

COMBATTRE LA LEISHMANIOSE

Une enquête
ethno-pharmacologique
en Bolivie

Les substances chimiques tirées des plantes représentent aujourd'hui encore plus de la moitié des médicaments. Un fait qui souligne l'intérêt des recherches menées sur le terrain. Des biologistes ont ainsi découvert, en Bolivie, de nouveaux produits actifs contre la leishmaniose, une maladie parasitaire très handicapante et parfois mortelle qui sévit dans les pays tropicaux, au Moyen-Orient et dans les pays méditerranéens. Deux molécules efficaces « in vitro » et chez l'animal ont été isolées d'un arbuste forestier. Elles vont bientôt être testées chez l'homme.

ALAIN FOURNET, REYNALD HOCQUEMILLER ET JEAN-CHARLES GANTIER

En Amérique du Sud, le voyageur constate assez vite que les populations des campagnes sont affligées de plusieurs maladies parasitaires, notamment les leishmanioses. Celles-ci sont dues à des protozoaires flagellés, les leishmanies (genre *Leishmania*) (fig. 1). Elles sont transmises à l'homme par la piqûre de petits insectes appelés phlébotomes qui s'infestent en piquant des animaux domestiques, comme le chien, ou des animaux sauvages tels les rongeurs, loirs, agoutis, fourmiliers, etc. La leishmaniose cutanée, qui sévit dans le Nouveau Monde, en Afrique, en Asie et au Moyen-Orient (« bouton de Delhi, de Jéricho, etc.) provoque, comme la lèpre, de graves lésions de la peau laissant des cicatrices indélébiles notamment sur le visage (fig. 2).

La leishmaniose viscérale, qui sévit surtout en Inde et au Moyen-Orient (où elle est connue sous le nom de kala-azar), est une forme plus grave atteignant la rate et le foie, et mortelle quand elle n'est pas soignée. D'après l'Organisation mondiale de la santé, douze millions de personnes sont touchées dans le monde par les différentes formes de leishmaniose, avec quatre cent mille cas nouveaux répertoriés chaque année, et quatre-vingts pays seraient touchés. Trois cent cinquante millions de personnes vivaient dans les zones à risque.

Les traitements employés contre les leishmanioses font appel à des produits généralement assez toxiques comme des dérivés contenant de l'antimoine (Glucantime® ou Pentostam®), et des antibiotiques tels que l'amphotéricine B. Ces médicaments doivent être injectés dans la circulation sanguine et provoquent des effets secondaires importants (fièvre, troubles cardiaques, hépatiques et rénaux, etc.) qui nécessitent souvent une hospitalisation et l'attention d'un personnel compétent. De plus, le coût de ces médicaments est prohibitif pour les pays en développement, et les centres spécialisés dans le traitement de la leishmaniose sont rares, alors même que les leishmanioses touchent en priorité des populations pauvres vivant en milieu rural.

Il s'agit donc de combler un certain vide thérapeutique en mettant au point des traitements efficaces, de faible coût et facilement disponibles.

De tout temps, les substances pharmaceutiques ont été tirées du monde végétal. Ainsi, pour le traitement du paludisme, la quinine a été isolée en 1820 par les pharmaciens français Pierre Joseph Pelletier et Joseph Caventou à partir de l'écorce d'un arbre tropical déjà utilisé par les Indiens, le quinquina (*Cinchona* sp.). Plus récemment, en 1972, une nouvelle substance antipalu-



Figure 2. Il existe de nombreuses formes de leishmaniose : elles vont de la simple ulcération de la peau comme le bouton d'Orient, aux sévères mutilations provoquées par les leishmanioses tégumentaires du Nouveau Monde (photographies) et à la forme la plus grave, la leishmaniose viscérale ou kala-azar. Cette dernière est mortelle en l'absence de traitement, et provoque chaque année le décès de centaines de milliers de personnes. (Clichés Alain Fournet)

ALAIN FOURNET est chargé de recherche en pharmacognosie au département Santé de l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (Orstom, UR 45).

REYNALD HOCQUEMILLER est professeur de pharmacognosie à la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. Il appartient à l'URA CNRS 1843 BIOCIS.

JEAN-CHARLES GANTIER est maître de conférences de parasitologie à la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry.

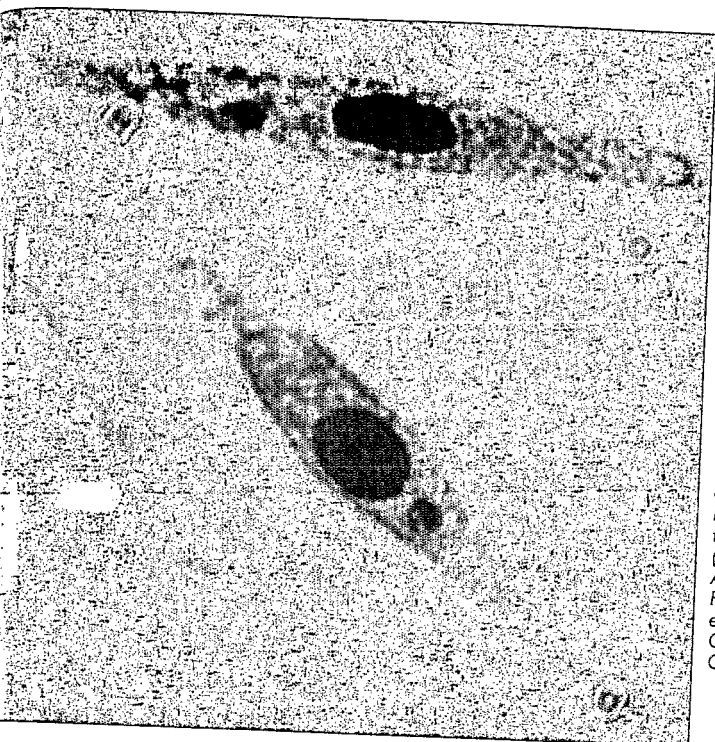


Figure 1.
La leishmaniose est provoquée par un protozoaire parasite (ci-contre) véhiculé par un insecte piqueur, le phlébotome (ci-contre, à gauche) qui vit dans les forêts aux pieds ou aux sommets des arbres et dans les litières de feuilles. (Clichés Alain Fournet et Jean-Charles Gantier)

dique, l'artémisinine, a été mise en évidence par des chercheurs de l'université de Shanghai à partir d'une plante, une armoise (*Artemisia annua*), employée traditionnellement dans la pharmacopée chinoise. Il y a peu, rien de comparable n'existait cependant dans le cas des leishmanioses.

Aussi avons-nous cherché à exploiter la bonne connaissance qu'ont certains Amérindiens de la maladie, de leur pharmacopée et de leur environnement, de manière à collecter des informations sur les remèdes locaux à base de plantes ou de produits d'origines diverses. A partir de telles enquêtes « ethnopharmacologiques » et de l'expérience acquise sur le terrain dans les pays sud-américains, des équipes de l'Orstom (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) et de l'Institut bolivien de biologie d'altitude (Instituto Boliviano de Biología de Altura, IBBA), à La Paz, ont recherché et découvert en 1989 de nouvelles molécules actives contre la leishmaniose⁽¹⁾. Ces molécules ont été synthétisées récemment et vont prochainement faire l'objet d'essais cliniques chez l'homme.



La fermeture des mines d'étain dans les années 1980 a entraîné la migration des mineurs vers les contrées tropicales à défricher, où ils sont la proie de diverses maladies

Mais avant d'en venir là, il nous faut comprendre pourquoi la leishmaniose cutanée sévit particulièrement en Bolivie. L'une des raisons essentielles tient aux conditions socio-économiques de ce pays. Les régions d'altitude de la Bolivie, où vivent les deux tiers de la population du pays, représentent un tiers de sa superficie (fig. 3). Sur le haut plateau, ou altiplano (plus de 3 000 mètres d'altitude), vivent les Indiens Aymaras (région du lac Titicaca, La Paz et El Alto), et les Indiens Quechuas (Oruro, Potosi, Cochabamba). La population y est paysanne, mais l'essentiel de l'économie repose sur l'exploitation du sous-sol, en particulier les mines d'étain et d'argent. Le reste du pays, soit les deux tiers de la superficie, est constitué de plaines. L'activité économique s'y appuie sur l'élevage des bovins, l'exploitation forestière, la prospection aurifère et l'extraction du pétrole et du gaz, aujourd'hui principales sources de devises du pays.

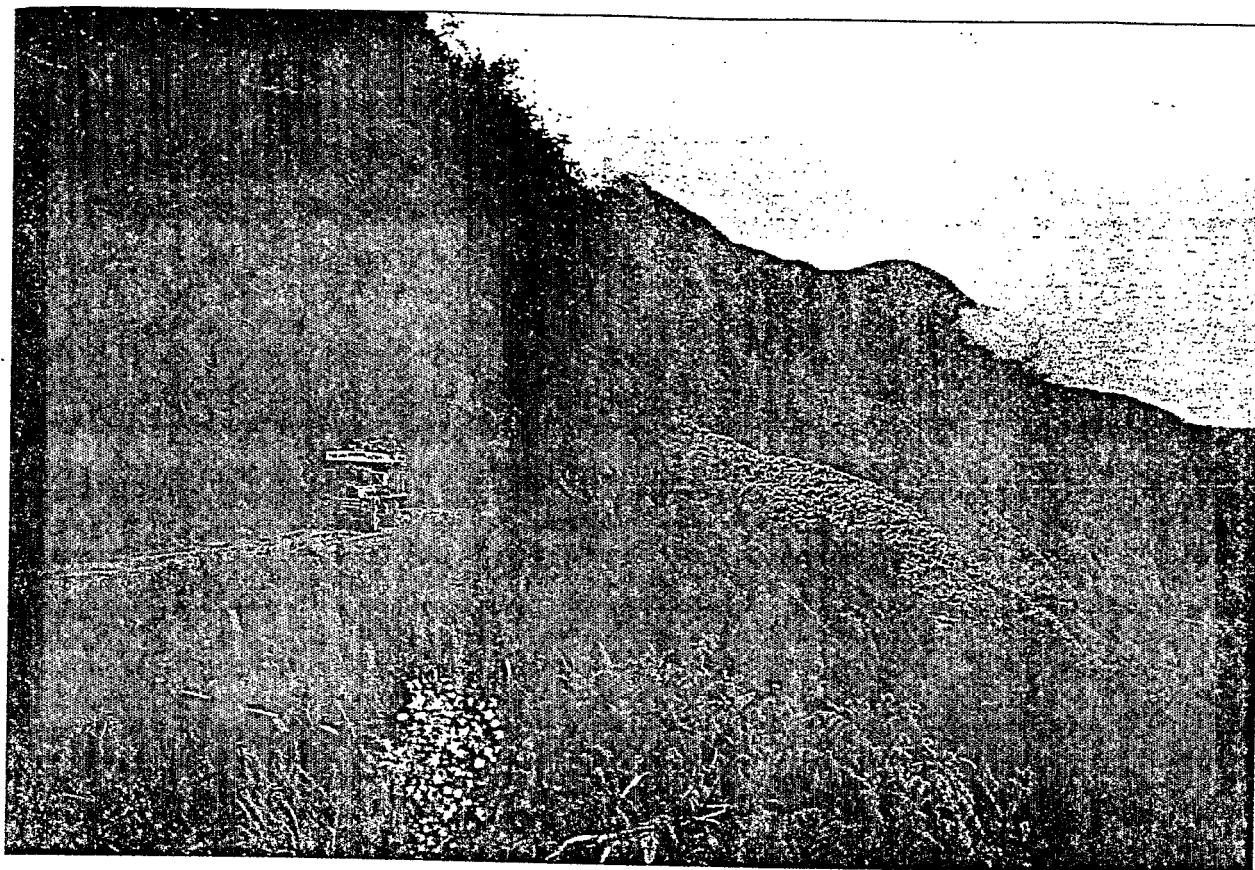


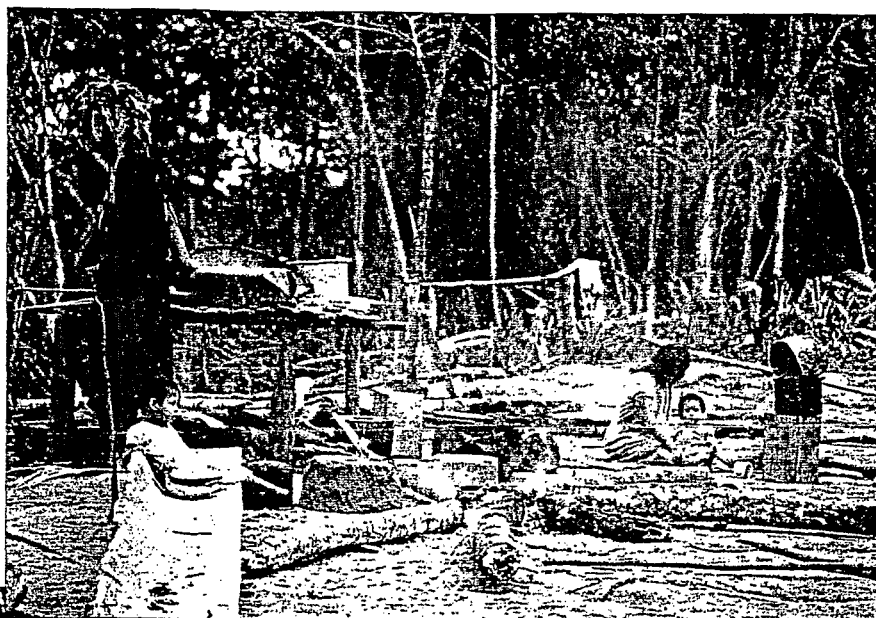
Figure 3. La recherche de nouveaux médicaments pour traiter la leishmaniose a porté principalement sur deux régions du département de La Paz, en Bolivie : les Yungas, entre 3 000 mètres et 1 000 mètres d'altitude, une région de colonisation ancienne proche de La Paz (ci-dessus), et l'Alto-Beni, une zone de colonisation plus récente située dans le piémont andin à des altitudes variant entre 1 100 mètres et 200 mètres (voir la carte). Ces deux régions se caractérisent par des climats subtropicaux ou tropicaux avec une pluviométrie importante (3 à 4 mètres d'eau par an), une saison sèche de juin à octobre et une saison pluvieuse de novembre à avril très marquées. (Cliché Alain Fournet)

Les problèmes économiques engendrés par la baisse du cours des matières premières (étain et autres minéraux) au cours des années 1980 ont conduit à la fermeture des mines d'étain nationalisées de la Compagnie minière bolivienne (COMIBOL). Les mineurs se retrouvant sans emploi se sont vu proposer par le gouvernement de mettre en valeur les terres tropicales ou sub-tropicales des départements de La Paz, du Beni, de Cochabamba et de Santa-Cruz, en leur offrant des parcelles de forêts à défricher. Ce phénomène de colonisation est déjà bien connu au Pérou et en Equateur, autres pays andins ayant à la fois des régions amazoniennes et d'altitude⁽²⁾.



Les personnes d'origine altiplanique, Quechuas ou Aymaras, arrivent en forêt dans un milieu très hostile et inconnu auquel elles ne sont pas préparées. Elles doivent s'acclimater à la chaleur, au changement de nourriture, etc. Surtout, elles sont rapidement menacées par les maladies tropicales, essentiellement la

Figure 4. Les Chimanes vivent dispersés par famille ou par clan dans un groupement de quelques habitations aux toits de tuiles de palmes (ci-contre). Ils utilisent couramment trois plantes pour traiter les lésions dues à la leishmaniose cutanée. Les écorces des tronc sont récoltées par un grattage soigneux du tronc (ci-dessous) et sont appliquées fraîches sous la forme d'un emplâtre directement sur les plaies. Le cataplasme est renouvelé jusqu'à cicatrisation complète de la lésion. Plusieurs extraits préparés à base de ces trois plantes ont montré in vitro une activité anti-leishmanie. (Clichés Alain Fournet)



leishmaniose cutanée (nommée espundia), le paludisme, la fièvre jaune et toutes sortes de maladies virales, connues ou inconnues, de ces régions. Ces maladies sont en effet totalement absentes en altitude. Le choc est accentué par la malnutrition, des logements précaires et dispersés, le manque d'infrastructures routières, sanitaires et éducatives. L'éloignement de tout service, école et dispensaire, influe largement sur l'état physique et psychologique des colons.

Dès leur arrivée, ces derniers doivent défricher leur lopin de forêt primaire ou secondaire, appelé « chaco ». Au cours de la phase de mise en valeur de la terre, ils sont continuellement agressés par des nuées d'insectes parmi lesquels se trouvent les phlébotomes, vecteurs de la leishmaniose cutanée. Ceux-ci (c'est-à-dire, en Bolivie, plusieurs dizaines d'espèces appartenant aux genres *Lutzomyia* et *Psychodopygus*) vivent aux pieds ou aux sommets des arbres, ou

bien dans les litières de feuilles (fig. 1). Personne ne connaît exactement l'incidence exacte de la leishmaniose cutanée chez les colons, mais certains épidémiologistes travaillant à l'IBBA estiment qu'au cours de la première année de contact avec la forêt, environ 50% d'entre eux sont contaminés par cette maladie. Pour réduire les conséquences de la leishmaniose chez les colons, de nouveaux médicaments nous apparaissent

- (1) A. Fournet et al., *J. Ethnopharmacol.* 41, 19, 1994.
- (2) A. M. Stecma Florida Sc., 45, 94, 1982.
- (3) A. Fournet et al., *Can. J. Chem.*, 67, 2116, 1989.
- (4) A. Fournet et al., *J. Nat. Prod.*, 56, 1547, 1993.
- (5) P. C. Viera et I. Kubo, *Phytochemistry*, 29, 813, 1990.



donc nécessaires. L'idée d'utiliser les plantes comme moyen thérapeutique contre la leishmaniose faisait suite à des observations cliniques que nous avions effectuées en 1982 sur le terrain en Guyane française. Avec François Le Pont, épidémiologiste spécialiste de la leishmaniose à l'Orstom, nous avions été intrigués par le fait que certains Amérindiens vivant en forêt guyanaise étaient marqués par des cicatrices caractéristiques d'une leishmaniose cutanée, le « pian-bois » (due à *Leishmania guyanensis*). On pouvait certes penser à des guérisons spontanées, qui sont cependant longues à obtenir (deux ans). Mais dans l'hypothèse inverse, il nous fallait comprendre comment ces personnes, vivant parfois très éloignées d'un centre de santé, parvenaient à soigner cette parasitose sans avoir recours aux thérapies classiques.

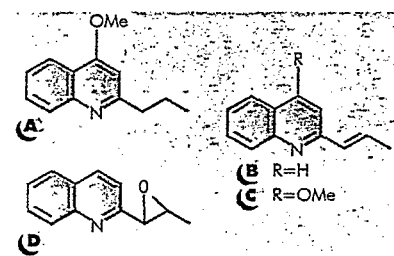
Lors de nos premières prospections sur le terrain, en 1984-1986, les colons que nous avions rencontrés nous avaient indiqué qu'ils employaient comme seul traitement des substances corrosives, notamment l'essence d'automobile, le gasoil, le kérosène, l'acide sulfurique de batterie, le jus de citron, le ciment chaud, la poudre noire des piles, ou des substances végétales très caustiques telles que les latex de ficus (*Ficus* sp.) ou d'une euphorbe (*Ura crepitans*).

Toutefois, les colons nous ont indiqué onze plantes dont ils utilisaient les feuilles ou les écorces fraîches, sous forme d'un emplâtre appliqué sur les lésions dues à la leishmaniose cutanée.

Figure 5. Parmi les trois plantes ayant démontré une activité leishmanicide, la plus intéressante est un arbuste, *Galipea longiflora* (l'éventa en langue chimane), que l'on voit ici. Toutes les molécules isolées de cette plante sont des quinoléines. Quatre quinoléines nouvelles ont été isolées, appelées les chimanines A, B, C et D en hommage aux Indiens chimanes qui ont fourni l'information sur l'usage de cette espèce. (Cliché Alain Fournet)

Lors des tests biologiques préliminaires effectués en 1986 à l'IBBA sur les parasites en milieu de culture (*in vitro*), seules deux de ces plantes ont révélé des extraits actifs sur les leishmanies : *Bocconia pearcei* (papaveracées) et *Bocconia integrifolia*⁽¹⁾. Ces deux espèces ayant déjà fait l'objet de nombreux travaux pharmacologiques depuis les années 1940, nous n'avons cependant pas poussé plus avant les recherches, d'autant que nous avons découvert peu de temps après des plantes aux propriétés bien plus originales.

Ce cap décisif a été franchi en 1987 grâce aux Indiens chimanes, qui vivent sur les derniers contreforts des Andes, aux limites des départements de La Paz et du Beni (fig. 3 et 4). Cette rencontre n'aurait jamais eu lieu si nous n'avions pas fait la connaissance, par l'intermédiaire de Philippe Desjeux, codirecteur de l'IBBA à l'époque, de deux prêtres, l'un suisse, l'autre alsacien. Le premier, le padre Christian Frézard, est responsable de la paroisse de San Borja, une bourgade de douze mille habitants



dans le département du Beni. Le second, le padre Martin Baur, est installé depuis plus de trente ans dans la réserve chimane.

Aux premiers contacts avec les Chimanes, nous avons observé qu'un bon nombre d'entre eux, adultes ou enfants, avaient des cicatrices caractéristiques d'une leishmaniose cutanée. Après plusieurs séjours de trois à quatre semaines à Fatima, nos deux informateurs, Miguel et Maximiliano, âgés de 55 ans, nous ont montré trois plantes employées régulièrement par les Chimanes pour traiter l'espundia : l'éventa (*Galipea longiflora*) (rutacées), l'apai-niki (*Pera benensis*) (euphorbiacées) et le sou sou (*Ampelocera edentula*) (ulmées).

L'éventa s'est avéré être la plante la plus intéressante par son activité biologique et sa composition chimique originale (fig. 5). C'est un arbuste de dix à quinze mètres de haut, connu uniquement en Bolivie dans les forêts tropicales des derniers contreforts des Andes, dans l'Alto-Beni des départements de La Paz

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

Tous les organes de la plante, les écorces de tronc, celles des racines, les feuilles, les fruits, et les graines ont cependant fait l'objet d'essais biologiques *in vitro* sur trois espèces de leishmanies (*Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. donovani*) au stade de vie que l'on trouve chez l'insecte vecteur (« promastigote »). Les extraits préparés avec des solvants organiques (éther de pétrole, chloroforme) à partir des écorces de tronc, de racines et à partir des feuilles détruisaient les parasites *in vitro* à des concentrations variant entre 100 et 25 µg par millilitre⁽¹⁾. A la suite de ces essais biologiques préliminaires, des chercheurs de l'IBBA ont montré en 1987 que la présence d'alcaloïdes dans les écorces et dans les feuilles de l'éventa était responsable de l'activité antiparasitaire. Cette activité n'a pas été détectée avec les différents extraits préparés avec les fruits et les graines. Puis, à partir de tous les organes, des chercheurs des laboratoires de pharmacognosie (étude des matières premières et des substances d'origine naturelle servant à préparer des médicaments) des facultés de pharmacie d'Angers et de Châtenay-Malabry, à l'université Paris-Sud, ont identifié treize alcaloïdes en 1989 et 1990^(3,4).

Toutes les molécules découvertes sont des quinoléines (composés de la famille de la quinine) portant sur leur deuxième atome de carbone une chaîne à trois carbones (chaines alkyles ou aryles). Quatre ont été nommées chimanines (A, B, C, D) (fig. 5). De telles molécules ne sont pas fréquentes dans la nature et semblent caractéristiques de la famille des rutacées, et en particulier du genre *Galipea* auquel appartient l'éventa. L'étude d'une espèce brésilienne, *Galipea bracteata*, semble le confirmer⁽⁵⁾. En revanche, l'activité leishmanicide des quinoléines isolées de l'éventa n'est pas étonnante. Les quinoléines sont des composés connus pour leurs nombreuses activités biologiques⁽⁶⁾ et leurs applications antipaludiques⁽⁷⁾, antiprotozoaires⁽⁸⁾, anti-inflammatoires⁽⁹⁾, antiallergiques⁽¹⁰⁾,

antimicrobiennes⁽¹¹⁾, ou antivirales⁽¹²⁾. L'intérêt de ces alcaloïdes pour le traitement des leishmanioses a été confirmé en 1989 par l'un d'entre nous (Alain Fournet) et deux de nos collègues de l'IBBA, Alcira Angelo Barrios et Victoria Muñoz, sur des souris infectées par *Leishmania amazonensis* et *L. venezuelensis*⁽¹³⁾.

La difficulté majeure pour reproduire des leishmanioses cutanées chez l'animal est d'éviter une autocicatrisation trop rapide, tout en essayant d'obtenir des lésions de taille suffisante pour observer l'effet d'un médicament. La toxicité et l'activité des quinoléines ont été alors comparées à celles du médicament le plus couramment employé pour traiter les leishmanioses, un dérivé antimoné, le Glucantime[®].

Les molécules tirées de l'éventa sont de la famille de la quinine. Efficaces « in vitro » et chez l'animal, elles vont faire l'objet d'essais chez l'homme, en Bolivie

Toutes les quinoléines ainsi testées n'ont montré aucune toxicité apparente chez l'animal. Mais seules la 2-*n*-propylquinoléine et la chimanine B ont eu une action thérapeutique — toutefois légèrement inférieure à celle de la Glucantime[®] — lorsqu'elles étaient injectées directement à l'endroit de la lésion, en une seule dose. Pour le confirmer, d'autres essais, avec une méthode améliorée, sont en cours au Paraguay. Évalués chez des souris infectées par *Leishmania donovani*, qui provoque la leishmaniose viscérale, certains composés, tels que la chimanine D ou la 2-*n*-propylquinoléine, ont démontré une activité encourageante après administration à des souris par voie orale⁽¹⁴⁾ : ils réduisent de plus de 90% le nombre de parasites présents dans les macrophages du foie (cellules de Küppfer).

Depuis 1993, les quinoléines isolées de *Galipea longiflora* et des composés de structures chimiques proches ont été synthétisés au laboratoire de chimie organique de la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry (Pr J. Mayrargue et H. Moskowicz). Compte tenu des résultats positifs obtenus *in vitro* et chez l'animal, des essais cliniques sur des patients volontaires vont débuter en juin 1995 sous le contrôle de Heydy Monasterios Torrico et Luis Valda Rodriguez, du Centre hospitalier universitaire de La Paz. Le traitement se

ferait par application locale d'une pommade préparée à partir des quinoléines les plus actives.

Si les résultats cliniques confirment l'intérêt thérapeutique de ces molécules, les produits obtenus par synthèse pourraient avoir un avenir industriel. Pour le moment, la leishmaniose touchant surtout les pays en développement, aucune firme pharmaceutique n'a manifesté l'intention de produire ces molécules sous forme de médicaments.

Il existe cependant une autre possibilité de développement industriel : la préparation de spécialités à usage vétérinaire destinées à traiter les chiens, qui forment le réservoir du parasite provoquant la leishmaniose viscérale. On peut en effet penser que dans les pays affectés qui en ont les moyens, notamment les pays méditerranéens, les personnes possédant un chien infecté auront le désir de le faire soigner.

Le risque de contamination humaine via la piqûre de phlébotomes (*Phlebotomus* sp.) est en effet loin d'être négligeable dans ces pays. Ainsi, en 1992, une équipe de parasitologues de la faculté de médecine de Nice a rapporté qu'en 1989, alors que plus de 17% des chiens de l'Abadie, village de l'arrière-pays niçois, étaient infectés par *Leishmania infantum*, 30% des personnes contrôlées étaient positives à un test de dépistage de ce parasite⁽¹⁵⁾. La maladie ne se manifeste cependant que chez le petit enfant et chez les adultes immunodéprimés. La même équipe a montré que la fréquence annuelle de la leishmaniose viscérale dans le département des Alpes-Maritimes est en augmentation depuis dix ans, passant de trois cas par an en 1985 à quinze cas annuels en 1992, notamment du fait du sida⁽¹⁶⁾.

N'oublions pas cependant que les pays en développement sont de loin les premiers concernés par les leishmanioses. Avant de passer à un développement industriel de nouveaux médicaments, et en admettant que les essais cliniques soient positifs, il faudra étudier le mécanisme d'action des nouvelles molécules, en particulier la relation entre leurs structures chimiques et leurs activités biologiques. Il restera ensuite à choisir la molécule la plus efficace, la moins toxique et la plus abordable pour les malades des pays en développement. ■

POUR EN SAVOIR PLUS

- L. Girault, *Kallawaya guérisseurs itinérants des Andes. Recherches sur les pratiques médicales et magiques*, Ed. Orstom, 1984.
- F. Le Pont et al., *Leishmanioses et phlébotomes en Bolivie*, Ed. Orstom/Inserm, 1993.
- W. Peters et R. Killick Kendrick, *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Academic Press, 1987.
- OMS, « Leishmanioses », in *Dixième rapport du programme TDR*, Genève, 1991.

- (6) A.M. Farhaly et al., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 323, 247, 1990.
- (7) J.B. Wommack Jr et D.E. Pearson, *J. Med. Chem.*, 13, 383, 1970.
- (8) S.F. Queener et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 377, 1991.
- (9) J.H. Musser et al., *US Patent*, 4,904,786, 1990.
- (10) C.A. 113.78185k.
- (11) R.D. Yousssef et al., *J. Med. Chem.*, 33, 1186, 1990.
- (12) S. Takada et al., *Jpn Patent*, JP 02.188, 570, 1990.
- (13) C.A. 114.23 809g.
- (14) I.W. Althaus et al., *PCT Int. Appl. WO 90, 05, 523*, 1990.
- (15) C.A. 113.2122013h.
- (16) A. Fournet et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 859, 1993.
- (17) A. Fournet et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 33, 537, 1994.
- (18) P. Marty et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86, 249, 1992.
- (19) P. Marty et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83, 33, 1994.