

Aspects de la recherche en chimiothérapie antiparasitaire en Bolivie

E. Deharo, C. Moretti, V. Muñoz, M. Sauvain et E. Ruiz
Institut bolivien de biologie d'altitude, La Paz
ORSTOM, La Paz

En Bolivie, comme dans d'autres pays sous-développés, sévissent de nombreuses pathologies parasitaires. Cependant, les moyens thérapeutiques disponibles ne sont pas toujours satisfaisants et restent inaccessibles à la majorité des Boliviens. Une voie d'accès à des molécules actives originales est l'isolement et la confirmation d'activité de divers extraits de plantes dans les pharmacopées traditionnelles en milieu tropical. Les auteurs rendent compte d'un programme d'études basé sur ces connaissances ethno-médicales pour mettre en évidence l'activité de composés potentiellement leishmanicides, antimalariques et trypanocides.

In Bolivia, as in other underdeveloped countries, numerous parasitic pathologies rage. Moreover, the therapeutic means available are not always satisfactory and are inaccessible for the majority of the Bolivian people. One way to gain access to active and original molecules is the isolation and activity confirmation of the various plant extracts used in the traditional pharmacopoeia in a tropical zone. The authors develop a study program based on this ethno-medical knowledge in order to reveal the potential compound whose activity could act against malaria, leishmania and Chagas disease.

Mots clefs : Antileishmaniens - Antipaludiques - Trypanocides - Antiparasitaires d'origine naturelle.

Keywords : Leishmanicid drug - Antimalarial drug - Trypanocidal drug - Antiparasitic product of natural origin.

Sur le vaste territoire bolivien (1 098 581 km²), se différencient nettement trois zones géographiques : la cordillère orientale (avec des sommets dépassant les 6 000 m), les vallées interandines et les immenses plaines tropicales occidentales.

Contrairement aux idées répandues, plus de 70% de la superficie du pays est occupé par un relief non andin, lequel, jour après jour, voit sa population augmenter par un phénomène d'immigration des populations venues des hauts plateaux. Ces zones n'échappent pas aux grandes endémies parasitaires du monde tropical. Parmi elles, trois grandes parasitoses prennent des allures préoccupantes : la leishmaniose, la maladie de Chagas et le paludisme.

La leishmaniose est due à l'inoculation d'un protozoaire du genre *Leishmania* par un phlébotome et revêt trois types de formes cliniques :

- la forme cutanée, caractérisée par une papule érythémateuse ;
- la forme cutanéomuqueuse, à l'origine d'un ulcère surinfecté évoluant vers des mutilations faciales redoutables ;
- la forme viscérale, s'accompagnant de fièvre, d'une altération de l'état général et d'une hépatosplénomégalie très importante qui, non traitée, est d'évolution fatale.

La maladie de Chagas (trypanosomiase américaine) est due à la transmission d'un protozoaire du genre *Trypanosoma* par les déjections d'un insecte, la réduve, après son repas sanguin. La phase aiguë de la maladie se manifeste par des signes très généraux comme : hyperthermie, hépatosplénomégalie, adéno-pathie et conjonctivite associée à un œdème palpébral. Elle devient souvent asymptomatique pendant plusieurs années, avant d'évoluer vers une phase chronique au cours de laquelle apparaissent des dysmorphies gastriques et cardiaques pou-

30 JAN. 1996

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 43720

Cote : B ex 1.

vant entraîner la mort. En Amérique du Sud, environ 20 millions de personnes sont infectées, et plus de 120 000 nouveaux cas sont recensés chaque année.

Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis par un moustique du genre *Anophele*. La symptomatologie associe des épisodes fébriles, une hépatosplénomégalie et une anémie progressivement croissante. Le tableau clinique peut se compliquer d'une encéphalite fébrile aiguë qui peut être fatale en deux à trois jours. Cette parasitose demeure une des priorités de recherche pour l'Organisation mondiale de la santé, selon laquelle 100 millions de cas sont à déplorer chaque année. La mortalité est évaluée, et probablement sous-estimée, à 2 millions d'individus, dont la moitié sont des enfants.

Les moyens thérapeutiques disponibles pour soigner la leishmaniose demeurent peu nombreux : les sels d'antimoine (Glucantime[®], Pentostam[®]) ou de pentamidine (Lomidine[®], Pentacarinat[®]) sont parfois inefficaces et tous plus ou moins toxiques (toxicité rénale, hépatique, neurologique et hématologique des sels d'antimoine, syncope, épilepsie et induction de diabète dus à la pentamidine). De plus, des injections quotidiennes durant 15 à 60 jours sont indispensables.

L'amphotéricine B (Fungizone[®]), associée à un corticoïde, est venue renforcer l'arsenal thérapeutique mais, malheureusement, sa forte toxicité réserve son usage au milieu hospitalier. Le kétoconazole et la paromomycine ont également été proposés, mais ne sont pas efficaces pour toutes les formes cliniques.

En ce qui concerne le traitement de la maladie de Chagas, il se limite au nifurtimox (Lampit[®]) et au benzonidazol (Radanil[®]), mais les souches de parasites y sont inconstamment sensibles. De plus, si l'activité se révèle au cours de la phase aiguë, elle est pratiquement nulle au moment du passage à la chronicité.

Quant à la chimiothérapie du paludisme, elle doit être en perpétuel renouvellement, en raison de l'émergence de résistances plasmodiales vis-à-vis des agents antimalariques.

Par ailleurs, l'ensemble de ces médicaments est d'un coût prohibitif pour la plupart des Boliviens ; leur diffusion dans le pays reste très limitée et il est souvent difficile d'effectuer les traitements dans de bonnes conditions sanitaires. Les dépenses de santé dans les pays d'Amérique du Sud et centrale n'excédant pas cinq dollars américains par habitant et par an, les autorités ne peuvent pas mettre en place des campagnes de prévention et encore moins de traitement.

Il est donc urgent de trouver de nouvelles orientations thérapeutiques. Une voie d'accès à des molécules actives originales est le criblage de plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles en milieu tropical [1]. En effet, tous les peuples primitifs ont acquis un savoir sur les propriétés médicinales et les techniques d'utilisation d'un grand nombre de plantes appar-

tenant à leur milieu ambiant. Cette connaissance, transmise oralement de génération en génération, a parfois été recueillie. Ainsi retrouve-t-on dans la Bible la description de quelque 200 plantes et leurs applications thérapeutiques.

En Amérique du Sud, cette connaissance fut transmise par les autochtones aux missionnaires et voyageurs espagnols qui les rassemblèrent au sein de divers ouvrages, comme par exemple : *De la natural historia de las Indias e islas y tierra firme del mar oceano*, publié en 1535 par Gonzalo Fernandez de Oviedo [2].

Cependant, ce genre d'informations doit être considéré avec beaucoup de précautions, car les descriptions des plantes et des pathologies qu'elles sont censées traiter sont souvent incomplètes, voire totalement erronées. De même, l'étude des plantes médicinales ne peut être séparée d'un examen attentif des pratiques médico-religieuses qui les accompagnent, car la détection de l'information utilisable ne peut se faire sans avoir bien compris le système de santé dont elle est extraite.

Par ailleurs, les zones tropicales subissent aujourd'hui de profonds bouleversements, tant au niveau écologique qu'humain. Les communautés anciennement installées maîtrisent bien les richesses végétales avoisinantes. En revanche, les récents colons, de plus en plus nombreux, ont une connaissance limitée de leur environnement ; ils représentent donc peu d'intérêt pour l'investigateur.

De cet ensemble de constatations surgit la nécessité de réunir plusieurs compétences (historiens, botanistes, ethnographes, médecins, pharmaciens, chimistes, etc.) afin de profiter au mieux de l'ensemble des données recueillies.

Notre équipe, au sein de l'Institut bolivien de biologie d'altitude (IBBA), poursuit un programme d'études basé sur ces connaissances ethno-médicales pour mettre en évidence l'activité de composés potentiellement antimalariques, leishmanicides et actifs dans le traitement de la maladie de Chagas.

La leishmaniose présente des signes cliniques bien définis par les populations natives des régions tropicales, ce qui facilite la collecte de renseignements sur l'emploi de remèdes locaux à base de plantes.

Nous avons étendu notre champ d'action à la maladie de Chagas en raison de l'analogie entre les parasites (leishmanies et trypanosomes), et ce malgré l'absence d'information sur le terrain par manque de signes cliniques caractéristiques.

En ce qui concerne le paludisme, l'orientation se porte sur l'activité fébrifuge de la plante sans discrimination, car la symptomatologie précise est mal définie par la médecine traditionnelle.

Nos prospections ethno-botaniques ont lieu dans les zones d'endémie de Bolivie : départements de La Paz, du Beni (Cochabamba) et de Cochabamba (figure 1).



Figure 1 - Carte de Bolivie.

Chaque plante récoltée fait l'objet d'un herbier, car l'identification exacte des espèces tropicales est réservée aux spécialistes. En effet, la taxonomie botanique demeure souvent imprécise dans le monde végétal tropical et la découverte d'espèces nouvelles n'est pas rare. Lorsque la plante est parfaitement identifiée, une recherche bibliographique détaillée est entreprise sur les plans chimique et pharmacologique.

La possibilité de réapprovisionnement est le critère de sélection fondamental, car un résultat positif impose une nouvelle récolte, de l'ordre de plusieurs kilogrammes en poids sec. La disponibilité dans le milieu naturel fait donc éliminer les plantes rares ou de trop petite taille.

Au laboratoire, les divers organes des plantes récoltées sont séparés les uns des autres, séchés, puis subissent diverses formes d'extraction (macération, percolation, décoction) aboutissant à l'obtention de deux grands types d'extraits :

- les extraits éthanoliques (renfermant les substances hydrophiles) ;
- les extraits à l'éther de pétrole (renfermant les substances lipophiles).

Après dessiccation, les extraits sont testés à la fois *in vitro* sur le parasite lui-même et *in vivo* sur la souris ou le hamster infectés.

Essais *in vitro*

Les essais *in vitro* sont pratiqués sur la forme promastigote de trois souches de leishmanies :

- *Leishmania braziliensis braziliensis* (cutanée et cutanéomuqueuse), souche 2903 ;

- *Leishmania mexicana amazonensis* (cutanée diffuse), souche H142 ;
 - *Leishmania donovani* (viscérale), souche PP75 ;
- et sur une souche de trypanosome : *Trypanosoma cruzi*, souche tula.

C'est le modèle le plus simple à utiliser, puisque le parasite se développe dans un milieu sans cellule. Cependant, la forme promastigote n'existe que chez le phlébotome et, de plus, sa susceptibilité aux drogues testées est souvent différente de celle de la forme amastigote rencontrée chez l'homme. Néanmoins, ce modèle reste d'un accès facile (ne nécessitant pas de matériel très spécialisé) et de lecture rapide ; il permet ainsi une première orientation.

En pratique, les essais sont réalisés sur plaque de microtitration dans lesquelles sont distribués parasites et extraits. Après 72 h d'incubation, le nombre de survivants est déterminé par comptage direct au microscope inversé.

Une autre technique permet d'apprécier le nombre de parasites survivants par spectrophotométrie, c'est le test de réduction du sel de tétrazolium, ou test MTT (diméthyl thiazol diphényl tétrazolium). Le MTT est un substrat jaune pâle qui se transforme en produit bleu foncé en présence de cellules vivantes. L'absorbance, lue au spectrophotomètre à 540 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La substance active de référence est la pentamidine.

Les essais *in vitro* sont également réalisés sur les formes amastigotes intracellulaires. Ce modèle repose sur l'infection *in vitro* de macrophages péritonéaux de souris par des amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. Les produits testés sont ajoutés et l'étude de leur activité appréciée par l'évaluation du pourcentage de survie des parasites au moyen de la coloration au bleu trypan. Ce test permet également l'étude du comportement des macrophages sous l'action des drogues. (L'étude *in vitro* de souches de *Plasmodium falciparum* est actuellement en cours d'évaluation, mais rencontre quelques difficultés en raison des problèmes d'approvisionnement en sang humain en Bolivie.)

Essais *in vivo*

La patte inférieure des souris est infectée par une suspension de parasite de la souche *Leishmania mexicana amazonensis* et traitée par les drogues à tester (par voie parentérale ou topique). L'activité est appréciée par la comparaison de l'épaisseur de la patte témoin et de la patte parasitée, au sein de laquelle se développe un granulôme. La substance active de référence est l'antimoniote de N-méthyl glucamine.

Le modèle expérimental du paludisme chez le rongeur reproduit le cycle schizogonique érythrocytaire par injection de globules parasités. Trois types de souches plasmodiales sont utilisées :

- *Plasmodium berghei* (NK 65) ;

- *Plasmodium berghei* (anka) ;
- *Plasmodium vinckey petteri* (279BY).

C'est le modèle le plus voisin du paludisme humain et le plus commode à effectuer. L'administration des produits a lieu 2 h après l'impaludation et se fait par voie intrapéritonéale, sous-cutanée ou orale selon les protocoles d'expérimentation.

L'activité antimalarique est déterminée en comparant sur frottis la parasitémie de souris témoins impaludées non traitées à celle de souris impaludées traitées par les extraits. La substance active de référence est la chloroquine.

Lorsqu'un extrait s'est révélé actif au niveau des essais préliminaires, les molécules actives sont isolées par méthode chromatographique, puis identifiées au moyen de diverses méthodes spectrales (résonance magnétique nucléaire, spectroscopie de masse, etc.).

Après isolement, les tests *in vivo* sont renouvelés afin de confirmer l'activité du produit. Enfin, une tentative de synthèse est entreprise dans le but de contourner les problèmes liés à l'approvisionnement en matière première végétale.

La recherche sur les substances antiparasitaires d'origine naturelle s'est beaucoup intensifiée ces dernières années. De ce fait, la vérification scientifique de l'activité des plantes utilisées en médecine traditionnelle a débouché sur la découverte de nombreux produits antipaludiques, parmi lesquels l'artémisinine ou qinghaosu (QHS).

Ce principe actif, isolé à Shangai en 1972, est extrait d'une *Asteraceae*, *Artemisia annua*, herbacée rudérale spontanée utilisée comme fébrifuge dans la pharmacopée chinoise depuis 340 après JC. Une grande étude clinique, portant sur plus de 2 000 sujets, a montré une épuration parasitaire plus rapide avec ce produit qu'avec la chloroquine [3]. Les dérivés de l'artémisinine devraient aboutir, très bientôt, à la commercialisation d'un nouveau médicament antipaludique.

Les molécules isolées à partir de plantes reconnues par la médecine traditionnelle ne sont pas toujours plus intéressantes que les molécules déjà commercialisées. Il en est ainsi de la cédrinine, quassinolide identifié en 1960, responsable de l'activité antipaludique de *Simaba cedron*, une simaroubacée utilisée dans toute l'Amérique tropicale comme antipaludique. En effet, nous avons démontré que la toxicité sélective de la cédrinine sur les *Plasmodium*, comparée *in vitro* à celle sur cellules de mammifères, est moins favorable que celle obtenue avec la chloroquine diphosphate. Le rapport cytotoxicité/activité antipaludique du premier est égal à 16, alors qu'il est de 347 pour le second [4].

L'intérêt porté à la recherche de nouvelles molécules antileishmaniennes et trypanocides est actuellement en plein essor. Ainsi, certaines substances naturelles récemment mises en

évidence se sont révélées efficaces à la fois *in vitro* et *in vivo*. C'est notamment le cas de l'espintanol [5], terpène extrait d'une annonacée récoltée en Bolivie, qui chez la souris présente une activité comparable à celle du Glucantime®. De même, la conodurine et la gabunine inhibent de manière significative le développement de cultures de *Leishmania mexicana amazonensis* et *Leishmania braziliensis braziliensis*. Ces alcaloïdes ont été isolés à partir des feuilles et des écorces de tiges d'une *Apocynaceae*, *Peschiera van heurkii*, un arbuste abondant dans les zones tropicales basses de Bolivie [6].

Par conséquent, l'effort doit être poursuivi dans le but d'isoler des molécules naturelles actives qui pourraient servir de modèle « tête de file » pour la synthèse éventuelle de nouveaux médicaments. La médecine moderne valorise ainsi ce précieux capital de savoir accumulé par les populations natives des régions tropicales en matière de connaissance des maladies et de leurs traitements.

BIBLIOGRAPHIE

1. SAUVAIN M. - Etude de plantes antiparasitaires du plateau des Guyanes en Amazonie : antipaludiques et antileishmaniens. - Thèse, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, 1989.
2. DOMINGUEZ X. - Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México, 1973.
3. Rapport d'expert OMS. - The development of Qinghaosu and its derivatives as antimalarial drugs. - TDR/Chemal-81.3. QHS/81.3.
4. SAUVAIN M., MORETTI C., MUNOZ V., DEBITUS C., JARDEL C., TIMON-DAVID P. et GASQUET M. - Act. antipaludique de la cédrinine isolée de *Simaba cedron* Planchon. - Poster présenté au 3ème Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique du Pacifique. Nouméa, 26-30 août 1991.
5. HOCQUEMILLER *et al.* - Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau terpène antiparasitaire. - *Journal of Natural Products*, 54, 445-452, 1991.
6. MORETTI C., MUNOZ V., SAUVAIN M., CARON C., PONS A., MASSIOT G., LEMEN OLIVIER L. - Act. antileishmanienne et antimicrobienne des alcaloïdes de *Peschiera van heurkii*. - Poster présenté au 3ème Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique du Pacifique. Nouméa, 26-30 août 1991.

ADRESSES DES AUTEURS

E. Deharo, V. Muñoz et E. Ruiz, Instituto Boliviano de Estudios de Alto Nivel, Embajada de Francia, Casilla 717, La Paz, Bolivie.

C. Moretti et M. Sauvain, ORSTOM, Casilla 9214, La Paz, Bolivie.

CORRESPONDANCE

Docteur Eric Deharo.