.8 | 11.4 | 7.2 | 56.1 | 2.1 | 68.2 |
| | 25 | 8.8 | 0 | 16.9 | -3 | 3.3 | 50 |
| | 10 | 8.8 | 0 | 18.6 | -13.4 | 6.6 | 0 |
| Gyrocarpine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 0.4 | 95.5 | 2.4 | 85.4 | 0.1 | 98.5 |
| | 25 | 4.3 | 51.1 | 9.8 | 40.2 | 2.6 | 60.6 |
| | 10 | 7 | 20.5 | 16.1 | 1.8 | 5.5 | 16.7 |
| Obabérine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 0.8 | 90.9 | 3.6 | 78 | 0.1 | 98.5 |
| | 25 | 6.3 | 28.4 | 12.1 | 26.2 | 2.5 | 62.1 |
| | 10 | 8.7 | 1.1 | 15.1 | 7.9 | 5.6 | 15.2 |
| Berbamine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.3 | 28.4 | 12.7 | 22.6 | 3.2 | 51.2 |
| | 25 | 7.2 | 18.2 | 13.9 | 15.2 | 3.7 | 43.9 |
| | 10 | 7.8 | 11.4 | 15.9 | 3 | 4.8 | 27.8 |
| Krukovine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.3 | 28.4 | 5.6 | 65.9 | 3.4 | 48.5 |
| | 25 | 6.5 | 26.1 | 7.8 | 52.4 | 5.7 | 13.6 |
| | 10 | 6.8 | 22.7 | 10.2 | 37.8 | 6 | 9.1 |
| Limacine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.2 | 29.5 | 7.3 | 55.5 | 2.3 | 65.2 |
| | 25 | 7.3 | 17 | 12.1 | 26.2 | 2.9 | 56.1 |
| | 10 | 7.5 | 14.8 | 12.3 | 25 | 3 | 54.5 |
| Phaeanthine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 7.7 | 12.5 | 7.9 | 51.8 | 2.5 | 62.1 |
| | 25 | 8.1 | 8 | 11.7 | 28.7 | 2.5 | 62.1 |
| | 10 | 8.7 | 1.1 | 13.8 | 15.9 | 3.2 | 51.5 |

TABLEAU 1 (suite)

| | Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Tulahuen | % Inhib. | C8CL1 | % Inhib. | 1979 CL1 | % Inhib. |
|----------------|-----------------------------------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|
| Antioquine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.3 | 28.4 | 7.8 | 52.3 | 2.2 | 66.7 |
| | 25 | 6.5 | 26.1 | 8.7 | 47 | 2.7 | 59.1 |
| | 10 | 6.6 | 25 | 9.9 | 39.6 | 3.5 | 47 |
| Cocsuline | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.2 | 29.5 | 9 | 45.1 | 1.4 | 78.8 |
| | 25 | 7.1 | 19.3 | 9.7 | 40.9 | 1.5 | 77.2 |
| | 10 | 7.5 | 14.8 | 10 | 39 | 1.7 | 74.2 |
| Chondodendrine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 1.9 | 78.4 | 6.7 | 59.1 | 3.3 | 50 |
| | 25 | 6.6 | 25 | 12.9 | 21.3 | 4.7 | 28.8 |
| | 10 | 8 | 9.1 | 16 | 2.4 | 6.4 | 3 |
| Cycléanine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 6.1 | 30.7 | 5.8 | 64.6 | 3.1 | 53 |
| | 25 | 6.9 | 21.6 | 6.3 | 61.6 | 3.6 | 45.5 |
| | 10 | 7.5 | 14.8 | 6.8 | 58.5 | 5.8 | 12.1 |
| Isochondoden. | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 5.5 | 37.5 | 6 | 63.4 | 1.3 | 80.3 |
| | 25 | 5.3 | 39.8 | 8.9 | 45.7 | 1.5 | 77.2 |
| | 10 | 7.1 | 19.3 | 8.9 | 45.7 | 2.6 | 60.6 |
| Malékulatine | 0 | 8.8 | | 16.4 | | 6.6 | |
| | 50 | 8.1 | 8 | 8.3 | 49.4 | 0.9 | 86.4 |
| | 25 | 9.5 | -8 | 8.5 | 48.2 | 1.9 | 71.2 |
| | 10 | 9.7 | -10.2 | 11.5 | 29.9 | 2 | 70 |

être confirmée par l'étude in vitro des amastigotes de *Trypanosoma cruzi* dans les macrophages et par l'étude in vivo sur souris (Brener, 1962).

Cette activité sur les épimastigotes peut être imputée à une toxicité de ces alcaloïdes, ce qui devra être vérifié sur d'autres formes de *Trypanosoma cruzi* amastigote dans des cellules hôte comme les macrophages et les formes trypomastigotes circulantes (Budzko et Kierszenbaum, 1974) ou éventuellement vérifiée sur d'autres cultures cellulaires ou des cultures de cellules de mammifères.

Pour les onze alcaloïdes restants, aucun ne présente un intérêt pour des études plus approfondies sur *Trypanosoma cruzi*.

Cette étude montre la variabilité des différentes souches de *T. cruzi* (Tibayrenc et al., 1986), presque tous les alcaloïdes ont une action inhibitrice sur la souche 1979 CL1 ce qui indiquerait que cette souche est plus faible que les autres.

A noter que les souches 1979 CL1 et C8CL1 sont très proches

génétiqnement, la souche Tulahuen étant très éloignée de ces deux souches (Tibayrenc et al., 1986).

Avec une souche comme Tulahuen qui est très virulente, seuls trois bisbenzylisoquinoléines ont une activité inhibitrice, la daphnandrine, la gyrocarpine et l'obabérine. Cette activité est comparable à celle de deux médicaments utilisés pour le traitement de la maladie de Chagas dans sa phase aiguë, le nifurtimox et le benznidazol.

L'activité des médicaments varie énormément avec la nature de la souche, ce qui montre bien l'intérêt de travailler sur plusieurs souches de *T. cruzi* typifiées, génétiquement très différentes, pour la recherche de nouveaux médicaments actifs sur la trypanosomiase américaine. Il sera important d'autre part, outre le fait de réaliser des essais in vivo, de tester un nombre de bisbenzyltétrahydroisoquinoléines plus important, particulièrement appartenant au groupe des bipontés 7-8', 11-12', possédant des configurations variées en 1 et 1' et variant par le nombre de groupements hydroxyles ou méthoxyles de manière à pouvoir définir des relations structure/activité.

Remerciements

Nous remercions le Dr. F. Breniere (IBBA-ORSTOM) qui a bien voulu nous fournir les souches typifiées de *Trypanosoma cruzi*.

Bibliographie

- Avila, J.L. et Avila, A. (1981) *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas Disease. *Experimental Parasitology* 51, 204-208.
- Avila, J.L., Polegre, M.A. et Robins, R.K. (1987) Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies in vitro and in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86C, 49-54.
- Brener, Z. (1962a) Progrès récents dans le domaine de la maladie de Chagas. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* 60, 845-856.
- Brener, Z. (1962b) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4, 389-396.
- Budzko, D.B. et Kierszenbaum, F. (1974) Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood. *The Journal of Parasitology* 60, 1037-1038.
- Cavin, J.C., Krassner, S.H. et Rodriguez, E. (1987) Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 19, 89-94.
- Fournet, A., Munoz, V., Manjon, A.M., Angelo, A., Hocquemiller, R., Cortes, D., Cavé, A. et Bruneton, J. (1988) Activité antiparasitaire d'alkaloïdes bisbenzylisoquinoléiques. Première partie, Activité in vitro sur les promastigotes de 3 souches de *Leishmania*. *Journal of Ethnopharmacology* 24, 327-335.
- Goijsman, S.G. et Stoppani, A.O.M. (1985a) Effects of B-lapachone, a peroxide-generating quinone on macromolecules synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240, 273-280.
- Goijsman, S.J., Turrens, J.F., Marini-Bettolo, G.B. et Stoppani, A.O.M. (1985b) Effect of tingenone, a quinoid triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 41, 646-648.

- Gutteridge, W.E. (1985) Existing chemotherapy and its limitations. *British Medical Bulletin* 41, 162-168.
- McCabe, R., Remington, J.S. et Araujo, F.G. (1986) In vitro and in vivo effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35, 280-284.
- McCabe, R., Remington, J.S. et Araujo, F.G. (1985) In vitro and in vivo activities of Formycin B against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 27, 491-494.
- Molyneux, D.H. et Ashford, R.W. (1983) *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*, Taylor and Francis (Eds.), London, p. 161.
- Ribeiro-Dos-Santos, R., Rassi, A. et Köberle, F. (1981) Chagas' Disease. *Antibiotics Chemotherapy* 30, 115-134.
- Tachibana, H., Kuhira, K., Nagakura, K., Kaneda, Y. et Montenegro, L.T. (1985) Therapeutic effect of hachimycin in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *IRSC Medical Science* 13, 1108-1109.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. et Ayala, F.J. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 83, 115-119.
- Valencia Telleria, A. (1979) Investigacion epidemiologica del mal de Chagas. *Boletin Epidemiologico* 54-60.
- Villalta, F. et Kierszenbaum, F. (1985). The effect of swainsonine on the association of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16, 1-10.